



Università del Piemonte Orientale
“Amedeo Avogadro”

XXV Ciclo di Dottorato
“Dottorato in Medicina Molecolare”

“Unità di Statistica
ed
Epidemiologia dei Tumori”

*“Rischio di mesotelioma maligno della pleura
in associazione ad alcuni polimorfismi del gene XRCC1”*

Relatore:

Prof. Corrado Magnani

Candidata:

Marina Padoan

Anno accademico 2009 – 2012

“...A volte capita che i sogni si avverino...”

Alla mia famiglia

Indice

Abstract	pag.	III
1 Introduzione	pag.	5
1.0 Presentazione	pag.	6
1.1 Caratteristiche cliniche del Mesotelioma	pag.	8
1.2 Epidemiologia del Mesotelioma.....	pag.	9
1.3 L'Amianto	pag.	10
1.4 Il destino delle fibre inalate	pag.	13
1.5 Esposizione all'amianto: patologie connesse	pag.	13
1.6 La legislazione sull'amianto	pag.	14
1.7 Conseguenze oncogene dell'esposizione all'amianto	pag.	15
1.8 Mesotelioma: la sua eziopatogenesi	pag.	16
1.9 Fattori predisponenti al cancro	pag.	17
1.10 La riparazione del DNA: i suoi meccanismi	pag.	20
1.11 Geni coinvolti nella suscettibilità poligenica al cancro	pag.	21
1.12 Gli aspetti genetici del Mesotelioma	pag.	30
1.13 Mutazioni genetiche	pag.	31
1.14 Lo studio caso-controllo	pag.	33
2. Scopo del lavoro	pag.	35
3. Descrizione del Protocollo dello studio, dei principi scientifici e tecnologici e Analisi statistica		
3.1 Disegno dello studio	pag.	36
3.1.1 Descrizione del campione di Casale Monferrato.....	pag.	38
3.1.2 Descrizione del campione di Torino	pag.	38
3.1.3 Analisi Genetiche	pag.	40
3.1.4 Analisi degli SNP e Controllo qualità	pag.	41
3.1.5 Sequenziamento	pag.	41
3.1.6 Analisi degli aplotipi	pag.	41
3.1.7 Espressione di XRCC1	pag.	42
3.1.8 Analisi Statistica	pag.	43
3.1.9 Descrizione degli applicativi statistici applicati allo studio genetico	pag.	45
3.2.1 Pazienti e metodi di studio della popolazione	pag.	46
3.2.2 Studio sulla popolazione: i soggetti Liguri	pag.	47
3.2.3 Analisi dei genotipi: soggetti di Casale Monferrato	pag.	48
3.2.4 Analisi dei genotipi: soggetti della Liguria	pag.	48
3.2.5 Misure controllo qualità	pag.	48
3.2.6 Analisi Statistica	pag.	50

4. Presentazione dei risultati	pag. 51
4.1 Caratteristiche dei soggetti	pag. 51
4.1.1 Analisi degli SNP	pag. 52
4.1.2 Combinazione dei polimorfismi di ERCC1 ed XRCC1	pag. 54
4.1.3 Analisi degli aplotipi	pag. 54
4.1.4 Espressione di XRCC1	pag. 55
4.2.1 Risultati di NAT 2	pag. 55
4.3 Polimorfismi varianti di XRCC1	pag. 56
5. Discussione e Conclusioni e Sviluppi Futuri	pag. 69
6. Riferimenti Bibliografici	pag. 76

XRCC1 and ERCC1 variants modify malignant mesothelioma risk: A case-control study

Pooled analysis of NAT2 genotypes as risk factors for asbestos-related malignant mesothelioma

Indice delle Tabelle

1.3 Fondamentali tipi di amianto	pag. 11
1.11 Polimorfismi in studio	pag. 22
3.1.1 Descrizione del campione	pag. 39
4.3.1 Identificativi dei polimorfismi di XRCC1 e loro frequenze alleliche ...	pag. 67
4.3.2 Aplotipi di XRCC1	pag. 68

Indice delle Figure

4.3 Polimorfismi di XRCC1 e relativa localizzazione	pag. 67
-----------------------------------------------------------	---------

Abstract

Introduzione

Questo studio indaga il ruolo di polimorfismi genetici di geni, implicati nella riparazione dei danni al DNA, nell'insorgenza del Mesotelioma Maligno Pleurico (MMP).

Lo studio genetico è basato su uno studio caso-controllo condotto nell'area dell'ex ASL 21 (Casale Monferrato e Valenza) per la presenza dello stabilimento "Eternit" operante a Casale Monferrato dal 1907 al 1986. Nello studio pubblicato da *Dianzani et al. (2006)*, è stato riportato un possibile ruolo del polimorfismo XRCC1-399Q nello sviluppo del MMP.

Per valutare se 399Q era direttamente responsabile dell'associazione con la patologia o se un diverso cambiamento avrebbe avuto un ruolo chiave, si sono genotipizzati ulteriori dodici polimorfismi a singolo nucleotide (SNPs) riportati nel database HAPMAP come il tag XRCC1-SNPs. (SNPs che consentono di rilevare tutte le combinazioni di aplotipi nel locus).

Materiali e Metodi

Sono stati considerati i casi istologicamente confermati nel periodo dal 1.1.2001 al 31.12.2006, tra i residenti nell'area dell'ex ASL 21. I controlli sono stati campionati casualmente dalla popolazione residente nella stessa zona e sono stati appaiati ai casi per età e sesso. L'analisi statistica è stata condotta per i soggetti che hanno accettato di fornire un campione di sangue: 151 casi (62% degli eleggibili) e 252 controlli (46% degli eleggibili). I soggetti esposti all'amianto erano 131 casi e 194 controlli. Sono stati studiati dodici degli SNPs selezionati del gene XRCC1. Ogni polimorfismo è stato considerato come una variabile categorica (wild type omozigoti, eterozigoti e omozigoti varianti) e come una variabile continua per valutare l'incremento del rischio all'aumentare del numero degli alleli varianti. La regressione logistica multivariata è stata utilizzata per valutare l'associazione tra polimorfismi e patologia ed è stato calcolato l'odds ratio (OR) e il relativo intervallo di confidenza al 95% (CIs). Tutte le analisi sono state aggiustate per

età, sesso ed esposizione all'amianto per tutti i soggetti, mentre per età e sesso per i soggetti esposti amianto.

Risultati

L'analisi statistica ha mostrato un'associazione significativa tra XRCC1-399Q e MMP in individui esposti ad amianto. Il rischio di MMP aumenta con l'aumentare del numero di alleli varianti (OR= 1,44; CI95% 1,02-2,03). Quando il gruppo di eterozigoti R/Q e di omozigoti Q/Q sono stati considerati insieme (vs omozigoti R/R), l'associazione con MMP era al limite della significatività statistica (OR= 1,50; CI95% 0,98-2,28). L'aplotipo TGGGGGAACAGA è stato trovato più frequentemente nei pazienti rispetto ai controlli. Tra i soggetti esposti ad amianto, l'aplotipo era significativamente associato allo sviluppo di MMP (OR = 1,76, 95%CI 1,04–2,96).

Conclusioni

Tra i soggetti esposti all'amianto, una significativa associazione tra XRCC1-399Q e MMP è stata identificata. Ulteriori studi sono necessari per confermare il ruolo dei polimorfismi di XRCC1 nel rischio di sviluppare MMP.

Capitolo 1

Introduzione

È oggi universalmente riconosciuto il fatto che l'amianto sia uno dei materiali a più elevata pericolosità biologica fra quelli presenti negli ambienti di vita e di lavoro, causando sia gravi quadri patologici respiratori associata alla dose di esposizione (asbestosi) sia patologie tumorali maligne, in seguito ad esposizioni anche limitate in termini di entità e durata.

Già all'inizio del XX secolo ed in seguito con sempre maggiore evidenza ed accuratezza, venivano evidenziate gravi patologie strettamente associate all'esposizione ad amianto.

Il mesotelioma maligno (MM) è un tumore maligno che può colpire le membrane sierose: pleura, peritoneo, pericardio e tunica vaginale del testicolo.

In letteratura sono stati descritti casi di mesotelioma in persone residenti intorno a miniere di crocidolite (un tipo di amianto) in Sudafrica (*Kielkowski et al. 2000*), nelle città sede di insediamenti industriali con lavorazioni dell'amianto (*Magnani et al. 2001*), in familiari venuti in contatto con le polveri accumulate sulle tute di lavoratori direttamente esposti (*Ferrante et al. 2007*). L'esistenza di mesoteliomi nei residenti e nei familiari mostra che possono essere pericolose anche esposizioni a basse concentrazioni di asbesto. In genere il tempo di latenza (ovvero il tempo che intercorre tra l'esposizione ad amianto e la comparsa della malattia) è dell'ordine di decenni e può anche superare i 40 anni dall'inizio dell'esposizione (*Magnani et al. 2007; Marinaccio et al. 2007; IARC Monografia 100C, 2011*).

Alcuni autori hanno ipotizzato il ruolo di fattori genetici implicati nei meccanismi di restauro dei danni ossidativi del DNA determinati dalla presenza delle fibre di amianto sia come fattore eziologico dell'insorgenza della patologia sia come modificatore dell'effetto dell'esposizione ad amianto.

Il presente lavoro si basa su uno studio caso-controllo sul MM su base di popolazione condotto nell'area dell'ASL 21, a cui appartiene il territorio di Casale Monferrato, dove dal 1907 al 1986, è stata attiva la più grande industria italiana del cemento-amianto.

I casi ed i controlli sono stati valutati sia per l'esposizione ad amianto sia per la presenza di dodici polimorfismi del gene XRCC1, implicato nel restauro dei danni ossidativi causati dalla presenza delle fibre di amianto.

Lo scopo dello studio è stato valutare l'associazione tra insorgenza di mesotelioma maligno della pleura e alcuni polimorfismi di uno dei geni facenti parte del sistema di restauro del DNA attivato

dal danno ossidativo. Il danno ossidativo causato dalle fibre d'amianto è stato infatti dimostrato sia *in vitro* che *in vivo*: le sue principali conseguenze sono la rottura del singolo filamento di DNA e/o una modificazione di una singola base del DNA (*Landi et al. 2007, Dianzani et al. 2006, Burmeister et al. 2004, Marczyński et al. 2000, Fung et al. 1997, Chen et al. 1996*).

Il gene preso in considerazione è XRCC1, riportato in letteratura come gene associato ad alcuni tipi di tumore e/o a ridotta efficienza del meccanismo di restauro del DNA, (*Ho et al. 2009, Kiran et al. 2009, Bewick et al. 2009*).

I principali meccanismi di restauro sono: BER (base excision repair), NER (il nucleotide excision repair), la riparazione per reversione diretta, la riparazione di errori di appaiamento (mismatch repair) e la riparazione per ricombinazione.

XRCC1 è un gene coinvolto nel restauro delle rotture e del danno al DNA determinati dalle specie reattive dell'ossigeno e in particolare interviene nella correzione di singole basi danneggiate (BER) e nel restauro di rotture della doppia elica. Il processo di restauro per escissione di una base consiste nella rimozione di una base che sia stata alterata per deaminazione, attacco di radicali liberi prodotti dal nostro organismo come difesa da agenti eziologici di natura principalmente batterica o per metilazione. Un altro importante processo è il restauro per escissione di nucleotidi capace di intervenire su vari tipi di danno a carico del DNA. Vengono rimossi dal DNA i nucleotidi nel filamento danneggiato e il filamento intatto viene utilizzato come stampo per la sintesi di un filamento complementare normale.

In particolare sono stati considerati dodici polimorfismi a singolo nucleotide (SNPs) nel gene XRCC1. L'ipotesi principale è che la presenza di uno di questi polimorfismi possa ridurre la capacità dell'organismo di rispondere al danno ossidativo causato dalla presenza delle fibre di amianto determinando un sistema di restauro non perfettamente funzionante, in questo caso le mutazioni indotte dall'amianto non verrebbero corrette portando alla comparsa di mutazioni, all'inizio del processo di carcinogenesi e all'insorgenza del tumore pleurico.

1.0 Presentazione

L'Amianto provoca il mesotelioma, un raro ed aggressivo tumore che colpisce la pleura, il peritoneo (il sacco membranoso che racchiude l'intestino) e il pericardio. Si tratta di una patologia maligna particolarmente aggressiva, tanto che molti studi retrospettivi in letteratura riportano una mediana di sopravvivenza inferiore ad un anno e una sopravvivenza a 5 anni inferiore all'1%

(*Montanaro et al 2009; Ceresoli et al 2007*). È dubbia l'esistenza di una forma benigna del mesotelioma.

L'esistenza di questo tumore era stata ipotizzata fin dalla prima metà del secolo scorso, tuttavia solo nel 1960 il mesotelioma è stato definito dal punto di vista istologico e si è osservato che presentava rapporti con l'attività lavorativa, in particolare con l'esposizione all'amianto. L'associazione tra esposizione ad amianto e mesotelioma è ormai ben nota dalla letteratura scientifica. La prima serie di mesoteliomi pleurici associati all'esposizione a polvere di amianto venne descritta nel 1960 (*Wagner et al. 1960*) tra i minatori di Kimberley in Sud Africa in seguito ad esposizione ad un particolare tipo di amianto, il crocidolite.

Negli anni successivi le segnalazioni si sono susseguite in molti ambienti lavorativi, così che oggi tutte le occasioni di esposizione professionale all'asbesto sono ritenute condizioni a rischio: dall'industria estrattiva alla cantieristica navale, alla produzione di materiali isolanti, di cemento-amianto, di freni e frizioni, a tutte le lavorazioni di manufatti.

L'insorgenza di mesotelioma è stato riscontrato anche in familiari di operai che, portavano le tute da lavoro nelle proprie abitazioni (*Ferrante et al. 2007*).

In Italia è stato riscontrato un eccesso di mesoteliomi in soggetti non lavoratori dell'amianto né familiari di lavoratori, residenti nelle vicinanze di ambienti inquinati da fonti industriali. In particolare in Italia sono quattro le regioni in cui la mortalità per mesotelioma risulta superiore alla media: Liguria (*Gennaro et al. 2000, 2005*) e Puglia (*Coviello et al. 2002*) a causa della presenza dell'industria dei cantieri navali, Piemonte a causa anche della presenza dello stabilimento Eternit, uno dei maggiori stabilimenti di produzione di manufatti in cemento-amianto (*Magnani et al. 2007*) e Lombardia anche per la presenza dello stabilimento di manufatti in cemento – amianto di Broni (*Amendola et al. 2003*).

I dati riscontrati nella popolazione residente nell'area di Casale Monferrato, dove è stata attiva fino al 1986 l'azienda Eternit produttrice di cemento-amianto, hanno evidenziato che i lavoratori del cementificio, hanno una probabilità di 30-35 volte superiore rispetto alla popolazione del Piemonte di sviluppare il mesotelioma pleurico e di 50 volte superiore rispetto a coloro che risiedevano al di fuori della zona interessata dall'inquinamento ambientale da asbesto. Inoltre, è stato osservato che essere residente in Casale Monferrato aumenta il rischio di insorgenza del tumore di 15-25 volte a seconda della distanza delle loro abitazioni dal cementificio (*Magnani et al. 2001; Maule et al. 2007*); quando la distanza dallo stabilimento diminuisce aumenta il rischio di insorgenza del tumore. Il tasso di incidenza del mesotelioma pleurico, tra i residenti dell'area di Casale, nel periodo tra il 1990 e il 2001 è risultato pari a 19 (95%CI 15.7-22.3) per 100.000 persone/anno nei maschi e di 12.5 (95%CI 10-15.1) per 100.000 persone/anno nelle donne (*Mirabelli et al. 2007*).

1.1 Caratteristiche cliniche del mesotelioma

I tumori primitivi della pleura sono denominati mesoteliomi , derivando dalla trasformazione neoplastica di cellule mesoteliali.

Il mesotelio è costituito da due strati, uno che circonda l'organo (mesotelio viscerale) e un secondo che forma un rivestimento a sacco interno ad esso, (mesotelio parietale). Il mesotelioma maligno della pleura è una forma rara di cancro che si origina nel mesotelio, la membrana che avvolge le grandi cavità sierose: pleura, peritoneo e pericardio. Tra questi due strati si produce una piccola quantità di liquido utile a lubrificare i movimenti degli organi. La neoplasia maligna che origina dalle cellule mesoteliali è denominata “mesotelioma”. La localizzazione principale è a livello pleurico, dove se ne riconoscono due forme principali: una localizzata e una diffusa a tutta la superficie di rivestimento del polmone, spesso associata a imponente versamento pleurico. Dal momento che è possibile la diffusione del tumore ad altre sedi per il passaggio delle cellule tumorali nel circolo ematico e linfatico, si può osservare anche estensione ad altre sierose.

Un'altra forma di mesotelioma è quello “peritoneale” che riguarda il rivestimento della cavità addominale, il mesotelioma “pericardico” che riguarda il rivestimento del cuore (*Hayat MA, 2004*) e la tunica vaginale del testicolo. L'insorgenza di mesotelioma in queste sedi è particolarmente rara. All'esame anatomopatologico macroscopico si presenta o con un diffuso ispessimento biancastro della pleura sia viscerale sia parietale (aspetto a “corazza”) o con noduli multipli grigio-biancastri sparsi sulla superficie pleurica o, raramente, con una massa singola. Nella maggior parte dei casi si verifica l'occlusione del cavo pleurico, altre volte i due foglietti sono separati, almeno in parte, per la presenza di un versamento emorragico.

L'aspetto classico, dal punto di vista istologico, è **epiteliomorfo**, con formazione di strutture papillari, acini o nidi solidi di cellule mesoteliali cuboidali, abbastanza monomorfe, con ampio citoplasma eosinofilo. Si può avere una **variante sarcomatoide**, con fasci di cellule mesenchimali fusiformi intrecciati in uno stroma più o meno ialinizzato; e una **variante bifasica** (fenotipo epiteliale e fibroblastico), simile alla precedente, ma con produzione di un'elevata quantità di connettivo fibroso addensato.

Il mesotelioma è un tumore che ha una scarsa propensione a espandersi nell'organismo e a sviluppare metastasi ma a livello locale è un tumore molto aggressivo ed è in grado di compromettere rapidamente la funzionalità respiratoria. Dal momento che è un tipo di tumore raro, dal punto di vista biologico non si sa ancora molto sul processo che porta alla sua formazione e sviluppo.

I sintomi del mesotelioma, quali affanno, tosse stizzosa e comparsa insistente di alcune linee di febbre, sono legati ad una compressione dei visceri che sono a contatto con la massa tumorale: l'aspetto principale è rappresentato da un versamento pleurico, spesso emorragico, con rapide recidive.

La diagnosi si basa essenzialmente sulla presenza dei sintomi e da esami radiografici. In tutti i casi sospetti, l'indagine viene approfondita con altri esami strumentali, fra cui la T.A.C. e l'ecografia e con esami istologici al microscopio di prelievi biotici (pleuroscopia). Dal momento che la diagnosi differenziale fra tumore polmonare diffuso alla pleura e mesotelioma è spesso difficoltosa, l'immunoistochimica e la microscopia elettronica a trasmissione possono essere estremamente utili. La difficoltà nella diagnosi e nella stadiazione del mesotelioma maligno della pleura non ha permesso di raggiungere una decisione definitiva su un approccio terapeutico universalmente riconosciuto. Sia il trattamento chirurgico che il trattamento chemioterapico e radioterapico non hanno fino ad ora portato a risultati prognostici soddisfacenti e non hanno contribuito in modo significativo ad un incremento della sopravvivenza dei pazienti.

Molti studi retrospettivi riportano una sopravvivenza inferiore ad un anno e una sopravvivenza a 5 anni inferiore all'1% (*Ceresoli et al 2007*).

Sono pochi i trial clinici pubblicati sull'efficacia delle differenti terapie chemioterapiche anche a causa della rarità del tumore. Si riporta in particolare, dal momento che ha influenzato il corrente approccio terapeutico, lo studio di fase III pubblicato da *Vogelzang e.t al. (2003)* dove è stata evidenziata una maggiore efficacia del trattamento che prevede l'associazione di pemetrexed e cisplatino vs il solo cisplatino in pazienti con mesotelioma pleurico.

1.2 Epidemiologia del Mesotelioma

Come già esposto, l'esistenza di questo tumore era stata ipotizzata fin dalla prima metà del secolo scorso, tuttavia solo nel 1960 (*Wagner et al, 1960*) il mesotelioma è stato definito dal punto di vista istologico e si è osservato che presentava rapporti con l'attività lavorativa, in particolare con l'esposizione all'amianto. Infatti, frequenti casi di mesotelioma sono stati riscontrati nei minatori di crocidolite in Sudafrica (*Kielkowski et al. 2000*). Negli anni successivi le segnalazioni si sono susseguite in molti ambienti lavorativi, così che oggi tutte le occasioni di esposizione professionale all'asbesto sono ritenute condizioni a rischio: dall'industria estrattiva alla cantieristica navale, alla produzione di materiali isolanti, di cemento-amianto, di freni e frizioni, a tutte le lavorazioni di

manufatti. Il tumore può, inoltre, colpire familiari di operai che, soprattutto in passato, portavano gli indumenti impolverati nelle proprie abitazioni.

In Italia è stato riscontrato un eccesso di mesoteliomi in soggetti non lavoratori dell'amianto né familiari di lavoratori, residenti nelle vicinanze di ambienti inquinati da fonti industriali, quali le aree vicino ai cantieri navali a Trieste, Monfalcone, La Spezia e Casale Monferrato, in provincia di Alessandria.

La zona vicino alla città di Casale Monferrato, dove è stata attiva fino al 1986 l'azienda Eternit produttrice di cemento-amianto, è nota per l'elevato tasso di inquinamento da asbesto.

Dati riscontrati sulla popolazione di quest'area hanno evidenziato che i lavoratori del cementificio hanno una probabilità di 30-35 volte superiore rispetto alla popolazione del Piemonte di sviluppare il mesotelioma e di 50 volte superiore rispetto a coloro che risiedono in campagna. Inoltre, è stato osservato che per i residenti in Casale Monferrato il rischio di insorgenza del tumore aumenta di 15-25 volte a seconda della distanza delle loro abitazioni dal cementificio (*Magnani et al. 1993-2000*).

1.3 L'Amianto

L'amianto (dal greco *amiantos* = incorruttibile), chiamato indifferentemente anche asbesto (dal greco *asbestos* = indistruttibile), è un minerale naturale a struttura finemente fibrosa, (con il termine generico di amianto si definiscono tutti i minerali aventi sfaldamento fibroso); è costituito da un gruppo di minerali fibrosi, non combustibili composti da silicato di calcio e magnesio. Fra le sue caratteristiche più interessanti, l'amianto è costituito da fibre sottili ma molto addensate, che ne fanno un materiale altamente resistente dal punto di vista meccanico, ma allo stesso tempo flessibile. Possiede inoltre proprietà fonoassorbenti e termoisolanti. Ha una buona resistenza termica, pur non essendo un materiale refrattario; resiste a temperature anche di 500°C e, miscelato ad altre sostanze, anche a temperature maggiori. Resiste all'azione di agenti chimici e biologici, all'abrasione e possiede un comportamento soddisfacente nei confronti sia dell'usura termica che meccanica.

Queste caratteristiche, unite ad un basso costo, hanno fatto sì che l'amianto trovasse un largo impiego in svariate applicazioni industriali, edilizie e in prodotti di consumo. La prima utilizzazione dell'asbesto da parte dell'industria risale agli ultimi decenni dell'800 fino ad arrivare ad un fortissimo incremento nella seconda metà del '900.

Si distinguono due fondamentali gruppi di asbesto: uno appartenente alla serie degli anfibioli (l'amianto anfibolo), l'altro alla serie del serpentino (l'amianto serpentino). La distinzione è

abbastanza importante perché l'anfibolo presenta fibre fragili, corte, diritte e rigide, che si spezzano facilmente ma possono essere intessute (le famose coperte antincendio, per esempio); il serpentino, invece, ha fibre più lunghe, ondulate, flessibili e più resistenti. La famiglia del serpentino è rappresentata dal crisotilo, l'unica forma serpentina dell'asbesto, mentre di anfiboli ne esistono di diverse forme: antofillite, actinolite, amosite, crocidolite, tremolite.

AMIANTO O ASBESTO	SERPENTINO Silicato di magnesio	CRISOTILO (amianto bianco) $Mg_3Si_2O_5(OH)_4$
	ANFIBOLI Silicati di calcio e magnesio	ACTINOLITE $Ca_2(Mg,Fe)_5Si_8O_{22}(OH)_2$ TREMOLITE $Ca_2Mg_5Si_8O_{22}(OH)_2$ ANTOFILLITE $(Mg,Fe)_7Si_8O_{22}(OH)_2$ AMOSITE $(Fe,Mg)_7Si_8O_{22}(OH)_2$ CROCIDOLITE (amianto blu) $Na_2(Mg,Fe)_7Si_8O_{22}(OH)_2$

Tabella 1.3 - Fondamentali tipi di amianto -

Entrambi hanno la capacità di suddividersi longitudinalmente in fibre sempre più fini, volatili, inalabili e perciò pericolose.

A causa delle proprietà chimico-fisiche, la forma serpentina dell'asbesto è la più adeguata per creare tessuti e altri oggetti flessibili.

Gli anfiboli hanno una stabilità chimico-fisica superiore e sono stati utilizzati per produrre tubi di fibro-cemento, frizioni, guarnizioni, materiali da copertura, isolanti e materiali ignifughi (Cugell et al. 2004). I principali anfiboli impiegati commercialmente sono stati l'amosite e la crocidolite.

L'amianto ha assunto valore industriale solo dopo il 1860 quando vennero scoperte le prime grandi riserve di asbesto in Canada, fino ad arrivare ad un fortissimo incremento nella seconda metà del 1900. Le ottime caratteristiche chimiche e meccaniche, unite ad un basso costo, hanno fatto sì che l'amianto trovasse una rapida diffusione tramite un largo impiego in svariate applicazioni industriali, edilizie e in prodotti di consumo. In molti prodotti l'asbesto è di solito unito con altri materiali in diverse percentuali, al fine di sfruttare al meglio le sue caratteristiche.

L'uso più importante dell'amianto è stato quello nell'industria di lastre e fogli in cemento-amianto, ma altri importanti prodotti di più larga diffusione riguardano la produzione di asfalto, mattonelle per pavimentazioni, rivestimenti utilizzati per l'isolamento termico dei tubi e delle caldaie, le condutture dell'acqua (acquedotti), fogne, guarnizioni, filtri per bevande, tute, coperte, guanti antincendio (termoisolanti), pannelli fonoassorbenti e/o isolanti, usati per isolare acusticamente e termicamente gli edifici, in particolare quelli edificati in vetrocemento o in elementi metallici, vernici, rivestimenti, stucchi, feltri, tegole. Anche nei mezzi di trasporto l'amianto aveva un ruolo cruciale per la produzione di freni e frizioni per auto, moto e veicoli pesanti. Infatti il materiale d'attrito delle pastiglie dei freni a disco, e delle ganasce di quelli a tamburo, conteneva amianto. L'amianto veniva impiegato tanto come spray (miscelato a leganti non troppo tenaci) da applicare a elementi metallici o altro con funzioni isolanti, oppure amalgamato con altri materiali (la cosiddetta matrice) come il cemento. In questo modo si poteva aumentare la resistenza del cemento contenendo il peso e rendendo più facile la realizzazione di elementi prefabbricati. A questo scopo si impiegavano sia l'amianto anfibolo sia quello serpentino.

In particolare in Italia sono quattro le regioni in cui la mortalità per mesotelioma risulta superiore alla media (*Mastrantonio et al 2002*). Tra le fonti di esposizione ad amianto si segnala in Liguria (*Gennaro et al 2000, 2005*) e Puglia (*Coviello et al 2002*), la presenza dell'industria dei cantieri navali, in Piemonte la presenza dello stabilimento Eternit, uno dei maggiori stabilimenti di produzione di manufatti in cemento-amianto soprattutto per la presenza dell'elemento ondulato con il quale venivano realizzate le coperture dei tetti (principalmente in Italia settentrionale) (*Magnani et al 2007*) e in Lombardia la produzione di cemento-amianto a Broni (*Amendola et al 2003*).

La presenza dell'amianto in sé non è necessariamente pericolosa, dipende dal grado di libertà delle fibre. Finché le fibre non possono liberarsi nell'aria, perché imprigionate nell'impasto del cemento o di altre sostanze (per esempio le resine), oppure semplicemente perché racchiuse in intercapedini sigillate (come nel caso dei vagoni ferroviari in buono stato) il pericolo può essere ragionevolmente escluso. Il problema nasce quando i manufatti che contengono l'amianto si deteriorano. Per questo oggi la principale fonte di esposizione in Italia sono i tetti in Eternit che, col passare degli anni, per

effetto delle intemperie e in particolare delle piogge acide, sono andati progressivamente deteriorandosi con la possibilità, quindi, di liberare le fibre.

1.4 Il Destino delle fibre inalate

Il destino delle fibre di amianto nel polmone dipende dal diametro, dalla lunghezza e dalla forma delle fibre. Le fibre con diametro superiore ai 3 micron non risultano patogene in quanto si arrestano a livello naso-faringeo e non possono raggiungere il polmone distale.

Le fibre fini di lunghezza superiore ai 5 micron fino a 50 micron ed oltre, disponendosi nel bronco in direzione parallela alla corrente aerea raggiungono facilmente l'alveolo, ove le più lunghe possono rimanere in questa sede per lunghi periodi, provocando un'alveolite, mentre le meno lunghe passano nell'interstizio, spostandosi lungo le vie linfatiche.

Le fibre di amianto di anfibolo, essendo di struttura aghiforme, si spostano agevolmente fino a raggiungere la pleura, contrariamente a quanto avviene nei confronti dell'amianto di serpentino. Le fibre di amianto di anfibolo, essendo di struttura aghiforme, si spostano agevolmente fino a raggiungere la pleura, contrariamente a quanto avviene nei confronti dell'amianto di serpentino.

La patogenicità delle fibre di asbesto essenzialmente è attribuibile all'azione traumatizzante da "corpo estraneo" e a quella attivante i macrofagi.

1.5 Esposizione all'amianto: patologie connesse

La respirazione di fibre di asbesto può determinare diverse malattie, tutte comunque caratterizzate da un lungo intervallo di tempo fra l'inizio dell'esposizione e la comparsa della malattia. Questo intervallo, chiamato "tempo di latenza", è in genere di decenni. Il rischio per la salute è direttamente legato alla quantità ed al tipo di fibre inalate, alla loro stabilità chimica, e ad una predisposizione personale intrinseca, a sviluppare la malattia.

Le malattie principali che possono essere provocate dall'asbesto sono:

- asbestosi;
- mesotelioma;
- carcinomi polmonari;
- tumori del tratto gastro-intestinale, della laringe e di altre sedi

L'*asbestosi* è una malattia respiratoria cronica legata alle proprietà delle fibre di asbesto di provocare una cicatrizzazione (fibrosi) del tessuto polmonare; ne conseguono irrigidimento e perdita della capacità funzionale. Le fibre di asbesto penetrano attraverso la bocca ed il naso, procedendo poi lungo la faringe, la laringe, la trachea e i bronchi fino ad arrivare agli alveoli polmonari. Le vie respiratorie possono ostacolare la penetrazione di particelle che abbiano un diametro maggiore di cinque millesimi di millimetro, in quanto sono dotate di ciglia sottilissime e capaci di una continua produzione di muco: le particelle vengono così bloccate e poi, con movimenti regolari o con colpi di tosse, espulse.

Molti studi hanno dimostrato che la pericolosità delle fibre di asbesto è legata al diametro molto piccolo e ad una lunghezza superiore a cinque millesimi di millimetro. È stato dimostrato che una parte dell'asbesto che viene respirato non riesce ad essere espulsa e resta negli alveoli dove provoca una irritazione (alveolite): sembra che questo sia il primo passo per l'instaurarsi di lesioni cicatriziali e quindi di una vera e propria asbestosi. La quantità di asbesto che resta intrappolata nei polmoni è legata alla quantità totale di asbesto inalato, e dunque all'intensità e alla durata dell'esposizione: l'asbestosi è pertanto una malattia in cui esiste una stretta relazione fra "dose" di asbesto inalata e "risposta" dell'organismo, quindi tipica di una esposizione professionale.

1.6 La legislazione sull'amianto

L'accertata pericolosità dell'amianto ha fatto sì che, anche a seguito di numerose direttive della Comunità Europea, con la legge 27 marzo 1992 n.257 (*"Norme relative alla cessazione dell'impiego dell'amianto"*), l'Italia mettesse al bando l'amianto in via definitiva.

Gli imponenti quantitativi di amianto utilizzati nel corso dei decenni pongono oggi un serio problema di sanità pubblica per quanto attiene l'esposizione negli ambienti di vita per la popolazione nel suo complesso, nonché di salute dei lavoratori in riferimento alla elevata necessità di interventi di rimozione e bonifica.

Nel problema sono coinvolte: le Amministrazioni Locali, le Forze Politiche, gli Organi di informazione, le Imprese e le loro associazioni, i Lavoratori e le loro organizzazioni, i Servizi Pubblici di prevenzione e controllo, con l'obiettivo comune di ridurre progressivamente nel tempo più breve le molteplici sorgenti di esposizione.

Sfortunatamente, anche se la legge è in vigore dai dieci anni il pericolo non può dirsi superato. Soprattutto nel Nord-Italia, infatti, sia i materiali per edilizia sia altri manufatti contenenti amianto

sono ancora molto diffusi. L'INAIL ha potuto calcolare in quale percentuale la patologia da MM colpirà i diversi settori di lavoro. In testa c'è la cantieristica navale, con il 30,3%, seguita dall'industria nel suo complesso (27,6%) e dalla cantieristica ferroviaria (14,4%). Inoltre, sempre l'INAIL ricordava che a marzo 2002 erano in totale 136.762 i certificati di esposizione all'amianto rilasciati su richiesta dei lavoratori, dei quali oltre 60.000 affetti, (*Riferimento sito: www.inail.it*).

Importante sarà prevedere un complesso di azioni che comprendono:

- 1) il censimento delle strutture contenenti amianto in matrice friabile;
- 2) la realizzazione del registro dei lavoratori esposti e quello dei casi di mesotelioma; iniziative di promozione alla bonifica con attività di sportello informativo;
- 3) ulteriori iniziative di formazione per Imprenditori e Lavoratori;
- 4) ed infine l'intensificazione dell'attività di vigilanza e controllo.

1.7 Conseguenze oncogene dell'esposizione all'amianto

Allo stato attuale si ritiene che l'amianto possa indurre mesotelioma attraverso un processo infiammatorio dovuto all'accumulo di fibre nella pleura.

Le fibre che riescono a raggiungere gli alveoli polmonari hanno lunghezze inferiori a 200 micron e diametri inferiori a 3 micron, tra queste, le fibre che non vengono espulse o comunque neutralizzate dall'organismo (azione dei macrofagi), sono quelle di lunghezza maggiore di 5 micron che mantengono un rapporto tra la lunghezza e il diametro > 3 .

Le fibre di questa classe dimensionale possono, con il tempo, insinuarsi profondamente nel tessuto polmonare e raggiungere la pleura.

Sembra che la capacità di indurre il cancro sia minore per le fibre di crisotilo, che in virtù del proprio andamento curvilineo, hanno minor attitudine a penetrare nel tessuto polmonare. La più alta carcinogenità degli anfiboli può essere dovuta in parte alla loro più elevata biopersistenza e al loro contenuto in ferro che può catalizzare la produzione di radicali reattivi dell'ossigeno (*Riferimento sito: www.sicurezzaonline.it*).

Una volta inalate, tutte le particelle, a seconda della loro dimensione e struttura, penetrano e si depongono nel sistema respiratorio. Le fibre inoltre tendono a disporsi parallelamente alla direzione del flusso aereo, giungendo fino agli alveoli.

Solo le fibre depositate nel polmone profondo innescano i meccanismi biocellulari determinanti l'alveolite e la reazione fibrotica polmonare. Qualora le fibre riescano a raggiungere il cavo pleurico eserciteranno in quella sede l'azione irritante o cancerogena.

Alle fibre più lunghe si riconosce comunque un maggior potere fibrogeno, in quanto esse non potendo essere fagocitate dai macrofagi, tendono a permanere indefinitamente nel polmone profondo.

1.8 Mesotelioma: la sua eziopatogenesi

Nonostante l'asbesto sia un cancerogeno completo, non è stato ancora chiarito definitivamente il meccanismo attraverso il quale induca il mesotelioma.

Si ritiene che le fibre di amianto siano cancerogene tramite differenti meccanismi: attraverso la generazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS, *reactive oxygen species*) o dalla stessa superficie delle fibre a seguito di reazioni che coinvolgono il ferro come catalizzatore o per effetto della fagocitosi frustrata (*Chen et al. 1996, Fung et al. 1997*).

Molti studi hanno evidenziato che la citotossicità indotta dall'asbesto e le rotture sul filamento di DNA sono dovute anche alla produzione di specie reattive dell'ossigeno. L'asbesto genera danno ossidativo sia attraverso meccanismi ferro-dipendenti che ferro-indipendenti.

Le dimensioni delle fibre sono molto importanti nella mutagenesi: le fibre di grosse dimensioni, infatti, vengono fagocitate in modo incompleto provocando un drammatico *burst* respiratorio con esocitosi dei ROS (fagocitosi frustrata). Anche la quantità di ferro contenuta nelle fibre ha un ruolo centrale: infatti, in presenza di perossido di idrogeno il ferro può generare radicali ossidrilici altamente reattivi secondo la reazione di Haber-Weiss. Le ROS possono causare perossidazione dei lipidi, rotture nel DNA, modificazioni delle basi puriniche e pirimidiniche (*Wang et al. 1998*). Il tipo di danno ossidativo riscontrato più frequentemente nel DNA delle cellule esposte ai ROS è la formazione di 8-idrossiguanina (8oxoG) responsabile della transversione G:C→T:A poiché l'8oxoG è in grado di legarsi all'adenina. Infatti, uno studio ha riscontrato, nel DNA di linfociti di individui altamente esposti all'amianto, livelli di 8oxoG significativamente più elevati ($p < 0.001$) rispetto agli individui di controllo (*Marczynski et al. 2000*).

Attualmente si ritiene che la tumorigenicità delle lunghe fibre di amianto, ad elevato contenuto di ferro, sia dovuta anche alla capacità dei macrofagi di produrre citochine e fattori di crescita che promuovono la progressione neoplastica delle cellule mesoteliali.

Sebbene l'esposizione all'amianto rimanga la principale causa di insorgenza del tumore (80%), esiste un rimanente 20% di casi di mesotelioma in cui non viene riconosciuta alcuna esposizione all'asbesto. Questo aspetto porterebbe a pensare al coinvolgimento di altri fattori eziologici:

radiazioni ionizzanti, il Simian Virus 40 (SV40), infiammazioni croniche (e forse la familiarità), (Hillerdal 1999).

Il virus SV40, presente nelle scimmie, è un virus trasmigrato appunto da scimmia ad uomo; alcuni individui umani, negli anni Cinquanta, furono contagiati da questo virus, attraverso la somministrazione di vaccini anti-polio che risultarono contaminati dal virus SV40; causando alcune conseguenze per la salute stessa e provocando l'insorgenza di alcune forme di tumore. Studi condotti a partire dai primi anni 1990, negli USA, hanno evidenziato in tessuto di mesotelioma umano la presenza di sequenze di DNA, di proteine e di antigeni del virus SV40. Queste osservazioni hanno portato gli stessi autori ad ipotizzare che il virus SV40 eserciti un ruolo eziologico nell'insorgenza del mesotelioma nell'uomo, con un possibile effetto sinergico con l'esposizione a fibre di amianto. Studi sperimentali hanno dimostrato che l'iniezione intrapleurica di SV40 in animali può indurre mesotelioma maligno nel 100% delle cavie, indipendentemente dall'esposizione ad amianto (Cicala et al. 1993). L'oncogenicità del virus SV40 è dovuta all'attività della proteina trasformante Tag che è in grado di legare ed inattivare diverse proteine cellulari umane, tra cui p53, pRb, pRb2/p130 e p300, che hanno attività soppressiva sulla crescita tumorale (Xiao et al. 2001). Inoltre, il virus determina attivazione di un circuito autocrino coinvolgente il fattore di crescita degli epatociti HGF ed il suo recettore Met (Cacciotti et al. 2001). L'attivazione di questo circuito conferisce un vantaggio proliferativo alla cellula ed è stato riscontrato in molti tumori. Ad oggi peraltro non ci sono evidenze certe, nell'uomo, della relazione causale tra SV40 e mesotelioma. In particolare, non sono stati condotti studi epidemiologici per valutare l'associazione tra il virus SV40 e il mesotelioma e l'interazione dello stesso virus con l'asbesto. (Magnani 2005).

1.9 Fattori predisponenti al cancro

Nella patogenesi dei tumori l'esposizione a fattori ambientali cancerogeni ricopre un ruolo fondamentale. Tuttavia, è osservazione comune che alcuni individui si ammalano di tumore maligno in età giovanile e che in alcuni gruppi familiari l'incidenza della malattia neoplastica è elevata, mentre in altri è ridotta. Questo indica che ogni individuo presenta una differente risposta a tali fattori, controllata da una serie di geni di cui ognuno ha un proprio pannello di alleli (Shields et al. 2000). Lo sviluppo di una neoplasia potrebbe, quindi, essere in qualche modo condizionato da fattori di natura genetica. Tali fattori, strettamente collegati al fenomeno della trasformazione neoplastica sarebbero presenti nella linea germinale dei pazienti. Gli individui che hanno ereditato

una o più delle suddette alterazioni corrono un rischio maggiore di sviluppare un tumore rispetto ai soggetti che ne sono sprovvisti.

Le neoplasie umane a base ereditaria costituiscono solo 1-5% di tutti i tumori. Questo valore però sale all'11% se si considerano esclusivamente quelli che insorgono prima dei 45 anni di vita.

L'aspetto ereditario va quindi considerato come un addizionale fattore di rischio al fine dello sviluppo di una neoplasia.

La suscettibilità genetica al cancro coinvolge sia geni ad alta penetranza sia geni a bassa penetranza (*Wild et al. 2002*).

Per la prima tipologia di geni, il rischio ereditario è specifico, ossia predispongono all'insorgenza di peculiari forme di tumori, tra questi si ricorda il retinoblastoma, il tumore di Wilms, alcune tipologie di carcinoma mammario e di carcinoma del colon-retto (*Sartelli M., Scibè R. 2007; Ciuffreda et al. 2007*), la neurofibromatosi, il carcinoma renale, il melanoma. Si tratta di tumori in cui la predisposizione è ereditata in modo mendeliano, con un meccanismo autosomico dominante.

Per la seconda tipologia, il rischio ereditario è generico in quanto l'alterazione trasmessa ereditariamente non riguarda geni direttamente coinvolti nella trasformazione neoplastica, ma interessa geni che presiedono a funzioni indirettamente coinvolte nella patogenesi dei tumori o nel loro successivo sviluppo. Tra questi si annoverano geni del sistema ossidativo microsomiale, che presiede alla trasformazione metabolica di procancerogeni in cancerogeni, ed i geni dei sistemi enzimatici che presiedono alla riparazione del DNA. In questo caso la predisposizione si comporta come un fattore ad ereditarietà poligenica.

La penetranza di un gene dipende da molti fattori, il più evidente è il modo in cui la sequenza genica modificata altera l'espressione o l'attività della proteina. Tuttavia, anche per i geni ad alta penetranza, questa è anche influenzata da altri geni, da agenti esogeni e dal modo in cui interagiscono. Quindi, la predisposizione genetica può essere necessaria, ma raramente è sufficiente a causare la malattia. Infatti, anche nel caso di individui portatori della stessa mutazione ereditaria, il momento di comparsa della malattia è variabile ed è condizionato da altri fattori genetici ed ambientali. Per esempio, l'età di insorgenza del carcinoma mammario non è influenzata solo dal tipo di mutazione nei geni BRCA1 e BRCA2, ma anche da polimorfismi in altri geni e dall'esposizione agli estrogeni (*Wild et al. 2002*).

Per i geni ad alta penetranza la mutazione presente nella linea germinale viene trasmessa come carattere autosomico dominante. La trasformazione neoplastica si verifica però soltanto in quelle cellule dove, a causa di un evento post-zigotico, anche l'altro allele, situato nel cromosoma omologo, viene perso o inattivato.

Il modello meglio conosciuto è quello del retinoblastoma. Il retinoblastoma colpisce un bambino ogni 20.000 neonati e si può manifestare tramite due meccanismi eziologici: uno legato alla trasmissione ereditaria di una ben definita mutazione (60% dei casi) che provoca neoplasia generalmente bilaterale entro i primi 15 mesi di vita, e l'altro dipendente dalla comparsa nella vita postnatale di una mutazione somatica in retinoblasto (40% dei casi) con comparsa di un tumore in un solo occhio, tardivamente, tra i 2 e i 5 anni.

La spiegazione della mancata comparsa del tumore in età adulta è basata sull'ipotesi che le cellule embrionali da cui origina il retinoblastoma siano con molta probabilità destinate ad una scomparsa spontanea dovuta alla loro differenziazione in fotorecettori.

Il gene RB1 è un oncosoppressore in grado di esercitare un controllo negativo sulla proliferazione cellulare. La mutazione del gene, però, non costituisce la sola alterazione genomica delle cellule del retinoblastoma; ad essa se ne associano altre tra cui l'amplificazione del gene c-myc. Ciò indica che l'inattivazione di entrambi gli alleli RB1 costituisce sì la conditio sine qua non per l'innescamento della trasformazione neoplastica, ma che altri danni genomici debbono completare il quadro per assicurare il vantaggio proliferativo al retinoblasto trasformato. L'attività ed il grado di fosforilazione della proteina Rb si modificano nel corso del ciclo mitotico. Durante la fase G1 Rb è ipofosforilata e contrae legami con alcuni membri della famiglia dei fattori di trascrizione E2F/DP bloccandone la funzione transattivante. Il complesso Rb-E2F/DP si lega poi a determinati siti promotori e reprime la trascrizione di geni i cui prodotti consentono la replicazione del DNA cellulare. Quest'effetto è potenziato dall'intervento di una deacetilasi istonica: HDAC1. Quando la cellula deve entrare in fase S, Rb viene iperfosforilata dalle chinasi ciclina-dipendenti e si dissocia dalla HDAC1 e dal complesso E2F/DP, consentendo a quest'ultimo di espletare la propria funzione transattivante. In presenza di stimoli non proliferativi o differenziativi Rb permane allo stato ipofosforilato e la transizione alla fase S viene bloccata.

Il 5-10% di tutti i carcinomi alla mammella ed il 25% di quelli che insorgono in età precoce sono associati alla presenza nel genoma di mutanti, trasmessi per via germinale, del gene BRCA1 o del gene BRCA2. Il carattere è dominante e ad alta penetranza: nelle donne portatrici, il rischio di insorgenza di un carcinoma mammario è del 60% entro i 50 anni e dell'87% entro gli 80 anni.

La poliposi familiare del colon (FAP) a trasmissione ereditaria come carattere autosomico dominante rappresenta un'altra condizione di rischio elevato. Il substrato ereditario è alla base della precoce comparsa di polipi destinati col tempo ad evolvere in carcinomi. Il gene, la cui delezione o mutazione è responsabile di questa malattia, è l'oncosoppressore APC.

1.10 La riparazione del DNA: i suoi meccanismi

Il materiale genetico viene normalmente trasmesso in modo fedele dalla cellula madre alla cellula figlia e da una generazione all'altra attraverso il processo di replicazione del DNA.

Tuttavia, esistono molti fattori che possono alterare la fedeltà di questo meccanismo. Oltre ad un tasso di errore intrinseco nella replicazione del DNA, esistono anche lesioni spontanee che possono produrre ulteriori errori. Inoltre mutageni ambientali possono danneggiare il DNA aumentando notevolmente il tasso di mutazione. Una mutazione è il risultato di qualsiasi cambiamento permanente che altera la costituzione chimica o fisica del DNA. Le mutazioni geniche, quelle che si riscontrano all'interno di un gene o di una sequenza che ne regola l'espressione, assumono grande importanza nella patologia qualora alterino la funzione del gene: possono essere dovute a sostituzioni di coppie di basi, ad inserzioni e delezioni di una o più coppie di basi.

Poiché la maggior parte delle mutazioni è deleteria, le cellule viventi hanno sviluppato una serie di sistemi enzimatici in grado di riparare in vari modi eventuali danni al materiale genetico. Ciascuno di essi è costituito da una o più proteine che svolgono ruoli specifici nel meccanismo riparativo.

La riparazione del DNA è in genere un processo che si svolge in più tappe.

Come primo evento, una o più proteine presenti in tale sistema identificano un'irregolarità nella struttura del DNA; in un secondo momento, enzimi di riparazione del DNA veri e propri, rimuovono l'anomalia. I sistemi enzimatici di restauro del DNA fanno in modo che le alterazioni del genoma non vengano trasmesse alla progenie cellulare, eliminandole prima che la cellula vada incontro al processo replicativo.

Il miglior esempio della prevenzione allo sviluppo neoplastico fornito da questi sistemi è rappresentato dallo Xeroderma Pigmentosum (XP). Questa malattia ereditaria comporta un difetto nei meccanismi di riparazione dei danni del DNA. Nei pazienti XP si riscontra una marcata incidenza di tumori cutanei, perché sono incapaci di riparare i danni provocati dai raggi ultravioletti nel DNA delle cellule dell'epidermide.

È stato inoltre osservato che differenti individui presentano una diversa capacità di riparare il danno sul DNA. Questi dati sono stati ottenuti utilizzando saggi *in vitro* su linfociti e rappresentano gli effetti cumulativi di più sistemi enzimatici. È stata osservata un'ampia distribuzione di questi valori sia nei soggetti normali che nei pazienti oncologici. Tuttavia, una serie di studi ha osservato che individui con ridotta capacità di restaurare il danno si trovano più spesso nel gruppo dei pazienti oncologici piuttosto che nel gruppo dei controlli. Infatti, la minor efficienza di restauro dei danni al DNA rappresenta un significativo rischio di tumore, con un valore di odds ratio che varia tra 1.6 e 10.0 (Mohrenweiser et al. 1998).

Altri esempi in cui un difetto nei sistemi di restauro può portare all'insorgenza di neoplasie di vario tipo sono: la sindrome di Bloom, l'ataxia teleangectasia e l'anemia di Fanconi.

I meccanismi di riparazione conosciuti sono: per reversione diretta (o riparazione dipendente dalla luce), riparazione per escissione di nucleotidi (NER), riparazione per escissione di una base (BER), riparazione di errori di appaiamento (mismatch repair) o riparazione per ricombinazione

1.11 Geni coinvolti nella suscettibilità poligenica al cancro

Numerosi studi hanno identificato diversi polimorfismi (SNPs) in geni coinvolti nella riparazione del DNA per escissione di una base (BER), per escissione di nucleotidi (NER), per ricombinazione e in geni deputati al controllo del ciclo cellulare. Questi polimorfismi possono alterare l'efficienza di tali sistemi soprattutto se si trovano in domini con un importante significato funzionale e se portano alla sostituzione non conservativa di un amminoacido (Shen et al. 1998).

In un precedente studio caso-controllo sono stati analizzati alcuni polimorfismi noti di undici geni (Tabella 1.11) individuati in base alle loro caratteristiche e alla letteratura:

- otto geni sono coinvolti nei sistemi preposti alla riparazione dei danni al DNA determinati dall'amianto (XRCC1, XRCC3, ERCC2, OGG1, PCNA, ERCC1, APEX e MGMT);
- uno codifica per una selenioproteina, down-regolato nel mesotelioma maligno (SEP15);
- uno codifica per un'N-acetiltransferasi: polimorfismi genetici possono modificare il rischio di cancro relativo all'esposizione ad amine aromatiche ed eterocicliche cancerogene (NAT2); tre polimorfismi in questo gene sono stati associati allo sviluppo di mesotelioma nella popolazione finlandese (*Hirvonen et al 1996*);
- un gene è coinvolto in malattie ad ereditarietà mendeliana associate ad alto rischio di tumori (NBS1).

Tabella 1.11 - Polimorfismi in studio -

GENE [#]	CROMOSOMA	VARIAZIONE NUCLEOTIDICA	VARIAZIONE AMMINOACIDICA
XRCC1 ex. 10	19q13.2	28152 G>A	R399Q
XRCC1 ex. 6	19q13.2	26304 C>T	R194W
XRCC3 ex. 7	14q32.3	18067 C>T	T241M
XRCC3 IVS6 3' splicing	14q32.3	17893 A>G	*
ERCC2 ex. 23	19q13.2-13.3	35931 A>C	K751Q
ERCC2 ex. 10	19q13.2-13.3	23591 G>A	D312N
OGG1 ex. 7	3p26.2	2243 C>G	S326C
NBS1 ex. 5	8q21	607 G>C	E185Q
SEP15 3'UTR	1p31	58073 G>A	*
NAT2 ex. 2	8p22	481 C>T	K161K
NAT2 ex. 2	8p22	590 G>A	R197Q
NAT2 ex. 2	8p22	857 G>A	G286E
PCNA 3' UTR	20p12.3	1183 G>C	*
APEX ex. 5	14q11.2-q12	777 T>G	D148E
ERCC1 ex. 4	19q13.32	524 C>T	N118N
MGMT ex. 3	10q26.3	385 C>T	L84F

* Queste variazioni conducono ad un mRNA instabile

I numeri di accesso in GenBank per i geni sono: XRCC1 L34079; ERCC2 L47234; XRCC3 GSDB:S:1297788; OGG1 NM_002542; NBS1 AF051334; SEP15 AF288992; NAT2 NM_000015; PCNA NM_002592; APEX NM_001641; ERCC1 NM_202001; MGMT NM_002412;

XRCC1 (*X-ray repair cross-complementing group 1*) è un gene coinvolto nel restauro delle rotture del danno al DNA determinate dalle specie reattive dell'ossigeno, dalle radiazioni ionizzanti o dagli agenti alchilanti. XRCC1 possiede tre diversi domini attraverso i quali interagisce con tre diversi enzimi: poli (ADP-ribosio) polimerasi (PARP), DNA ligasi III e DNA polimerasi β ; contiene due domini BRCT: BRCT1 nella regione centrale della proteina e BRCT2 nella regione carbossi-terminale. Questi domini sono altamente conservati nelle proteine nucleari eucariotiche coinvolte nel controllo del ciclo cellulare, nella regolazione genica e nei meccanismi di restauro del DNA.

XRCC1 non ha attività enzimatica propria, ma agisce come proteina scaffold, legando questi 3 enzimi ed avvicinandoli al sito del DNA interessato dal danno.

La proteina XRCC1 interagisce inoltre con chinasi polinucleotidiche e con i prodotti di APE1 e di OGG1 (*Whitehouse et al. 2001, Vidal et al. 2001, Marsin et al. 2003*). Si ritiene che XRCC1 intervenga nel formare il complesso multiproteico deputato al restauro del DNA.

XRCC1 è un intermediario che consente alla DNA ligasi III ed alla DNA polimerasi β di interagire direttamente; infatti attraverso la regione amino-terminale si lega alla polimerasi β , mentre attraverso il dominio BRCT situato nella regione C-terminale si lega con la ligasi III.

PARP è un enzima nucleare coinvolto nel riconoscimento delle rotture nel filamento di DNA. Esso catalizza l'aggiunta di unità di ADP-ribosio dal NAD ad un numero limitato di accettori a formare dei polimeri ramificati, per i quali mostra grande affinità XRCC1, che così viene reclutato (*Schreiber et al. 2002*).

Tre differenti polimorfismi (R194W, R280H e R399Q) a livello di questo gene sono associati ad un'alterata capacità di riparare il danno al DNA e al rischio di insorgenza del cancro (*Zhou et al. 2003*).

Studi recenti hanno evidenziato che il polimorfismo 399Q, situato nel dominio BRCT centrale contenente il sito di legame per PARP, è associato ad una minor efficienza di restauro del DNA, come dimostrato dalla persistenza di addotti (*Matullo et al. 2001b*), dall'aumentata sensibilità alla bleomicina (*Wang et al. 2003*), dall'incremento di glicoforina A mutata a livello delle membrane di eritrociti (*Lunn et al. 1999*).

Lo studio di *Hou et al. 2003* ha evidenziato un'elevata incidenza di cancro al polmone, alla testa e al collo, tra i portatori della variante 399Q.

Tuttavia, altri studi, non hanno evidenziato un'associazione tra la variante XRCC1-399Q e l'aumento dell'incidenza del tumore al polmone (*Ratnasinghe et al. 2001*) e neppure associazione con la presenza di addotti nel DNA (*Matullo et al. 2001 a*).

NAT2 (N-acetyltransferase2) è un gene che codifica per un enzima coinvolto nell'acetilazione delle ammine aromatiche ed eterocicliche. L'acetilazione è uno dei principali processi di detossificazione di farmaci, di agenti chimici e cancerogeni. NAT2 catalizza le reazioni di fase 2 del metabolismo, che comprendono la biotrasformazione delle sostanze tossiche, trasferendo un gruppo acetilico dall'Acetil-CoA alle sostanze cancerogene.

Studi di mutagenesi sito-diretta hanno rilevato la presenza di un amminoacido critico (Cys 68) nel sito catalitico dello stesso enzima che partecipa direttamente nel trasferimento acetile tra l'Acetil-CoA cofattore e il substrato accettore (*Hein et al. 2000*).

NAT2 è localizzato sul cromosoma 8p22, una regione frequentemente caratterizzata da perdita di eterozigotità nei tumori umani. È un gene polimorfico nell'uomo e la presenza di due alleli varianti fa assumere un fenotipo di acetilatore lento, alterando di conseguenza la velocità nel metabolizzare le poliammine.

Individui con entrambi gli alleli varianti a livello di un sito polimorfico assumono un fenotipo acetilatore lento, mentre individui con un allele wild-type e uno variante oppure con entrambi gli alleli wild-type assumono un fenotipo acetilatore rapido.

Le fibre di asbesto sono in grado di indurre l'attività dell'enzima ornitina decarbossilasi coinvolto nella sintesi delle poliammine e nella proliferazione cellulare.

Il rischio di sviluppare malattie polmonari di tipo sia oncologico sia infiammatorio negli individui con NAT2 acetilatore lento è di due volte superiore rispetto agli individui con NAT2 acetilatore rapido (OR= 2.3; 95% CI=1.1-4.7); il rischio di sviluppare mesotelioma maligno per NAT2 acetilatore lento è fino a 4 volte superiore (OR= 3.8; 95% CI= 1.2-14.3) (*Hirvonen et al. 1996*).

I polimorfismi che conferiscono il fenotipo acetilatore lento e associati all'incremento di insorgenza delle patologie polmonari amianto dipendenti sono: M1: K161K (481 C>T); M2: R197Q; M3: G286E; M4: R64Q. Quest'ultimo sembra essere di origine africana, in quanto è stato finora trovato solo nella popolazione afro-americana (*Hein et al. 2000*).

L'associazione riscontrata tra l'insorgenza del mesotelioma da esposizione all'asbesto e NAT2 coinvolge i polimorfismi M1: K161K (481 C>T); M2: R197Q; M3: G286E (*Hirvonen et al. 1995*).

Inoltre, individui con la delezione in omozigosi del gene GSTM1 e un fenotipo acetilatore lento del gene NAT2, esposti ad alti livelli di asbesto, sembrano avere una marcata suscettibilità alle malattie polmonari associate all'amianto (*Hirvonen et al. 1996*).

ERCC1 (Excision repair cross-complementing group 1) codifica per un enzima chiave nel meccanismo di restauro del DNA per escissione di nucleotidi (NER). L'eterodimero ERCC1-XPF agisce come un'endonucleasi, determinando il taglio del filamento a singola elica del DNA

contenente il danno, permettendo quindi la rimozione dello stesso, la polimerizzazione ed infine la ligazione della doppia elica.

Inoltre, il complesso ERCC1-XPF è coinvolto nella via di restauro per ricombinazione omologa.

Una ridotta espressione di ERCC1 è stata associata con un incremento generale di rischio del cancro. I polimorfismi identificati a livello di questo gene 8092 C>A e N148N conducono ad un'alterata capacità di restauro del danno al DNA.

Questi polimorfismi sono stati associati con un aumento dell'incidenza di carcinoma delle cellule squamose della testa e del collo (*Sturgis et al. 2002*), mentre l'associazione con il cancro al polmone risulta essere ancora poco chiara (*Cheng et al. 2000*).

Studi più recenti non hanno dimostrato un'associazione tra i polimorfismi di ERCC1 e il rischio di tumore al polmone (*Zhou et al. 2005*), OR= 1.26 95%CI= 0.81-1.96 per il polimorfismo 8092 C>A (A/A verso C/C) e OR= 0.93 95%CI= 0.67-1.30 per il polimorfismo 524 T>C (C/C verso T/T) coinvolto nel nostro studio.

ERCC2 (excision repair cross-complementing group 2), detto anche XPD, è un gene localizzato sul cromosoma 19q13.2-q13.3. XPD codifica per un'elicasi ATP-dipendente che unendosi al fattore trascrizionale IIH forma il complesso TFIIH, il quale partecipa sia ai meccanismi di riparo del DNA per escissione di nucleotidi (NER, Nucleotide Excision Repair) sia alla trascrizione basale. TFIIH è coinvolto nel processo di trascrizione della RNA polimerasi II. ERCC2 gioca un ruolo fondamentale nel riparo del DNA attraverso l'eliminazione di addotti derivanti da tossine ambientali e xenobiotici. La presenza di polimorfismi a livello del gene può avere effetti sul riparo del DNA, causando tre rare patologie autosomiche recessive: lo xeroderma pigmentosum (XP), la tricotiodistrofia (TTD) e la sindrome di Cockayne (CS) (*King et al. 2005*). Nei pazienti affetti da XP si riscontra una marcata incidenza di tumori (epiteliomi e melanomi) della cute che è l'organo maggiormente bersagliato dalle radiazioni eccitanti della luce solare, fatto questo che è stato associato all'incapacità di riparare il danno al DNA provocato dai raggi ultravioletti delle cellule dell'epidermide.

L'XP è una malattia eterogenea, in quanto è determinata da almeno 8 geni, denominati dalla sigla XP associata ad una lettera. Di qui il nome XPD per ERCC2.

Il polimorfismo K751Q coinvolto nello studio non si trova in nessun dominio elicastico, ma è stato associato ad una maggiore incidenza di tumore al polmone (*Hou et al. 2002*). Altri studi, d'altra parte, non hanno riscontrato alcuna associazione con l'insorgenza del cancro al polmone (*Butkiewicz et al. 2001, David-Beabes et al. 2001*) e con la presenza di addotti nel DNA (*Matullo et al. 2001 a*).

XRCC3 (X-ray repair cross-complementing group 3) partecipa al processo di restauro del DNA e fa parte di un gruppo di proteine collegate a Rad51, che mediante meccanismi di ricombinazione omologa (HRR) sono in grado di conservare la stabilità cromosomica e di intervenire sugli insulti al genoma.

La proteina codificata da XRCC3 esplica la sua azione attraverso la formazione di un eterodimero con Rad51 e mostra un'omologia con Rad51 nel dominio di legame per l'ATP. Infatti, la formazione di questo complesso dipende dall'ATP: l'idrolisi dell'ATP associato ad XRCC3 ed il rilascio di ADP permettono ad XRCC3 di legarsi liberamente a Rad51.

L'effetto biologico di questo eterodimero non è ancora chiaro (*Yamada et al. 2004*).

Il polimorfismo T241M porta alla sostituzione non conservativa di un amminoacido, che non si trova all'interno del dominio di legame dell'ATP, il quale rappresenta l'unico dominio funzionale individuato finora (*Shen et al. 1998*).

È stata comunque riscontrata associazione tra la variante XRCC3-241M e la presenza di addotti nel DNA (*Matullo et al. 2001 b*). Alcuni studi hanno mostrato che potrebbe essere coinvolto nella suscettibilità al cancro al polmone (*Matullo et al. 2001 a*), tuttavia altri non hanno evidenziato associazione con lo stesso tumore (*David-Beabes et al. 2001*).

OGG1 (8-oxoguanine glycosylase I) è un gene coinvolto nel sistema di restauro per escissione di una base (BER), e codifica per una DNA glicosilasi/AP liasi, in grado di rimuovere l'8-idrossiguanina (8-OH-G) dal DNA danneggiato.

L'8-OH-G è la principale forma di danno ossidativo a livello del DNA indotto dai radicali liberi dell'ossigeno (ROS), altamente mutagenico sia in vivo che in vitro.

La presenza di 8-OH-G nel genoma può causare la transversione G:C → T:A, poiché la 8-OH-G è in grado di legarsi stabilmente all'adenina. Per prevenire l'effetto mutageno, in *Escherichia coli* (*E. coli*) sono attivi tre enzimi: MutM, MutY, MutT. Recentemente OGG1 di *Saccharomyces cerevisiae* (*yOGG1*) è stato clonato e si è visto che è omologo a mutM di *E. coli*. In seguito è stato isolato anche l'omologo funzionale umano.

Il gene hOGG1 mappa sul cromosoma 3p26.2, una regione che mostra perdita della eterozigosi (LOH, loss of heterozygosity) in alcuni tumori (*Yokota et al. 1993*). In particolare, nel tumore al polmone si osserva LOH nella regione 3p25-26 (*Hibi et al. 1992; Hosoe et al. 1994*). Questo potrebbe indicare un ruolo di OGG1 come oncosoppressore.

Differenti tipi di polimorfismi genetici sono stati riscontrati nel gene hOGG1, tra questi S326C è presente nel 40% della popolazione europea (*Boiteux et al. 2000*).

Una ridotta funzionalità del gene può portare ad un aumento del rischio di sviluppare cancro a causa di una ridotta efficienza di restauro del danno ossidativo al DNA (*Kohno et al. 1998*).

Alcuni studi hanno osservato che la variante polimorfica (OGG1-326C) potrebbe essere associata ad un incremento della suscettibilità al cancro (*Le Marchand et al. 2002*). È stata valutata l'associazione di questo polimorfismo con il cancro al polmone in uno studio caso-controllo della popolazione hawaiana (298 casi e 405 controlli): il genotipo omozigote C/C è più frequente nei pazienti con tumori polmonari rispetto ai relativi controlli. Lo studio è stato effettuato utilizzando la regressione logistica multivariata dopo aggiustamento per vari fattori di rischio, tra cui il fumo e l'alimentazione ricca di verdure, ed ha riscontrato che il genotipo omozigote C/C presenta un OR pari a 2.1 (CI 95%: 1.2-3.7). Ciò significa che tale genotipo conferisce un rischio di due volte maggiore, rispetto al genotipo normale o eterozigote, di sviluppare il cancro al polmone (*Le Marchand et al. 2002*). D'altra parte il ruolo dei ROS nello sviluppo del cancro polmonare è avvallato dal riscontro di elevati livelli di 8-OH-G nei leucociti di sangue periferico di fumatori e soggetti con cancro polmonare ed anche nel tessuto tumorale. I ROS e gli agenti ossidanti sono abbondantemente rappresentati nel fumo di sigaretta.

Un incremento significativo del rischio per la variante OGG1-326C è stato osservato nelle cellule polmonari di alcuni pazienti con tumore (*Park et al. 2004*).

Sebbene in diversi studi (*Dherin et al. 1999; Janssen et al. 2001*) non sia stata osservata una differenza significativa per quanto riguarda l'attività catalitica delle due varianti (OGG1-326S e OGG1-326C), studi di espressione in batteri (*E. coli*) hanno riscontrato una ridotta attività per la variante OGG1-326C (*Kohno et al. 1998*).

È possibile che il difetto nell'uomo si evidenzi in situazioni di stress ossidativo prolungato quando è maggiore il lavoro richiesto per mantenere l'integrità del genoma.

NBS1 (p95), localizzato sul cromosoma 8q21, è il gene responsabile della sindrome di Nijmegen (NBS Nijmegen Breakage Syndrome), una malattia genetica autosomica recessiva, definita come la variante dell'ataxia teleangectasica (AT). La mutazione di NBS1, nei pazienti NBS, porta all'ipersensibilità alle radiazioni ionizzanti, all'instabilità cromosomica e alla predisposizione al cancro. La proteina codificata da NBS1 (nibrina) mostra un'omologia (29%) con la proteina Xrs2 del lievito (*Saccharomyces cerevisiae*) nella regione N-terminale per quanto riguarda il dominio FHA (forkhead-associated) e il dominio BRCT. Questi domini sono altamente conservati nelle proteine nucleari eucariotiche coinvolte nel controllo del ciclo cellulare, nella regolazione genica e nei meccanismi di restauro del DNA. La proteina nibrina interagisce con hMRE11, attraverso un hMRE11-binding domain presente nella porzione C-terminale, per formare un complesso con

attività nucleasica che interviene nel meccanismo di ricombinazione omologa. Comunque, la funzione specifica della proteina NBS1 non è ancora ben definita, in quanto circa il 70% di NBS1 nella porzione C-terminale non mostra omologia con proteine note. Tutte le mutazioni presenti nei pazienti NBS sono comprese tra il codone 220 e il codone 385 e portano alla formazione di una proteina “tronca” a valle dei domini FHA/BRCT (*Tauchi et al. 2001*). Il polimorfismo E185Q coinvolto in questo studio si trova nel dominio BRCT della proteina.

SEP15 è un gene codificante per una selenioproteina (15 KDa).

Esiste una super famiglia di selenioproteine che include 7 famiglie. In particolare, tra le selenioproteine identificate nei mammiferi sono incluse: quattro glutatione perossidasi, tre tioredossina reduttasi, coinvolte nell'eliminazione delle specie reattive dell'ossigeno e nel mantenimento delle condizioni redox delle cellule, tre iodotironine deiodinasi che partecipano al metabolismo dell'ormone tiroideo, ed infine SelW, SelP, SelT, SelR, SelN e Sep15, le cui funzioni sono ancora sconosciute.

Il selenio è un elemento essenziale nella dieta di tutti gli organismi, compreso l'uomo. La carenza di selenio può interferire con il normale sviluppo embrionale, con la fertilità e può favorire l'insorgenza di alcuni tumori (*Lescure et al. 1999*). Alcuni studi dimostrano che il selenio è un fattore protettivo contro gli effetti cancerogeni di molti composti chimici. Inoltre, può giocare un ruolo importante nella riduzione dell'incidenza di alcuni tumori umani, tra cui il tumore alla prostata, al colon e al polmone (*Kumaraswamy et al. 2000*).

Comunque, il meccanismo attraverso cui esercita questa azione rimane ancora sconosciuto.

La maggior parte delle attività biologiche del selenio sono da attribuire al suo ruolo come costituente delle selenioproteine.

In queste proteine, il selenio si trova sotto forma di amminoacido selenocisteina (Sec) e viene inserito nella catena proteica nascente in corrispondenza del codone UGA nell'mRNA. L'inserimento di questo amminoacido nella proteina richiede la presenza di una sequenza d'inserzione SECIS (selenocysteine insertion sequence) nella regione 3'-UTR.

SECIS è un elemento presente negli mRNA di tutte le proteine contenenti Sec: è costituito da circa 80 nucleotidi disposti a formare un loop interno e un loop apicale.

SEP15 è espresso in molti tessuti umani, soprattutto nella tiroide e nella prostata. È situato sul cromosoma 1p31, una regione che frequentemente mostra LOH nel mesotelioma.

Uno studio recente volto all'identificazione di geni down-regolati in linee cellulari di mesotelioma a confronto con cellule mesoteliali normali, ha osservato che SEP15 era sottoposto a down-regulation nel 60% circa delle linee studiate (*Apostolou et al. 2001*).

La presenza di siti polimorfici nell'elemento SECIS influenza i livelli di sintesi della proteina. Inoltre, è stato osservato che la proteina è espressa ad alti livelli nei tessuti protetti dalla malignità per azione del selenio e a bassi livelli nei tessuti tumorali (*Kumaraswamy et al. 2000*).

Due sono i polimorfismi localizzati nella regione 3' UTR: 811 C>T e 1125 G>A. Quest'ultimo, incluso nel nostro studio, può potenzialmente influenzare l'efficienza dell'inserimento dell'amminoacido selenocisteina (*Apostolou et al. 2004*).

APEX (apurinic/apyrimidic endonuclease) è un gene che codifica per una delle più importanti endonucleasi apuriniche/apirimidiniche coinvolte nel sistema di restauro per escissione di una base (BER). Svolge una duplice funzione: può agire come AP endonucleasi e quindi iniziare il riparo dei siti AP che si generano a livello del DNA sia spontaneamente sia dopo rimozione di basi alchilate ad opera di DNA glicosilasi; oppure agire come 3'-fosfoesterasi e quindi iniziare il riparo di rotture del DNA caratterizzato da 3'-blocking damage il quale si può originare direttamente dall'azione di ROS o indirettamente attraverso la reazione di AP liasi.

Uno studio cinetico ha posto a confronto le due diverse attività di APEX dimostrando che l'attività AP endonucleasica è circa 100 volte più efficiente rispetto all'attività di 3'-fosfoesterasi (*Suh et al. 1997*).

La presenza di polimorfismi a livello del gene APEX è responsabile di una ridotta attività dell'enzima, determinando un possibile ruolo dello stesso nella carcinogenesi umana (*Shinmura et al. 2001*).

Tuttavia alcuni studi sulla popolazione finlandese dimostrano assenza di un'associazione diretta tra il polimorfismo D148E e il tumore al polmone (*Misra et al. 2003*).

MGMT (O6-methylguanine DNA methyltransferase) è un enzima chiave nel meccanismo di restauro del DNA la cui funzione è quella di rimuovere addotti mutageni e citotossici da O6 – guanina a livello del DNA. L'alchilazione del DNA in posizione O6 della guanina è un evento importante nell'insorgenza di mutazioni nel cancro, principalmente dovute alla tendenza dell'O6 metilguanina di appaiarsi con timida durante la replicazione, determinando la transversione G:C->T:A.

La proteina MGMT protegge la cellula da questo tipo di lesione, trasferendo il gruppo alchilico da O6 – guanina ad un residuo di cisteina, presente nel sito attivo dell'enzima, in una reazione che inattiva una molecola di MGMT per ciascuna lesione riparata (*Esteller et al. 2004*). L'abilità della cellula nel restauro del DNA è direttamente correlato al numero di molecole di MGMT presenti nella stessa e alla frequenza di sintesi ex novo dell'enzima.

MGMT è un gene altamente polimorfico nell'uomo: si riconoscono undici SNPs, cinque nel promotore, uno nell'esone 1, due nell'esone 3 ed infine tre nell'esone 5. Il polimorfismo coinvolto nel nostro studio (L84F), localizzato nell'esone 3, non influenza l'espressione della proteina; infatti studi di espressione cellulare dimostrano che i livelli di MGMT sono essenzialmente simili per la proteina wild-type e per la proteina con la variazione amminoacidica (84F) (*Inoue et al. 2000*). hMGMT gioca un ruolo importante nello sviluppo del cancro al polmone; una bassa espressione del gene sembra essere un fattore di rischio per lo stesso tumore e potrebbe essere usato come marcatore della suscettibilità al cancro al polmone (*Lu et al. 2003*).

PCNA (Proliferating cell nuclear antigen) codifica per una proteina multifunzionale coinvolta nella replicazione e nei meccanismi di restauro del DNA per escissione di nucleotidi (NER), per escissione di base (BER) e nel mismatch repair (MMR). Tutti questi meccanismi richiedono l'intervento della DNA polimerasi δ o della DNA polimerasi ϵ nella sintesi del polimero, indicando un ruolo di PCNA nel reclutamento degli enzimi stessi.

Il gene è caratterizzato da differenti polimorfismi (intronici ed esonici), ma l'analisi degli stessi non ha condotto a risultati statisticamente significativi per quanto riguarda la loro eventuale associazione con melanoma, tumore mammario e tumore al polmone (*Ma et al. 2000*).

Tuttavia, l'espressione di PCNA nei soggetti caratterizzati da tumore al polmone risulta down-regolata (*Ding et al. 2001*).

1.12 Gli aspetti genetici del Mesotelioma

Circa l'80% degli individui con MM hanno una storia di esposizione ad amianto, ma solamente una frazione pari al 5-10% degli individui con esposizione elevata sviluppa MM (*Dianzani et al. 2006*).

Questo comportamento suggerisce il ruolo di fattori genetici nell'insorgenza della patologia.

Diverse caratteristiche delle fibre d'asbesto possono essere responsabili dei loro effetti genotossici su certi tipi cellulari. Per esempio, le fibre d'anfibolo hanno un alto contenuto in ferro che può generare, in lunghi periodi di tempo, specie reattive dell'ossigeno (ROS) attraverso reazioni catalizzate dal ferro sulla superficie della fibra che è situata all'interno del polmone. Le ROS possono essere anche generate durante i tentativi di fagocitosi delle lunghe fibre d'asbesto e la distruzione dei macrofagi. Al contrario, le fibre d'asbesto corte possono essere fagocitate con successo ed incorporate nei lisosomi. Questo fenomeno potrebbe spiegare in parte perché le fibre

lunghe e sottili, cioè $> 8\mu\text{m}$ in lunghezza, sono più cancerogene una volta inalate o iniettate nella pleura o nel peritoneo dei roditori.

Utilizzando colture cellulari sono stati dimostrati altri indicatori di danno genetico, come alterazioni cromosomiche, alterazioni della progressione del ciclo cellulare, formazione di cellule aneuploidi o poliploidi e distruzioni dei nuclei da parte delle fibre lunghe (Cuggell et al. 2004).

Molti geni che codificano per enzimi coinvolti nel metabolismo degli agenti tossici o cancerogeni sono polimorfici determinando differenze individuali nel rischio di cancro (Neri et al. 2005).

I polimorfismi genetici più frequenti nel genoma umano sono variazioni di un singolo nucleotide (single nucleotide polymorphism, SNPs) che sono spesso utilizzati come indicatori molecolari utili a predire le variazioni individuali nella risposta a composti esogeni tossici o cancerogeni.

Un polimorfismo a singolo nucleotide è un polimorfismo (cioè una variazione a livello di una sequenza di acidi nucleici) che si presenta tra individui della stessa specie, caratterizzata da una differenza a carico di un unico nucleotide.

Al fine di ricercare i possibili fattori genetici che possono interessare lo sviluppo di una patologia tumorale, una delle possibili strategie è la ricerca di “geni candidati”. La ricerca di geni suscettibili alla malattia può avvenire in due modi: l’approccio di ricerca di una possibile associazione tra un allele e la malattia e l’analisi di linkage che consiste nell’analisi di co-segregazione degli alleli di diversi marcatori all’interno di una famiglia di individui. A causa dei problemi dovuti ai possibili bias dovuti a confondimento, misclassificazione, selezione e di un modello biologico che possa spiegare l’associazione spesso si preferisce utilizzare l’analisi di linkage ma, nel caso del mesotelioma, a causa della rarità della patologia in studio è piuttosto difficile utilizzare questa ultima strategia di analisi.

1.13 Mutazioni genetiche

Per mutazione genetica si intende ogni modificazione stabile nella sequenza nucleotidica di un genoma o più generalmente di materiale genetico (sia DNA che RNA). Una mutazione modifica il genotipo di un individuo e può eventualmente modificarne anche il fenotipo a seconda delle sue caratteristiche e delle interazioni con l’ambiente. Se le mutazioni avvengono in una cellula somatica queste, assieme ai relativi effetti, saranno presenti in tutte le cellule da essa derivate per mitosi; alcune di queste mutazioni possono rendere le cellule maligne e provocare cancro.

Le mutazioni sono gli elementi di base grazie ai quali possono svolgersi i processi evolutivi. Le mutazioni determinano infatti la cosiddetta variabilità genetica, ovvero la condizione per cui gli

organismi differiscono tra loro per uno o più caratteri. Su questa variabilità, tramite la ricombinazione genetica, opera la selezione naturale, la quale promuove le mutazioni favorevoli a scapito di quelle sfavorevoli o addirittura letali.

Le mutazioni possono avvenire spontaneamente o possono essere indotte. Le mutazioni spontanee sono dovute ad anomalie dei processi biologici, quindi a cause endogene. Le cause delle mutazioni indotte, invece, hanno origine all'esterno della cellula. Queste mutazioni sono dovute ad agenti ambientali che entrano nella cellula modificando in modo permanente la struttura del DNA. Tali sostanze, dette mutageni, sono spesso coinvolte nello sviluppo di neoplasie umane.

Gli agenti mutageni vengono solitamente suddivisi in due categorie: mutageni chimici e mutageni fisici. I cancerogeni chimici, rappresentati ad esempio da aflatossine (derivazione fungina), benzene, cadmio, carbone, oltre che da idrocarburi policiclici aromatici, ecc. determinano a livello del DNA degli addotti che, durante il processo di replicazione, si appaiano ad una base errata dando origine a mutazioni puntiformi. I cancerogeni fisici, invece rappresentati fondamentalmente da radiazioni ionizzanti ed UV, portano alla formazione di dimeri pirimidinici (responsabili di distorsioni a livello della doppia elica di DNA e successivo errato appaiamento alla replica).

Alcuni composti chimici che non sono mutageni possono essere modificati e assumere una forma mutagenicamente attiva una volta introdotti nell'organismo. È stato dimostrato che enzimi cellulari quali le ossidasi del *drug metabolizing system* attivano alcuni mutageni.

Essendo la maggior parte delle mutazioni non favorevoli, gli organismi hanno sviluppato diversi meccanismi per la riparazione del DNA dai vari danni che può subire, riducendo in questo modo il tasso di mutazione. Le mutazioni vengono distinte dai genetisti in base alla loro scala di azione: l'alterazione può riguardare un singolo gene, porzioni del genoma o l'intero corredo cromosomico.

Numerosi studi hanno identificato diversi polimorfismi (SNPs) in geni coinvolti nella riparazione del DNA per escissione di una base (BER), per escissione di nucleotidi (NER), per ricombinazione e in geni deputati al controllo del ciclo cellulare. Questi polimorfismi possono alterare l'efficienza di tali sistemi soprattutto se si trovano in domini con un importante significato funzionale e se portano alla sostituzione non conservativa di un amminoacido (*Shen et al. 1998*).

In questo studio caso-controllo sono stati analizzati alcuni polimorfismi, del gene XRCC1, gene coinvolto nel sistema preposto alla riparazione dei danni al DNA determinato dall'amianto.

1.14 Lo studio caso-controllo

Al fine di valutare l'associazione tra la frequenza di malattia e il gene di interesse si è utilizzato lo studio caso-controllo su base di popolazione i cui casi e controlli sono stati valutati sia per l'esposizione ad amianto che per la presenza degli SNPs.

In tale tipologia di studio, la frequenza dei differenti genotipi viene confrontata tra i soggetti con la patologia in studio (casi) e i soggetti liberi da malattia (controlli).

Gli studi caso-controllo sono anche particolarmente utili al fine di analizzare una serie di fattori genetici, ma nel disegno dello studio è utile considerare i differenti possibili bias. Di seguito verranno analizzate alcune delle caratteristiche che dovrebbe avere uno studio caso-controllo utilizzato in ambito genetico.

L'evidenza statistica di associazione tra un allele e un determinato fenotipo può essere determinato da tre differenti situazioni: in primo luogo l'allele stesso può determinare direttamente l'espressione di un fenotipo, l'allele può essere in linkage disequilibrium con un altro, l'associazione può essere di tipo casuale. Alcuni dei vantaggi nell'uso dello studio caso-controllo negli studi di associazione rispetto agli studi famigliari sono i seguenti:

- I casi e i controlli sono di più facile arruolamento;
- Possono essere studiate patologie a tarda insorgenza;
- Possono essere utilizzati campioni sufficientemente grandi

I controlli dovrebbero essere scelti in modo tale da rappresentare in modo opportuno gli individui non affetti da una particolare patologia nella popolazione di riferimento. È particolarmente importante che i controlli siano etnicamente simili ai casi al fine di ovviare a problemi di "population stratification". Se i gruppi sono caratterizzati da differenti frequenze alleliche, è possibile che una variante possa avere differenti frequenze nei casi e nei controlli a causa di motivazioni differenti da un'eventuale associazione con la patologia (*Cardon et al. 2003*).

Nel disegno e nell'analisi degli studi caso-controllo è importante considerare i fattori che possono essere eventuali confondenti come ad esempio l'etnia come accennato precedentemente. È quindi importante cercare di minimizzare i fattori di confondimento scegliendo gruppi da confrontare provenienti dalla stessa popolazione.

È necessario tenere conto anche degli effetti della misclassificazione differenziale e non differenziale sulla misura di associazione tra i fattori di rischio e la patologia. Durante il processo di assegnazione del genotipo è possibile riconoscere la presenza di un'eventuale misclassificazione. Se

la misclassificazione è non differenziale (ossia non differente tra casi e controlli), si sottostima l'associazione tra patologia e genotipo; se invece l'assegnazione del genotipo è differenziale (ossia l'accuratezza varia tra casi e controlli) può risultare un'associazione spuria.

Nel caso di alleli polimorfici strettamente concatenati, può risultare una misclassificazione genotipica a causa del linkage disequilibrium.

Il linkage disequilibrium (LD) indica l'associazione non casuale tra specifici alleli relativi a due o più loci, a livello dello stesso gene, che costituiscono di solito un particolare aplotipo ancestrale, diffuso nella popolazione in cui è rilevato perché trasmesso lungo la discendenza da un comune progenitore. Per questo motivo il linkage disequilibrium è maggiore in popolazioni omogenee, cioè originate da un nucleo di individui fondatori come le popolazioni sarda o finlandese.

Il linkage disequilibrium è un'importante strumento per individuare regioni cromosomiche di limitata ampiezza in cui si collocano i geni per una data malattia e si avvale dell'analisi molecolare di varianti alleliche (per lo più di SNPs) che costituiscono aplotipi in pazienti tra loro apparentemente non imparentati. Infatti è prevedibile che pazienti che hanno ereditato lo stesso segmento cromosomico, definito dal medesimo aplotipo, abbiano ereditato anche la stessa mutazione in esso contenuto.

Quando il marker allelico misurato è concatenato con il vero allele di suscettibilità di malattia ed è in linkage disequilibrium, è possibile utilizzare il marker come proxy del vero allele di malattia. Quando c'è un linkage completo (ossia nessun evento di ricombinazione) il marker allelico e il gene di suscettibilità della malattia sono associati e quindi non sarà presente misclassificazione genotipica.

È inoltre importante la valutazione della presenza dell'equilibrio di Hardy-Weinberg.

La presenza di equilibrio di Hardy-Weinberg indica che le frequenze genotipiche possono essere determinate direttamente dalle frequenze alleliche, e, nel caso in cui non si verificasse, ciò potrebbe indicare errori di genotipizzazione oppure problemi di population stratification.

Capitolo 2

Scopo del lavoro

Il presente lavoro si basa su uno studio caso-controllo sul MM su base di popolazione condotto nell'area dell'ASL 21, a cui appartiene il territorio di Casale Monferrato, dove dal 1907 al 1986 è stata attiva la più grande industria italiana del cemento-amianto.

I casi ed i controlli sono stati valutati sia per l'esposizione ad amianto sia per la presenza di dodici polimorfismi del gene XRCC1, implicato nel restauro dei danni ossidativi causati dalla presenza delle fibre di amianto. I casi di MM, residenti alla diagnosi nell'ASL 21 (Casale Monferrato e Valenza), sono stati istologicamente confermati nel periodo 1.1.2001-31.12.2006.

I casi sono stati rilevati presso i Servizi di Anatomia Patologica, pneumologia, oncologia, medicina, chirurgia toracica e radioterapia. La diagnosi è stata definita su prelievo ottenuto durante biopsia in pleuroscopia o a seguito di intervento chirurgico.

Le informazioni circa l'eventuale esposizione ad asbesto e ad altri fattori di interesse sono state ottenute tramite l'intervista al soggetto.

Tutti i soggetti sono stati caratterizzati per la loro esposizione occupazionale o ambientale all'asbesto (esposizione certa, esposizione probabile, esposizione possibile, esposizione domestica, esposizione ambientale e no evidente esposizione) con il contributo di un igienista industriale.

Lo scopo dello studio è stato valutare l'associazione tra insorgenza di MM della pleura e alcuni polimorfismi di uno dei geni facenti parte del sistema di restauro del DNA attivato dal danno ossidativo. La riduzione della capacità dell'organismo di rispondere al danno ossidativo causato dalla presenza delle fibre di amianto, per via di un sistema di riparo non perfettamente funzionante determina la conseguente comparsa di mutazioni e inizio del processo di carcinogenesi. Lo scopo del nostro lavoro è stato quello di valutare il ruolo di specifici polimorfismi di geni che codificano per proteine coinvolte nel processo di restauro del DNA danneggiato, nello sviluppo di mesotelioma maligno, in una popolazione esposta ad alti livelli di un noto fattore genotossico, quale l'amianto.

L'obiettivo è stato quello di verificare se i soggetti esposti all'amianto con mesotelioma abbiano dei sistemi di restauro del DNA meno efficienti rispetto a soggetti esposti, ma non ammalati. In questo caso le mutazioni indotte dall'amianto non verrebbero corrette, determinando l'insorgenza del tumore pleurico. Questo studio ha portato anche alla creazione di un protocollo per uno studio caso-controllo ospedaliero.

Capitolo 3

Descrizione Protocolli

Ed

Illustrazione dei Principi Scientifici e Tecnologici

“XRCCI and ERCCI variants modify malignant mesothelioma risk: A case-control study”

3.1 Disegno dello studio

È stato condotto uno studio caso-controllo di popolazione sul mesotelioma maligno della pleura, nell'area dell'ex-ASL 21 (territorio di Casale Monferrato e Valenza) giustificato dalla presenza a Casale Monferrato dello stabilimento Eternit, il maggiore produttore di manufatti in cemento-amianto in Italia (*Magnani et al. 2007*).

Lo stabilimento della ditta “Eternit” di Casale Monferrato, si estendeva su un'area di circa 94.000 m² di cui 50.000 circa coperti (con lastre di fibrocemento). È stato in funzione dal 1907 al 1986, producendo lastre piane ed ondulate, tubi per canne fumarie e tubi per condutture ad alta pressione in cemento-amianto.

La fabbrica utilizzava sia crisotilo sia crocidolite di diverse provenienze. La ditta ha riferito che nel 1981 sono state utilizzate complessivamente 15000 tonnellate di amianto: la crocidolite rappresentava circa il 10% dell'amianto totale e veniva prevalentemente impiegata nella fabbricazione dei tubi ad alta pressione, che corrispondevano nello stesso periodo al 20% della produzione.

La concentrazione ambientale di amianto è stata valutata solo nel 1984 prima della chiusura dello stabilimento e in tempi successivi, ma non durante i periodi di maggiore attività della fabbrica. I dati a disposizione sulla concentrazione ambientale delle fibre di amianto a Casale hanno evidenziato un elevato livello di esposizione ambientale (*Chiappino et al. 1991; Marconi et al. 1989*).

L'area di Casale Monferrato è stata interessata da numerosi studi.

Un primo studio riguardante la coorte dei dipendenti Eternit di Casale Monferrato (*Magnani et al. 2007*) ha evidenziato un incremento della mortalità per tumore polmonare pleurico, peritoneale e per asbestosi e per le donne un aumento della mortalità per tumore dell'ovaio e dell'utero.

Un secondo studio riguardante la coorte delle mogli dei dipendenti dello stabilimento Eternit (*Ferrante et al. 2007*) con esposizione indiretta ad amianto derivante dal contatto con le tute da lavoro dei mariti, ha rilevato un aumento della mortalità per tumore pleurico.

Uno studio caso-controllo condotto nell'area dell'ex-ASL 21 (*Magnani et al. 2001*) ha evidenziato un aumento del rischio tra i residenti a Casale Monferrato la cui abitazione si trovava in prossimità dello stabilimento Eternit.

Di recente è stato pubblicato uno studio sulla valutazione spaziale del rischio di patologia nell'area di Casale Monferrato (*Maule et al. 2007*).

La rilevazione dei casi di MM è avvenuta presso i Presidi Ospedalieri dell'ex-A.S.L. 21, le Cliniche private nello stesso territorio e Ospedali di rilievo per la diagnosi e la terapia del mesotelioma in Piemonte ed in altre Regioni.

I casi di MM, incidenti nel periodo 1.1.2001-31.12.2006, residenti alla diagnosi nell'ex-ASL 21 (Casale Monferrato e Valenza), sono stati istologicamente confermati. I casi sono stati rilevati presso i Servizi di Anatomia Patologica, pneumologia, oncologia, medicina, chirurgia toracica e radioterapia. La diagnosi è stata definita su prelievo ottenuto durante biopsia in pleuroscopia o a seguito di intervento chirurgico.

Per verificare l'eshaustività della rilevazione dei casi sono state controllate le Schede di Dimissione Ospedaliera della Regione Piemonte.

I controlli sono un campione casuale della popolazione residente nell'ex-ASL 21, appaiati ai casi per sesso e data di nascita (+/- 18 mesi).

Per ridurre la variabilità all'interno delle classi più giovani, il rapporto di proporzionalità è stato di 2 controlli per caso per i soggetti con età superiore ai 60 anni e di 4 controlli per caso per i soggetti con età inferiore ai 60 anni. I rifiuti non sono stati sostituiti.

A tutti i casi e i controlli è stato assegnato uno specifico numero identificativo.

Le procedure di campionamento sono state effettuate dal Servizio di Statistica Medica dell'Università degli Studi del Piemonte Orientale "Amedeo Avogadro" di Novara.

Sia i casi che i controlli sono stati sottoposti ad un'intervista, in modo diretto o indiretto attraverso il familiare più prossimo, previo consenso informato da parte del soggetto interessato.

È stato utilizzato un questionario standardizzato comprendente approfondite sezioni riguardanti caratteristiche demografiche, storia occupazionale e residenziale, attività del tempo libero, storia clinica del soggetto e breve anamnesi lavorativa dei famigliari conviventi (*Magnani et al. 2001*).

Le informazioni circa l'eventuale esposizione ad asbesto e ad altri fattori di interesse sono state ottenute tramite l'intervista al soggetto.

Tutti i soggetti sono stati caratterizzati per la loro esposizione occupazionale o ambientale all'asbesto (esposizione certa, esposizione probabile, esposizione possibile, esposizione domestica, esposizione ambientale e no evidente esposizione) con il contributo di un igienista industriale.

Per esposizione professionale si intende l'esposizione derivante dal fatto di aver svolto un'attività lavorativa implicante l'uso/esposizione ad amianto o a materiali contenenti amianto. Per esposizione domestica si intende il fatto di aver convissuto con soggetti esposti professionalmente ad amianto (*Ferrante et al. 2007*). Per esposizione ambientale si intende un tipo di esposizione in cui i soggetti hanno vissuto in vicinanza di insediamenti produttivi che lavoravano o utilizzavano amianto o materiali contenenti amianto.

Nelle analisi statistiche non si sono effettuate distinzioni per tipologia di esposizione ma è stata considerata la classificazione di soggetto "esposto" (soggetto caratterizzato da almeno una tipologia di esposizione) e di soggetto "non esposto" (non è stato attribuito alcun tipo di esposizione sulla base delle informazioni ricavate dal questionario sottoposto).

3.1.1 Descrizione del campione di Casale Monferrato

Le analisi statistiche sono state condotte sui soggetti che hanno accettato di fornire un campione di sangue: 151 casi (rispondenza pari a 57% del totale dei casi) e 252 controlli (rispondenza pari a 46% del totale dei controlli).

I soggetti classificati come esposti all'asbesto sono stati 131 casi e 194 controlli (per 18 soggetti non è stato possibile attribuire l'esposizione).

Nella tabella sottostante (*Tabella 3.1.1*) è stata descritta la composizione del campione in studio.

	Casi	%	Controlli	%
Sesso				
Maschi	102	68%	173	69%
Femmine	49	32%	79	31%
Totale	151	100%	252	100%
Età (media ±DevStd)	66.8 ±11.5		61.7±11.1	
Tipologia esposizione				
Occupazionale	71	47%	111	44%
Domestica	26	17%	24	10%
Ambientale	34	23%	59	23%
Non esposto	2	1%	58	23%
Non valutabile	18	12%	0	--
Totale	151	100%	252	100%

Tabella 3.1.2 - Descrizione del campione -

I maschi costituiscono circa il 68% dei casi e il 69% dei controlli. L'età media è di circa 67 anni per i casi e 62 anni per i controlli. La maggiore parte dei soggetti, inclusi nell'analisi, presenta un'esposizione di tipo occupazionale ad amianto (47% dei casi e 44% dei controlli). L'esposizione ambientale riguarda il 23% dei casi e il 23% dei controlli. Solo 2 sono i casi non esposti. Per il 12% dei casi non è stato possibile determinare la tipologia di esposizione in quanto l'intervista non era disponibile. Il 71% dei casi e il 31% dei controlli risiedeva a Casale Monferrato (*Dati non mostrati in tabella*).

I campioni di sangue sono stati archiviati sottovuoto con EDTA e archiviate a -20°C.

Tutti i partecipanti erano caucasici con le stesse origini etniche, valutati attraverso il luogo di nascita.

3.1.2 Descrizione del campione di Torino

È stato anche condotto uno studio caso-controllo ospedaliero sul Mesotelioma Pleurico (MP) nella zona di Torino. Il gruppo di casi includeva soggetti con diagnosi confermata istologicamente di MP, ammessi alla unità chirurgia toracica degli ospedali del San Giovanni Battista (Torino) o del San Luigi Gonzaga (Orbassano) tra gennaio 2004 e ottobre 2008. Al momento della diagnosi tutti i casi

erano residenti a Torino o in provincia di Torino. Dopo l'identificazione del caso, il controllo è stato scelto tra pazienti ricoverati all'interno dell'ospedale stesso (per lo più in medicina generale o unità urologia) del caso corrispondente, e doveva risiedere a Torino o nella provincia di Torino al momento dell'ammissione e non dovevano essere affetti da condizioni neoplastiche o respiratorie. Tutti i soggetti di studio erano caucasici. I pazienti ed i controlli sono stati intervistati utilizzando lo stesso questionario. L'esposizione all'amianto è stata valutata come per il gruppo Casale. Tutti i soggetti dello studio hanno firmato il modulo del consenso informato. Campioni di sangue sono stati raccolti e conservati come riportato precedentemente.

Lo studio ha coinvolto 69 MP pazienti e 44 controlli.

3.1.3 *Analisi genetiche*

L'analisi degli SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*) è stata effettuata a partire da campioni di sangue periferico (10 ml) in EDTA, raccolti tra i casi ed i controlli dello studio condotto, e inviati presso il Dipartimento di Scienze Della Salute di Novara. È stata effettuata l'estrazione di DNA da sangue periferico, la quantificazione del DNA, l'elettroforesi su gel d'agarosio e l'amplificazione mediante PCR (*Polymerase Chain Reaction*) seguita dalla purificazione del prodotto di PCR.

Gli SNPs sono stati scelti perché alcuni hanno un effetto significativo sulla trascrizione (es.: sostituzione amminoacidica) e sono stati associati con alcuni tipi di cancro e / o difetto nella riparazione del DNA.

La nostra ipotesi di lavoro è che la presenza di varianti polimorfiche potrebbero ridurre l'efficienza della riparazione dei danni al DNA. Il danno al DNA non riparato causato da esposizione all'amianto comporterebbe mutagenesi e cancro.

Il gene SEP15 (uno SNP) è stato analizzato in quanto codifica per la selenoproteina che risulta inibita per il 60% nelle linee cellulari MPM. Inoltre, abbiamo valutato due geni (due SNPs) che partecipano al controllo dello stato redox cellulare (SOD2, GPX1). In questo caso, la nostra ipotesi di lavoro era che una protezione ridotta da ROS potrebbe predisporre cellule mesoteliali alla trasformazione neoplastica.

Il nostro studio ha incluso anche il gene OPN (tre SNPs) che codifica una citochina infiammatoria, poiché una maggiore suscettibilità ad infiammazione potrebbe essere un fattore di rischio per il mesotelioma. Alti livelli di plasma OPN sono stati considerati un marker di MP.

Per le analisi dell'aplotipo abbiamo studiato nove SNPs in XRCC1 e sei SNPs in ERCC1-RAI che sono stati segnalati come Tag-SNPs da Haploview v4.1.

3.1.4 *Analisi degli SNP e controllo qualità*

Il DNA genomico è stato isolato e purificato dai linfociti di sangue periferico usando: QIAamp ® DNA Maxi Kit (QIAGEN). Sono stati utilizzati diversi approcci per l'analisi dei genotipi degli SNP coinvolti nello studio.

La maggior parte dei polimorfismi (rs1799782, rs3213247, rs12973352, rs2854496, 2307174, rs2023614, rs1799778, rs3213356, rs3213371, rs3213403, rs1799796, rs1799793, rs11615, rs2298881, rs3212948, rs3212965, rs3136820, rs12917, rs3626, rs10412761, rs4803817, rs6966) sono stati genotipizzati con la PCR basata su fluorescenza, (TaqMan ® master Mix, Applied Biosystems), (*Livak et al. 1999*). Questa tecnica è stata eseguita presso il Laboratorio del Dr. G. Matullo a Torino.

Gli altri polimorfismi (rs25487, rs3213245, rs861539, rs13181, rs1052133, rs1805794, rs101028, rs7687316, rs45594140, rs9138, rs1799725, rs1050450, rs1136410) sono stati genotipizzati con il saggio SNaPshot (SNaPshot ® Kit Multiplex, Applied Biosystems), che utilizza tecnica multiplex con primer d'estensione e di diversa lunghezza per analizzare contemporaneamente fino a otto / dieci SNP.

Per ogni SNP, i campioni con i tre genotipi: omozigoti per la sequenza wild-type, eterozigoti e omozigoti per la sequenza più rara, sono stati direttamente sequenziati e utilizzati come controllo interno in ciascuna analisi.

La concordanza è stata del 100% per tutti i confronti.

3.1.5 *Sequenziamento*

Abbiamo sequenziato i diciassette esoni e esone-introne confinante con XRCC1 in 10 wild-type omozigoti, 10 eterozigoti ed in 10 varianti omozigote per SNP R399Q utilizzando ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

3.1.6 *Analisi degli aplotipi*

Utilizzando Haploview v4.1 e la HapMap dei dati dei genotipi, sono stati identificati nove differenti SNPs come XRCC1 tag-SNP e sei differenti SNPs come ERCC1-RAI tag-SNP.

Gli aplotipi di XRCC1 e ERCC1-RAI sono stati individuati dalla Piattaforma software SHEsis. La frequenza degli aplotipi e la corrispondente deviazione standard è stata ottenuta dai dati genotipici di ciascun polimorfismo con fase genetica sconosciuta. Le analisi sono state effettuate utilizzando il Pacchetto software HAPLO.STATS sviluppato utilizzando il linguaggio R.

Gli Odds ratio (OR) e gli intervalli di confidenza al 95% (95% IC) sono stati calcolati dopo aver stimato il numero di pazienti e controlli per ciascun aplotipo, considerando l'aplotipo più frequente come riferimento. Queste analisi sono state condotte sia nel campione complessivo sia nel sottogruppo di soggetti con esposizione all'amianto. Tutte le analisi sono state aggiustate per età e sesso.

3.1.7 Espressione di XRCC1

Settantuno campioni di pleura normale sono stati ottenuti da donatori che sono stati sottoposti a toracosopia per una diversa condizione da MPM e dopo aver firmato un consenso informato.

L'RNA totale è stato estratto da pezzi di pleure congelate, tramite RNeasy® Plus Mini Kit (Qiagen) secondo le istruzioni (protocollo) del produttore.

cDNA è stato retrotrascritto da 500 ng di RNA totale usando usando primer casuali (High Capacity cDNA kit di trascrizione inversa, Applied Biosystems).

I livelli di mRNA sono stati misurati mediante PCR quantitativa in tempo reale (qPCR).

La quantificazione relativa dell'espressione genica per XRCC1, usando il gene UBC come normalizzatore, è stata effettuata in triplicato, con chimica TaqMan usando ABI Prism 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems). Primer e sonde utilizzati per quantificare i trascritti di XRCC1 e UBC erano saggi Taqman di espressione genica, (Applied Biosystems).

Dopo una denaturazione iniziale a 95°C per 10 minuti, la reazione procede con 40 cicli di 95°C per 15 s e 60°C per 1 min. Per valutare la variazione tra esperimenti, un cDNA standard è stato incluso in ciascuna piastra. Le analisi sono state condotte utilizzando il metodo comparativo CT. Il ciclo soglia (CT), è definito come il numero di cicli richiesti perché il segnale fluorescente possa attraversare la soglia (superi il livello di fondo). I Livelli di CT sono inversamente proporzionali alla quantità di mRNA nel campione (ossia è basso il valore del CT maggiore è la quantità di mRNA nel campione).

Il Livello CT è stato determinato per ciascun gene e la relativa espressione di XRCC1 è stata poi stimato calcolando il valore dCT, definito come la differenza tra il valore CT per il gene bersaglio (XRCC1) e il gene di riferimento (UBC).

3.1.8 Analisi statistica

L'Odd Ratio e l'intervallo di confidenza al 95% sono stati calcolati per ogni genotipo rispetto al gruppo di riferimento, che è l'omozigote per l'allele più frequente tra i controlli. Ogni SNP è stato considerato in analisi separate sia come variabile categorica (es. wild-type omozigoti, eterozigoti ed omozigoti varianti) e come variabile continua (numero di alleli mutati). I genotipi sono stati divisi in due categorie (rischio e non rischio) sulla base della letteratura (cioè conoscenza preliminare del significato funzionale delle varianti e delle evidenze epidemiologiche esistenti) e dei nostri dati.

Le analisi sono state effettuate su tutti i soggetti e sul sottogruppo di soggetti esposti all'amianto.

Tutte le analisi sono state corrette per età, sesso e l'esposizione all'amianto per il campione totale, e per età e sesso per i soggetti esposti all'amianto. Le analisi sono stati eseguite con SAS v.8.01 e il software SNPassoc, pacchetto sviluppato con linguaggio R.

Al fine di valutare l'associazione tra un singolo SNP e la patologia (MM) è stato utilizzato un modello di regressione logistico. La regressione logistica è un caso particolare di modello lineare generalizzato avente come funzione link la funzione logit. Si tratta di un modello di regressione applicato nei casi in cui la variabile dipendente y sia di tipo dicotomico.

Al fine di valutare la significatività statistica di un singolo SNP si confronta il modello con il singolo SNP con il modello contenente la sola intercetta utilizzando *il likelihood ratio test* (LRT).

$$\text{LRT} = (2\log\text{Lik}_{\text{null}} - 2\log\text{Lik}_{\text{other}})$$

Per $\log\text{Lik}_{\text{other}}$ indichiamo il log Likelihood del modello che include il singolo SNP.

Un altro criterio per discriminare tra i diversi modelli è *l'Akaike information criterion* (AIC) che può essere utilizzato per discriminare tra i diversi modelli di ereditarietà (codominante, dominante o recessivo). L'AIC consente di confrontare anche modelli non gerarchici.

$$\text{AIC} = -2\log\text{Lik} + 2q$$

dove q è il numero dei parametri

Il "miglior" modello è quello con valore di AIC più basso.

L'analisi statistica è stata quindi condotta prima su tutti i soggetti (403) ed in seguito solo sui soggetti esposti ad asbesto (325) utilizzando la regressione logistica multivariata aggiustando per età, sesso e presenza di esposizione. Per i modelli che includono solo i soggetti esposti è stato effettuato un aggiustamento per età e sesso. Ogni polimorfismo è stato analizzato sia come variabile categorica (omozigote wild type, eterozigote e omozigote variante), sia come variabile continua, al fine di valutare il trend del rischio di malattia con l'aumento del numero di alleli varianti.

Al fine di valutare la forza dell'associazione tra genotipo e insorgenza di patologia è stato calcolato l'Odds ratio (OR) e il relativo intervallo di confidenza (95%).

Nelle analisi si sono considerati tre diversi modelli di ereditarietà: il modello codominante, il modello dominante e il modello recessivo.

Nel modello codominante la classe di riferimento sono gli omozigoti per l'allele più frequente e si calcolano gli OR degli eterozigoti e degli omozigoti per l'allele variante; nel modello dominante la classe di riferimento comprende gli omozigoti per l'allele più frequente e si calcola l'odds ratio dei portatori dell'allele variante sommando eterozigoti e omozigoti per l'allele variante; nel modello recessivo la classe di riferimento è costituita dalla somma degli eterozigoti e degli omozigoti per l'allele più frequente e si calcola l'OR degli omozigoti per l'allele variante.

L'elevata probabilità che un valore di associazione inizialmente significativo, tra uno SNP e la patologia, possa invece essere il frutto di un risultato falso-positivo, anche in studi ben disegnati, è uno dei problemi da tenere in considerazione (*Wacholder et al. 2004*) e recentemente applicato da *Hung et al. 2005*. La probabilità di assenza di associazione dato un risultato significativo è chiamata *false positive report probability* (FPRP). Tale metodo richiede la stima della probabilità a priori che specifici SNPs siano associati alla patologia in studio.

L'approccio del FPRP è un approccio di tipo Bayesiano che integra ciò che è stato osservato e la probabilità che un'eventuale associazione rilevata sia una vera associazione. Una delle limitazioni nell'applicazione di tale approccio è l'assegnazione della probabilità a priori, ma in questo modo il ricercatore deve valutare quali siano le evidenze già esistenti prima di analizzare i risultati ottenuti.

La probabilità a priori che l'associazione tra una variante genetica e una malattia sia reale è fortemente influenzata dalle conoscenze sulla funzione biologica del gene, dal significato funzionale delle variazioni e dalle evidenze epidemiologiche. Si tratta di una variabile soggettiva, il cui range varia dal 50% (probabilità appropriata quando c'è una forte potenza biologica ed una consistente evidenza epidemiologica), allo 0,1% (quando sia le conoscenze biologiche sia quelle epidemiologiche sono inadeguate).

La valutazione della veridicità dell'associazione tra una variante genetica e la patologia dipende sia dalla probabilità a priori che dalla potenza statistica oltre che dal valore di p-value.

Il fatto di utilizzare il valore di FPRP aiuta il ricercatore a non considerare un risultato solo nei termini di “statisticamente significativo” o “non statisticamente significativo” sulla base del valore di significatività fissato α ma di valutare se la probabilità a priori sia sufficiente da giustificare un'eventuale conduzione dello studio.

3.1.9 Descrizione degli applicativi statistici applicati allo studio genetico

Le analisi statistiche sono state condotte utilizzando il programma **SAS** v.8.01 e il pacchetto applicativo specifico **SNPassoc**, del software R, (Gonzalez et al. 2007).

Il pacchetto SAS è stato utilizzato per la fase di preparazione dei dati per la conduzione delle specifiche analisi genetiche.

SNPassoc è un pacchetto R utile ad analizzare gli studi di associazione. Il formato dei dati utile per l'elaborazione è un formato testo dove ogni colonna indica gli SNP che si intendono analizzare e ulteriori variabili che intendiamo considerare nell'analisi.

Di seguito si riporta una descrizione analitica delle principali funzioni disponibili:

1. La funzione *SNP* è utile per definire quali sono le variabili relative agli SNPs analizzati. Gli oggetti della classe *SNP* possono essere analizzati tramite le funzioni *summary* (che restituisce una descrizione dei genotipi e il test relativo all'equilibrio di Hardy Weinberg) e *plot* (per la costruzione di grafici). Tramite il comando *reorder* è possibile modificare il genotipo da utilizzare come riferimento.
2. Per valutare l'associazione tra un singolo SNP e la patologia è possibile utilizzare la funzione *association*. Per default l'applicativo calcola tale associazione sotto l'ipotesi di differenti modelli di ereditarietà: codominante, recessivo, dominante. Attraverso tale funzione è inoltre possibile effettuare un'analisi in cui si costruisce un modello aggiustato anche per alcune covariate.
3. È possibile effettuare l'analisi di più SNPs contemporaneamente attraverso la funzione *WGassociation* utilizzando la correzione di Bonferroni al fine di ottenere i valori di p-value aggiustati per i confronti multipli.

4. L'interazione tra più geni è possibile determinarla attraverso la funzione *interactionPval*.

Per l'analisi degli aplotipi è stato utilizzato il pacchetto "Haplo Stats" del software R.

Attraverso tale analisi ci si propone di valutare, non il solo il singolo polimorfismo, ma eventuali combinazioni alleliche che potrebbero contribuire al rischio d'insorgenza del mesotelioma maligno pleurico, nella popolazione in studio.

L'analisi degli aplotipi è stata effettuata aggiustando i valori sia per età che per sesso.

§§§§§§§§

"Pooled analysis of NAT2 genotypes as risk factors for asbestos-related malignant mesothelioma"

3.2.1 Pazienti e metodi di studio della popolazione

Lo studio di Casale Monferrato è uno studio caso-controllo di popolazione sul MM della pleura, ed è stato condotto all'interno dell'Azienda Sanitaria Locale (ASL) di Casale Monferrato per valutare il rischio associato all'esposizione all'amianto con polimorfismi genetici. La relazione tra ambiente e MM è associata alla presenza della fabbrica di cemento amianto, "Eternit", attivo a Casale dal 1907 al 1986 (*Magnani et al., 2000, 2001, 2007*). Questo studio ha coinvolto i casi di MM istologicamente diagnosticato durante il periodo di studio (da gennaio 2001 a dicembre 2005), residenti in Casale Monferrato. Le analisi cliniche effettuate sono state quelle istologiche di routine e le analisi immunologiche. I dettagli dello studio sono stati riportati altrove (*Dianzani et al., 2006*). In breve, i controlli sono stati campionati in modo casuale dalla popolazione locale da una lista reperibile alla ASL di Casale Monferrato ed include tutti i residenti nell'area interessata. I casi sono stati appaiati con i controlli confrontando sesso ed età (+/- 1 anno). Sono stati utilizzati allo scopo di intensificare gli studi per le fasce di età in cui l'incidenza del mesotelioma è inferiore, due campionamenti: per ogni caso con più di 60 anni venivano appaiati due controlli o quattro controlli, per i casi con età inferiore ai 60 anni.

Sia i casi che i controlli sono stati sottoposti ad un'intervista previa firma del consenso informato. I campioni di sangue sono stati rilasciati da 133 casi e 182 controlli.

Le informazioni relative all'esposizione ad amianto, sono state valutate alla cieca da un igienista industriale (Dr.Mirabelli) e riassunte come segue: esposizione certa, esposizione probabile, esposizione possibile, esposizione domestica, esposizione ambientale e no evidente esposizione.

Nello specifico per le analisi statistiche l'esposizione è stata suddivisa tra esposti e non esposti.

3.2.2 Studio sulla popolazione: i soggetti Liguri

La casistica della Liguria è stata caratterizzata da casi incidenti reclutati nei reparti di pneumologia dei principali ospedali della Liguria. L'incidenza di MM è particolarmente elevata per l'utilizzo di amianto, nell'attività navale, (*Gennaro et al., 2005*).

I controlli di popolazione sono soggetti sani (donatori di sangue, o partecipanti ad associazioni ricreative), mentre i controlli ospedalieri non dovevano essere affetti da condizioni neoplastiche o in condizione di scarsità respiratoria (principalmente malattie traumatiche o dell'occhio). In aggiunta pazienti con condizioni respiratorie per lo più croniche (COPB) o con asbestosi sono stati rilevati, ma non inclusi nel presente studio.

I soggetti sono stati reclutati dopo la firma di un consenso informato.

È stato somministrato dal personale addestrato un questionario che includeva i dati socio demografici, storia residenziale, attuale e passate occupazioni o hobby, nella quale ogni soggetto sia stato a contatto con l'amianto, stile di vita (comportamento con il fumo e la dieta), cartella medica personale e storia medica familiare sul cancro nei parenti di primo grado. I questionari sono stati processati e i dati validati sono stati registrati in un database.

Lo studio include 199 casi e 80 controlli.

Il numero complessivo dei soggetti reclutati al gennaio 2008 è di 1600 (comprensivi di 210 MM e 440 soggetti con cancro ai polmoni). La banca comprendeva un totale di 10.055 aliquote di campioni di sangue.

3.2.3 Analisi dei genotipi: soggetti di Casale Monferrato

I campioni di sangue (6 ml) sono stati raccolti all'interno provette con EDTA e conservati a -20°C. Il DNA genomico è stato estratto da sangue periferico linfocitario, utilizzando QIAamp DNA Blood maxi kit (QIAGEN).

Un frammento di 559 bp del gene NAT2 è stato amplificato tramite PCR. La reazione della PCR è stata realizzata in un volume complessivo di 25 µl contenendo 100 ng di DNA genomico 1U Taq polymerase (PE Applied Biosystems), in 1X Buffer (Tris-HCl, KCl), 2mM MgCl₂, 0.2mM dNTPs e 0.5 uM per ogni primers (NAT2F 5'-TGACGGCAGGAA- TTACATTGTC-3' e NAT2R 5'-ACACAAGGGTT- TATTTTGTTC-3').

I genotipi NAT2 sono stati determinati usando un SNaPshot tecnica, un multiplex primer extension che consente di esaminare contemporaneamente fino a otto SNPs usando primers di lunghezza crescente.

Dai genotipi sono stati identificati gli alleli di NAT2 e i loro fenotipi associati (acetilatore lento e acetilatore veloce), come richiesto dalla nomenclatura del database NAT2.

Per la determinazione dello stato acetilatore, abbiamo classificato come fenotipi acetilatori veloci quei genotipi che possiedono almeno un NAT2 * 4 allele (il NAT2 * 4 alleli è stato designato come l'allele umano wild type) (*Hein et al., 2000a, b*). Abbiamo classificato come fenotipi lenti i genotipi che possiedono due varianti alleliche.

3.2.4 Analisi dei genotipi: Soggetti della Liguria

I campioni di sangue (3 ml) sono stati ottenuti attraverso il metodo standard, e collocate in un vacutainer contenente sodio citrato e mantenute a -80°C. Tutti i campioni sono stati codificati per assicurare un'analisi cieca. I DNA sono stati estratti dal sangue periferico linfocitario e l'analisi dei genotipi sono state effettuate su tutti i soggetti.

I soggetti sono stati genotipizzati per i polimorfismi di NAT2, inizialmente, tramite RFLP – PCR, (*Neri et al. 2005*). Successivamente, la maggior parte dei pazienti stessi più un numero di nuovi soggetti reclutati sono stati genotipizzati tramite la tecnica descritta in *Landi et al. (2007)*, mediante tecnica microarray (APEX) che era in grado di fornire informazioni su centinaia di SNP, inclusi i NAT2.

Attraverso il metodo RFLP-PCR tre acetilatori allelici lenti erano identificati usando il primer 5'-TGACGGCAGGAATTACATTGTC e 3' ACACAAGGGTTTATTTTGTTC nella PCR.

Le aliquote dei prodotti della PCR sono state incubate con enzimi di restrizione Kpn I e Taq I e Bam HI per suddividere gli alleli acetilatori lenti dalla tipologia wild-type NAT2*4 alleli, (*Neri et al. 2005*).

Attraverso il metodo APEX, i polimorfismi sono stati analizzati tutti uno per volta tramite la tecnica del microarray basata sul principio dell'extension (APEX).

APEX consiste in una reazione di sequenziamento innescato da un oligonucleotide ancorato con la sua estremità 5' ad un vetrino e terminante con un solo nucleotide prima del sito polimorfico. I dettagli di questa tecnica sono stati ampiamente riportati in numerose pubblicazioni precedenti e non verranno qui descritti per brevità (*Guo et al, 1994*; *Landi et al, 2003,2005*; *Metspalu and Shumaker, 1999*).

Gli aplotipi sono stati ricostruiti utilizzando il software PHASE (*Donnelly and Stephens, 2003*). Gli aplotipi * 4, * 12, * 13 sono stati tutti considerati associati ad un fenotipo acetilatore "veloce", mentre gli aplotipi * 5, * 6, * 7 e sono stati considerati come fenotipi acetilatori "lenti".

Così, i soggetti sono stati raggruppati in base al loro status di "veloci acetilatori" quando presentano due alleli "veloci" o quando presentano un allele "veloce" ed uno "lento", e acetilatori "lenti" quando presentano due alleli "lenti".

3.2.5 Misure controllo qualità

Campioni di DNA provenienti da pazienti e soggetti di controllo sono stati distribuiti in modo casuale, e tutta la genotipizzazione è stata condotta da personale addestrato. Campioni di DNA provenienti da individui di genotipi noti sono stati aggiunti per garantire la validità della genotipizzazione. I soggetti di Casale (in totale 403 soggetti) sono stati sottoposti ad analisi SNAPSHOT. Sessanta di questi (20%) sono stati anche analizzati con una tecnica di sequenziamento (ABI Prism 3100).

I soggetti provenienti dalla Liguria (199 soggetti) è stato analizzato utilizzando un micro array personalizzato basato sulla tecnologia APEX. Inoltre, diverse strategie sono state seguite: (1) ogni oligonucleotide APEX è stato "spottato" in replicato, (2) ogni SNP è stato analizzato in modo indipendente, utilizzando il forward ed il reverse; (3) nel microarray, controlli positivi interni hanno permesso di verificare che le intensità dei quattro canali (A, C, T, G) erano equilibrate; (4) l'identificazione della base dello SNP è stata effettuata sotto la sorveglianza di tre operatori indipendenti specializzati; i risultati discordanti sono stati ricontrollati, e, in caso di disaccordo,

sono stati scartati; (5) il 10% dei soggetti dello studio sono stati selezionati in modo casuale (ad esempio, sia i pazienti sia i soggetti di controllo) e ri-analizzati per ogni polimorfismo.

3.2.6 Analisi statistica

Odds Ratio (OR) e l'intervallo di confidenza al 95% (95% CI) sono stati stimati utilizzando una regressione multivariata logistica. Le analisi sono state incentrate sui fenotipi e l'esposizione all'amianto e sono state aggiustate per età e sesso. Le analisi statistiche sono state condotte separatamente per Casale Monferrato e la Liguria ed i dati dei singoli studi sono stati raggruppati insieme, compresa la provenienza dei campioni, nel modello logistico. SAS software (Release 8.2, da SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) è stato utilizzato per eseguire tutte le analisi statistiche.

Capitolo 4

Presentazione dei risultati

4.1 Caratteristiche dei soggetti

Le principali informazioni sui casi ed i controlli inclusi nello studio sono riportati in Tabella 1 (*Betti et al. 2011*). I soggetti di Casale Monferrato che hanno accettato di donare un campione di sangue sono stati 151 pazienti con MP e 252 controlli di popolazione. La partecipazione tra i casi ed i controlli non era la stessa, 62% dei casi eleggibili e 46% dei controlli.

La percentuale è stata influenzata dal sesso (nei controlli hanno accettato più spesso uomini rispetto alle donne $p < 0,05$, non si sono evidenziate differenze di sesso nel gruppo dei casi) e l'età (sia nei casi che nei controlli l'età media dei soggetti partecipanti è stata inferiore a quella di coloro che hanno rifiutato, questa differenza era statisticamente significativa $p < 0,05$ nei controlli). Questi dati erano attesi dato che il prelievo di sangue è considerato una fastidiosa procedura ed è meno accettata nelle donne anziane e in assenza di un bisogno di salute correlato, (come mostrato da una più bassa partecipazione tra i controlli che dovevano esser intervistati a casa rispetto ai controlli intervistati in ospedale). Nessuna differenza è stata osservata per la residenza, in tal modo la partecipazione non è stata associata all'ambiente sociale in cui risiedono i soggetti.

Lo SNP analizzato non è influenzato dalle variabili considerate e nemmeno dalla partecipazione.

Quasi tutti i soggetti sono stati esposti ad amianto, solo il 23% dei controlli e l'1% dei casi non sono stati esposti, (il 12% dei casi ha avuto una esposizione all'amianto non definito). La principale esposizione all'amianto era di tipo professionale sia nei casi (47%) che nei controlli (44%). L'esposizione ambientale all'amianto risulta la più frequente (*Maule et al. 2007*).

I soggetti di Torino, 69 pazienti con MM e 44 controlli, derivano da uno studio caso-controllo ospedaliero ancora in corso. Lo squilibrio tra il numero di casi e controlli è dovuto al fatto che i controlli sono selezionati successivamente ai casi, cosicché parte dei controlli dei pazienti con MP non erano stati ancora inclusi al momento dell'analisi.

Quasi tutti i casi sono stati esposti all'amianto.

Solo 1,5% dei casi non sono stati esposti e l'1,5% ha avuto un'esposizione ad amianto non definito. Il 56% dei controlli sono stati esposti all'amianto. La principale esposizione all'amianto sia nei casi che nei controlli era di tipo professionale, nei casi era il 78%, mentre nei in controlli il 41%.

4.1.1 *Analisi degli SNP*

Sono stati analizzati 35 SNPs in 15 geni (10 geni riguardano la riparazione del DNA, 1 codifica per la selenoproteina, 2 geni appartengono allo stato redox, 1 gene per l'infiammazione e 1 gene per la fosfatasi), elencati nella tabella 2, (*Betti et al. 2011*).

Nei soggetti di Casale Monferrato, 18 pazienti con MP sono stati esclusi dalle analisi statistiche a causa di un'esposizione all'amianto non definita. Per la stessa ragione un paziente è stato escluso dal gruppo di Torino.

Le prime analisi statistiche sono state effettuate considerando separatamente Casale Monferrato (133 pazienti affetti da MP e 252 controlli di popolazione), e Torino (68 pazienti e 44 controlli), quindi i soggetti sono stati uniti (201 pazienti e 296 controlli). Ulteriori analisi statistiche sono state effettuate nel sottogruppo dei soggetti esposti all'amianto (Casale: 131 pazienti affetti da MP e 194 controlli; Torino: 67 pazienti e 25 controlli; Casale + Torino: 198 casi di MP e 219 controlli). I dati complessivi sono riportati nella Tabella supplementare S1, S2 e S3, (*Betti et al. 2011*).

I dati degli OR per le associazioni statisticamente significative sono riportati nelle tabelle 3 e 4. Per quanto riguarda i soggetti di Casale Monferrato (*Tabella 3, Betti et al. 2011*), quando si sono presi in considerazione solo i soggetti esposti all'amianto, il rischio di MP aumentava al crescere del numero di alleli varianti di XRCC1-399Q ed i risultati sono statisticamente significativi (OR = 1.44, 95% CI: 1,02-2,03).

Quando si è considerato il modello dominante (es.: XRCC1 RQ eterozigoti + QQ omozigoti Vs. RR omozigoti), l'associazione con MP era borderline per la significatività statistica (OR = 1.50, 95% CI: 0,98-2,28). Quando XRCC1 rs1799778 è stato considerato come una variabile continua il rischio era statisticamente significativo (OR = 1.43, 95% CI: 1,02-2,01).

Le analisi comprendono i pazienti ed i controlli valutati nel nostro precedente lavoro, (*Dianzani et al. 2006*). Se si escludono questi soggetti l'OR associato ad XRCC1-399Q, in individui esposti amianto diventa OR= 1.25 (95% CI: 0,76-2,06), considerando 55 pazienti e 109 controlli. I dati di Torino non hanno raggiunto la significatività statistica quando considerati separatamente, probabilmente a causa del piccolo campione.

Tuttavia, anche se non significativo, le informazioni recuperate erano sempre coerenti con quelle ottenute tramite i soggetti di Casale. Considerando i soggetti di Casale Monferrato e di Torino insieme (*Tabella 4, Betti et al. 2011*), in individui esposti all'amianto l'associazione tra XRCC1-399Q e MP diminuisce fino a diventare solo borderline sulla significatività statistica (OR= 1.34, 95% CI: 0,98-1,84). XRCC1-77C invece ha dato qualche indicazione di un effetto protettivo con

OR=0.52 (95% CI: 0,27-1,01), anche se non statisticamente significativo questo SNP suggerisce un effetto protettivo della variante allelica anche quando si considera come una variabile continua (OR= 0.75, 95% CI 0,55-1,03) e quando il modello dominante è stato considerato (es.: XRCC1 eterozigoti TC + TT omozigoti Vs. omozigoti CC (OR= 0,58, 95% CI 0,32-1,05).

L'analisi sugli aplotipi è stata eseguita tramite il software Haploview v4.1, mostrando che XRCC1 R399Q e XRCC1-77T> C sono in linkage disequilibrium (LD) ($D' = 0.94$; $r^2 = 0,27$). Successivamente si è effettuato un sequenziamento sulla regione del promotore di XRCC1, per verificare se l'effetto dell'associazione riportata era dovuta ad un'ulteriore variante in LD con lo SNP studiato. Diversi cambiamenti documentati sono stati identificati, ma nessuno ha caratterizzato solo pazienti con XRCC1 399Q oppure il -77C.

L'associazione è stata trovata anche per ERCC1.

Gli eterozigoti (rispetto al wild-type) hanno mostrato un aumento dell'OR sia in tutti i soggetti (OR= 1.66, 95% CI: 1,06-2,60), sia nei soggetti solo esposti ad amianto (OR= 1.59, 95% CI: 1,01-2,50). Gli omozigoti CC non hanno mostrato un'associazione con MP (probabilmente a causa delle piccole dimensioni del gruppo). Quando il modello dominante è stato considerato (ERCC1 eterozigoti CT + omozigoti CC Vs. omozigoti TT) il rischio di sviluppare MP conferito dalla variante allelica C era statisticamente significativa, sia in tutti i soggetti (OR= 1.61, 95% CI: 1,06-2,47) sia solo nei soggetti esposti ad amianto, (OR= 1.56, 95% CI: 1,02-2,40). La meta-analisi è stata effettuata per queglii SNPs che sono stati studiati mediante le tecniche di *Gemignani et al. (2009)* o *Landi et al. (2007)* e in questo studio. Abbiamo valutato anche l'eterogeneità tra questi studi e abbiamo scoperto che il nostro studio e quello di Gemignani et al. erano omogenei, mentre il nostro studio e quello Landi et al. erano eterogenei.

Di conseguenza, abbiamo presentato qui solo i dati della meta-analisi con lo studio di Gemignani et al. Un totale di 252 pazienti e 356 controlli sono stati inclusi in questa meta-analisi (*Tabella 5 e Tabella S4, Betti et al. 2011*).

L'esposizione ad amianto non può essere considerata. È interessante notare che, APEX e D148E ERCC1 N118N ha mostrato un'associazione statisticamente significativa con MP (APEX EE omozigoti OR = 1.72, 95% CI 1,02-2,91; ERCC1 118N eterozigoti OR= 1.51, 95% CI 1-2,26). XRCC1 R399Q non è risultato associato a MP in questa meta-analisi (*Tabella S4, Betti et al. 2011*).

4.1.2 Combinazione dei polimorfismi di ERCC1 e XRCC1

Al fine di valutare l'effetto congiunto dei polimorfismi di ERCC1 e XRCC1, sono stati divisi i soggetti in quattro gruppi. È stato definito il genotipo TT di ERCC1 e il genotipo GG di XRCC1 come gruppo di riferimento. Il gruppo con almeno un allele variante per entrambi i polimorfismi ha mostrato un'associazione statisticamente significativa con MP nei soggetti esposti ad amianto sia nei soggetti di Casale Monferrato (OR= 2.02, 95% CI: 1,01-4,05), sia in Casale Monferrato e Torino aggregati (OR= 2.39, 95% CI: 1,29-4,43) (Tabella 6, Betti et al. 2011).

4.1.3 Analisi degli aplotipi

Gli aplotipi di XRCC1 sono stati caratterizzati da nove tag-SNPs (identificati tramite Haploview v4.1 e su HapMap) e tre altri SNP analizzati in precedenza (rs3213245, rs1799782, rs25487).

Sono state stimate le frequenze degli aplotipi per i casi ed i controlli tramite la piattaforma software SHEsis. Sono stati presi in considerazione solo gli aplotipi con una frequenza > 3%. I risultati sono riportati in Tabella 7, (Betti et al. 2011).

L' aplotipo di XRCC1: TGGGGGAACAGA era più presente nei casi che nei controlli. Tra i soggetti esposti ad amianto (131 casi, 194 controlli), tale aplotipo era significativamente associato a un aumento del rischio di sviluppare MP (OR= 1.76, 95% CI: 1,04-2,96).

L'allele C in posizione -77 nel promotore di XRCC1, ha una maggiore affinità con il repressore trascrizionale Sp1 rispetto all'allele T nella stessa posizione, (Hao et al. 2006); una delle ipotesi è quindi che l'allele T porti ad una ridotta affinità del fattore trascrizionale Sp1 nel promotore di XRCC1 e quindi ad un'augmentata espressione della proteina 399Q, portando di conseguenza ad una ridotta attività di restauro dei danni ossidativi.

Sono stati esaminati anche gli aplotipi che comprendevano ERCC1 e il gene adiacente RAI.

Complessivamente sono stati esaminati sei polimorfismi a singolo nucleotide (identificati da Haploview v4.1) e un ulteriore SNP (es.: rs11615). Nessun aplotipo è risultato significativamente associato (dati non illustrati).

4.1.4 Espressione di XRCC1

Poiché XRCC1-77T> C (rs3213245) si trova nel gene promotore e colpisce un sito di legame Sp1, è stato valutato il livello d'espressione dell'mRNA in 71 tessuti pleurici normali. Tutto i campioni sono stati sottoposti a genotipizzazione per XRCC1-77T> C e le analisi sono state effettuate considerando il genotipo CC come gruppo di riferimento. Confrontando i diversi genotipi (es.: 29 TT, 27 CT, 15 CC), a seconda della variazione nel livello di espressione genica, la differenza non era statisticamente significativa ($p= 0,3$).

§§§§§§§§

4.2.1 Risultati di NAT2

La tabella 1, (Betti *et al.* 2009) riassume le principali informazioni sui pazienti e controlli che hanno partecipato allo studio. La distribuzione dei fenotipi di casi e controlli è riportata in Tabella 2, (Betti *et al.* 2009).

Nel gruppo di Casale Monferrato NAT2 veloce acetilatore mostra un non significativo aumento dell'OR per MM rispetto all'acetilatore lento, sia nei soggetti esposti ad asbesto (OR=1,45, IC 95% 0,86-2,44) e nella totalità della popolazione (OR=1,34, IC 95% 0,80-2,23). Nessun trend dell'OR è stato osservato quando i veloci e gli intermedi acetilatori sono stati analizzati separatamente (in soggetti esposti amianto: intermedi vs. lenti OR=1,49, 95% CI 0,86-2,60; veloci vs. lenti O=1,27; 95% CI 0,47-3,38).

Nessuno dei risultati raggiunge la significatività statistica. Analogamente, nei soggetti Liguri l'OR era superiore per soggetti muniti di genotipi acetilatori veloci e per genotipi con acetilatori lenti, sia in soggetti esposti all'amianto (OR= 1,66, IC 95% 0,74-3,71) sia in tutta la popolazione (OR=1,54, IC 95% 0,82-2,88), senza però raggiungere la significatività statistica.

Prendendo in considerazione le due popolazioni insieme, si è osservato un aumento non significativo dell'OR per MM, sia in soggetti esposti ad amianto (OR=1,47, IC 95% 0,96-2,26) e in tutta la popolazione (OR= 1,38; 95% CI 0,93-2,04).

4.3 Polimorfismi varianti di XRCC1

Nelle seguenti tabelle sono riportate le distribuzioni di frequenze dei casi (1) e dei controlli (0) per i 12 polimorfismi del gene XRCC1 analizzati, per tutti i soggetti e per i soli soggetti esposti.

Si riportano i valori di odds ratio (OR) e il relativo intervallo di confidenza (I.C.95%), ottenuto applicando il modello di regressione logistica per ogni singolo SNP aggiustato per età, sesso ed esposizione ad amianto per tutti i soggetti, e aggiustato per età e sesso tra i soli soggetti esposti.

Sono stati considerati i modelli di ereditarietà: codominante (omozigoti wild-type, eterozigoti e omozigoti varianti), dominante (eterozigoti e omozigoti varianti rispetto agli omozigoti wild-type) e recessivo (omozigoti varianti verso omozigoti wild-type ed eterozigoti). È stato inoltre considerato l'aumento del rischio all'aumentare del numero di alleli varianti (modello Log-additive).

Le analisi sono riportate sia per tutti i soggetti sia per il gruppo dei soli esposti ad amianto.

XRCC1-R399Q

SNP: **XRCC1-R399Q** adjusted by: SEX ETA ASB

	0	%	1	%	OR	lower	upper	p-value	AIC
Codominant									
R/R	114	45.2	54	40.6	1.00			0.18619	446.0
R/Q	113	44.8	59	44.4	1.34	0.82	2.19		
Q/Q	25	9.9	20	15.0	1.90	0.91	3.97		
Dominant									
R/R	114	45.2	54	40.6	1.00			0.11478	444.9
R/Q-Q/Q	138	54.8	79	59.4	1.45	0.91	2.30		
Recessive									
R/R-R/Q	227	90.1	113	85.0	1.00			0.16152	445.4
Q/Q	25	9.9	20	15.0	1.64	0.82	3.27		
log-Additive									
0,1,2	252	65.5	133	34.5	1.37	0.98	1.92	0.06719	444.0

Solo Esposti

XRCC1-R399Q

SNP: **XRCC1-R399Q** adjusted by: SEX ETA

	0	%	1	%	OR	lower	upper	p-value	AIC
Codominant									
R/R	93	47.9	52	39.7	1.00			0.10630	425.9
R/Q	83	42.8	59	45.0	1.45	0.88	2.38		
Q/Q	18	9.3	20	15.3	2.08	0.98	4.40		
Dominant									
R/R	93	47.9	52	39.7	1.00			0.05816	424.8
R/Q-Q/Q	101	52.1	79	60.3	1.57	0.98	2.50		
Recessive									
R/R-R/Q	176	90.7	111	84.7	1.00			0.13014	426.1
Q/Q	18	9.3	20	15.3	1.72	0.85	3.48		
log-Additive									
0,1,2	194	59.7	131	40.3	1.44	1.03	2.04	0.03425	423.9

Tra i soggetti esposti ad amianto, la variante XRCC1-399Q ha evidenziato un incremento statisticamente significativo del rischio all'aumentare del numero di alleli varianti (per ogni allele: OR = 1.44; IC95% 1.03-2.04). L'OR è aumentato sia negli eterozigoti R/Q (OR = 1.45; IC95% 0.88-2.38) che negli omozigoti Q/Q (OR = 2.08; IC95% 0.98-4.40) rispetto agli omozigoti R/R. Quando gli eterozigoti R/Q sono stati considerati insieme agli omozigoti Q/Q (rispetto agli omozigoti R/R), tra i soli esposti ad amianto, l'associazione è risultata al limite della significatività statistica (OR = 1.57; IC95% 0.98-2.50).

L'analisi effettuata su tutti i soggetti, esposti e non esposti, ha evidenziato un incremento del rischio all'aumentare del numero di alleli varianti (per ogni allele: OR = 1.37; IC95% 0.98-1.92). Il valore di odds ratio rilevato quando gli eterozigoti R/Q sono stati considerati insieme agli omozigoti Q/Q (rispetto agli omozigoti R/R) è stato pari a 1.45 (IC95% 0.91-2.30).

Riportiamo di seguito le analisi relative agli ulteriori 11 polimorfismi varianti di XRCC1, per le quali non sono emersi risultati rilevanti.

XRCC1-77SNP: **XRCC1-77** adjusted by: SEX ETA ASB

	0	%	1	%	OR	lower	upper	p-value	AIC
Codominant									
T/T	86	34.1	49	36.8	1.00			0.5853	448.3
T/C	127	50.4	67	50.4	0.85	0.52	1.41		
C/C	39	15.5	17	12.8	0.69	0.33	1.43		
Dominant									
T/T	86	34.1	49	36.8	1.00			0.4060	446.7
T/C-C/C	166	65.9	84	63.2	0.82	0.51	1.32		
Recessive									
T/T-T/C	213	84.5	116	87.2	1.00			0.4073	446.7
C/C	39	15.5	17	12.8	0.76	0.39	1.47		
log-Additive									
0,1,2	252	65.5	133	34.5	0.84	0.59	1.18	0.3040	446.3

Solo Esposti**XRCC1-77**SNP: **XRCC1-77** adjusted by: SEX ETA

	0	%	1	%	OR	lower	upper	p-value	AIC
Codominant									
T/T	63	32.5	49	37.4	1.00			0.4173	428.6
T/C	101	52.1	66	50.4	0.82	0.50	1.36		
C/C	30	15.5	16	12.2	0.61	0.29	1.29		
Dominant									
T/T	63	32.5	49	37.4	1.00			0.3028	427.3
T/C-C/C	131	67.5	82	62.6	0.78	0.48	1.26		
Recessive									
T/T-T/C	164	84.5	115	87.8	1.00			0.2769	427.2
C/C	30	15.5	16	12.2	0.69	0.35	1.36		
log-Additive									
0,1,2	194	59.7	131	40.3	0.79	0.56	1.12	0.1916	426.7

XRCC1-rs3213247

SNP: **XRCC1-rs3213247** adjusted by: SEX ETA ASB

	0	%	1	%	OR	lower	upper	p-value	AIC
Codominant									
G/G	235	93.3	124	93.2	1.00			0.9157	447.3
G/T	17	6.7	9	6.8	1.05	0.43	2.56		
log-Additive									
0,1,2	252	65.5	133	34.5	1.05	0.43	2.56		447.3

Solo Esposti

XRCC1-rs3213247

SNP: **XRCC1-rs3213247** adjusted by: SEX ETA

	0	%	1	%	OR	lower	upper	p-value	AIC
Codominant									
G/G	180	92.8	122	93.1	1.00			0.8796	428.4
G/T	14	7.2	9	6.9	1.07	0.44	2.63		
log-Additive									
0,1,2	194	59.7	131	40.3	1.07	0.44	2.63		428.4

XRCC1-rs129763352

SNP: **XRCC1-rs129763352** adjusted by: SEX ETA ASB

	0	%	1	%	OR	lower	upper	p-value	AIC
Codominant									
G/G	251	99.6	133	100.0	1			0.7318	447.2
G/A	1	0.4	0	0.0	0	0			
log-Additive									
0,1,2	252	65.5	133	34.5	0	0			447.2

Solo Esposti

XRCC1-rs129763352

SNP: **XRCC1-rs129763352** adjusted by: SEX ETA

Monomorphic G/G

XRCC1-rs2854496SNP: **XRCC1-rs2854496** adjusted by: SEX ETA ASB

	0	%	1	%	OR	lower	upper	p-value	AIC
Codominant									
G/G	167	66.3	92	69.2	1.00			0.2223	446.3
G/A	76	30.2	40	30.1	0.79	0.48	1.30		
A/A	9	3.6	1	0.8	0.24	0.03	2.01		
Dominant									
G/G	167	66.3	92	69.2	1.00			0.2187	445.8
G/A-A/A	85	33.7	41	30.8	0.74	0.45	1.20		
Recessive									
G/G-G/A	243	96.4	132	99.2	1.00			0.1451	445.2
A/A	9	3.6	1	0.8	0.26	0.03	2.15		
log-Additive									
0,1,2	252	65.5	133	34.5	0.71	0.45	1.12	0.1339	445.1

Solo Esposti**XRCC1 - rs2854496**SNP: **XRCC1 - rs2854496** adjusted by: SEX ETA

	0	%	1	%	OR	lower	upper	p-value	AIC
Codominant									
G/G	124	63.9	92	70.2	1.00			0.14496	426.5
G/A	63	32.5	38	29.0	0.71	0.42	1.18		
A/A	7	3.6	1	0.8	0.24	0.03	1.98		
Dominant									
G/G	124	63.9	92	70.2	1.00			0.10605	425.8
G/A-A/A	70	36.1	39	29.8	0.66	0.40	1.10		
Recessive									
G/G-G/A	187	96.4	130	99.2	1.00			0.14991	426.3
A/A	7	3.6	1	0.8	0.26	0.03	2.17		
log-Additive									
0,1,2	194	59.7	131	40.3	0.65	0.41	1.04	0.06512	425.0

XRCC1-rs2307174

SNP: **XRCC1-rs2307174** adjusted by: SEX ETA ASB

	0	%	1	%	OR	lower	upper	p-value	AIC
Codominant									
G/G	252	100.0	131	98.5	1			0.03394	442.9
G/A	0	0.0	2	1.5		0			
log-Additive									
0,1,2	252	65.5	133	34.5		0			442.9

Solo Esposti

XRCC1-rs2307174

SNP: **XRCC1-rs2307174** adjusted by: SEX ETA

	0	%	1	%	OR	lower	upper	p-value	AIC
Codominant									
G/G	194	100.0	129	98.5	1			0.0338	423.9
G/A	0	0.0	2	1.5		0			
log-Additive									
0,1,2	194	59.7	131	40.3		0			423.9

XRCC1-rs2023614

SNP: **XRCC1-rs2023614** adjusted by: SEX ETA ASB

	0	%	1	%	OR	lower	upper	p-value	AIC
Codominant									
G/G	217	86.1	112	84.2	1.00			0.8942	447.3
C/G	35	13.9	21	15.8	1.04	0.56	1.96		
log-Additive									
0,1,2	252	65.5	133	34.5	1.04	0.56	1.96		447.3

Solo Esposti

XRCC1-rs2023614

SNP: **XRCC1-rs2023614** adjusted by: SEX ETA

	0	%	1	%	OR	lower	upper	p-value	AIC
Codominant									
G/G	166	85.6	110	84.0	1.00			0.8367	428.4
C/G	28	14.4	21	16.0	1.07	0.57	2.01		
log-Additive									
0,1,2	194	59.7	131	40.3	1.07	0.57	2.01		428.4

XRCC1-rs1799778SNP: **XRCC1-rs1799778** adjusted by: SEX ETA ASB

	0	%	1	%	OR	lower	upper	p-value	AIC
Codominant									
C/C	114	45.2	54	40.6	1.00			0.21153	446.2
A/C	111	44.0	58	43.6	1.35	0.83	2.21		
A/A	27	10.7	21	15.8	1.80	0.88	3.68		
Dominant									
C/C	114	45.2	54	40.6	1.00			0.11478	444.9
A/C-A/A	138	54.8	79	59.4	1.45	0.91	2.29		
Recessive									
C/C-A/C	225	89.3	112	84.2	1.00			0.20034	445.7
A/A	27	10.7	21	15.8	1.55	0.79	3.02		
log-Additive									
0,1,2	252	65.5	133	34.5	1.35	0.97	1.87	0.07802	444.2

Solo Esposti**XRCC1-rs1799778**SNP: **XRCC1-rs1799778** adjusted by: SEX ETA

	0	%	1	%	OR	lower	upper	p-value	AIC
Codominant									
C/C	93	47.9	52	39.7	1.00			0.12200	426.2
A/C	81	41.8	58	44.3	1.47	0.89	2.41		
A/A	20	10.3	21	16.0	1.96	0.95	4.05		
Dominant									
C/C	93	47.9	52	39.7	1.00			0.05800	424.8
A/C-A/A	101	52.1	79	60.3	1.57	0.98	2.50		
Recessive									
C/C-A/C	174	89.7	110	84.0	1.00			0.16528	426.5
A/A	20	10.3	21	16.0	1.62	0.82	3.20		
log-Additive									
0,1,2	194	59.7	131	40.3	1.42	1.01	1.98	0.04102	424.2

XRCC1-rs3213356SNP: **XRCC1-rs3213356** adjusted by: SEX ETA ASB

	0	%	1	%	OR	lower	upper	p-value	AIC
Codominant									
A/A	81	32.1	46	34.6	1.00			0.6465	448.5
A/G	130	51.6	64	48.1	0.78	0.47	1.31		
G/G	41	16.3	23	17.3	0.85	0.43	1.70		
Dominant									
A/A	81	32.1	46	34.6	1.00			0.3700	446.5
A/G-G/G	171	67.9	87	65.4	0.80	0.49	1.30		
Recessive									
A/A-A/G	211	83.7	110	82.7	1.00			0.9863	447.3
G/G	41	16.3	23	17.3	0.99	0.54	1.83		
log-Additive									
0,1,2	252	65.5	133	34.5	0.90	0.64	1.26	0.5302	447.0

Solo Esposti**XRCC1-rs3213356**SNP: **XRCC1-rs3213356** adjusted by: SEX ETA

	0	%	1	%	OR	lower	upper	p-value	AIC
Codominant									
A/A	59	30.4	46	35.1	1.00			0.5489	429.2
A/G	103	53.1	63	48.1	0.76	0.45	1.26		
G/G	32	16.5	22	16.8	0.78	0.39	1.56		
Dominant									
A/A	59	30.4	46	35.1	1.00			0.2748	427.2
A/G-G/G	135	69.6	85	64.9	0.76	0.46	1.24		
Recessive									
A/A-A/G	162	83.5	109	83.2	1.00			0.8073	428.3
G/G	32	16.5	22	16.8	0.93	0.50	1.72		
log-Additive									
0,1,2	194	59.7	131	40.3	0.86	0.61	1.21	0.3751	427.6

XRCC1-rs1799782SNP: **XRCC1-rs1799782** adjusted by: SEX ETA ASB

	0	%	1	%	OR	lower	upper	p-value	AIC
Codominant									
C/C	214	84.9	116	87.2	1.00			0.7833	448.4
C/T	36	14.3	16	12.0	0.88	0.45	1.73		
T/T	2	0.8	1	0.8	0.48	0.04	5.57		
Dominant									
C/C	214	84.9	116	87.2	1.00			0.6154	446.6
C/T-T/T	38	15.1	17	12.8	0.85	0.44	1.63		
Recessive									
C/C-C/T	250	99.2	132	99.2	1.00			0.5518	446.5
T/T	2	0.8	1	0.8	0.48	0.04	5.64		
Overdominant									
C/C-T/T	216	85.7	117	88.0	1.00			0.7274	446.8
C/T	36	14.3	16	12.0	0.89	0.45	1.74		
log-Additive									
0,1,2	252	65.5	133	34.5	0.83	0.46	1.51	0.5453	446.5

Solo Esposti**XRCC1-rs1799782**SNP: **XRCC1-rs1799782** adjusted by: SEX ETA

	0	%	1	%	OR	lower	upper	p-value	AIC
Codominant									
C/C	163	84.0	114	87.0	1.00			0.8092	429.5
C/T	29	14.9	16	12.2	0.91	0.46	1.80		
T/T	2	1.0	1	0.8	0.48	0.04	5.62		
Dominant									
C/C	163	84.0	114	87.0	1.00			0.6818	427.8
C/T-T/T	31	16.0	17	13.0	0.87	0.45	1.68		
Recessive									
C/C-C/T	192	99.0	130	99.2	1.00			0.5538	427.6
T/T	2	1.0	1	0.8	0.49	0.04	5.67		
Overdominant									
C/C-T/T	165	85.1	115	87.8	1.00			0.8006	427.9
C/T	29	14.9	16	12.2	0.92	0.47	1.81		
log-Additive									
0,1,2	194	59.7	131	40.3	0.85	0.47	1.55	0.6025	427.7

XRCC1-rs3213371SNP: **XRCC1-rs3213371** adjusted by: SEX ETA ASB

	0	%	1	%	OR	lower	upper	p-value	AIC
Codominant									
G/G	217	86.1	119	89.5	1.00			0.1900	446.0
C/G	34	13.5	13	9.8	0.63	0.31	1.29		
C/C	1	0.4	1	0.8	10.24	0.28	381.31		
Dominant									
G/G	217	86.1	119	89.5	1.00			0.2961	446.3
C/G-C/C	35	13.9	14	10.5	0.69	0.34	1.39		
Recessive									
G/G-C/G	251	99.6	132	99.2	1.00			0.1938	445.7
C/C	1	0.4	1	0.8	10.69	0.29	395.05		
log-Additive									
0,1,2	252	65.5	133	34.5	0.77	0.39	1.51	0.4376	446.7

Solo Esposti**XRCC1-rs3213371**SNP: **XRCC1-rs3213371** adjusted by: SEX ETA

	0	%	1	%	OR	lower	upper	p-value	AIC
Codominant									
G/G	166	85.6	118	90.1	1.00			0.08162	425.4
C/G	28	14.4	12	9.2	0.56	0.27	1.17		
C/C	0	0.0	1	0.8		0.00			
Dominant									
G/G	166	85.6	118	90.1	1.00			0.18185	426.6
C/G-C/C	28	14.4	13	9.9	0.62	0.30	1.27		
Recessive									
G/G-C/G	194	100.0	130	99.2	1.00			0.11303	425.9
C/C	0	0.0	1	0.8		0.00			
log-Additive									
0,1,2	194	59.7	131	40.3	0.70	0.35	1.39	0.29475	427.3

XRCC1-rs3213403SNP: **XRCC1-rs3213403** adjusted by: SEX ETA ASB

	0	%	1	%	OR	lower	upper	p-value	AIC
Codominant									
A/A	213	84.5	115	86.5	1.00			0.6871	448.6
A/G	36	14.3	17	12.8	0.92	0.47	1.78		
G/G	3	1.2	1	0.8	0.39	0.04	4.02		
Dominant									
A/A	213	84.5	115	86.5	1.00			0.6456	447.1
A/G-G/G	39	15.5	18	13.5	0.86	0.45	1.63		
Recessive									
A/A-A/G	249	98.8	132	99.2	1.00			0.4067	446.7
G/G	3	1.2	1	0.8	0.39	0.04	4.06		
log-Additive									
0,1,2	252	65.5	133	34.5	0.83	0.47	1.48	0.5269	446.9

Solo Esposti**XRCC1-rs3213403**SNP: **XRCC1-rs3213403** adjusted by: SEX ETA

	0	%	1	%	OR	lower	upper	p-value	AIC
Codominant									
A/A	162	83.5	113	86.3	1.00			0.7018	429.7
A/G	29	14.9	17	13.0	0.95	0.49	1.85		
G/G	3	1.5	1	0.8	0.39	0.04	4.05		
Dominant									
A/A	162	83.5	113	86.3	1.00			0.7103	428.3
A/G-G/G	32	16.5	18	13.7	0.89	0.46	1.69		
Recessive									
A/A-A/G	191	98.5	130	99.2	1.00			0.4082	427.7
G/G	3	1.5	1	0.8	0.39	0.04	4.07		
log-Additive									
0,1,2	194	59.7	131	40.3	0.85	0.48	1.51	0.5794	428.1

Polimorfismi di XRCC1

N° (5'-3')	dbSNPs id	SNP	Frequenza Allelica
1	rs3213245	-77 T>C	T:0.78 C:0.22
2	rs3213247	IVS2+874 G>T	G:0.96 T:0.04
3	rs129763352	IVS2+5570 G>A	G:0.98 A:0.02
4	rs2854496	IVS2+11417 G>A	G:0.85 A:0.15
5	rs2307174	EX3 E50E G>A	G:0.98 A:0.03
6	rs2023614	IVS3+14745 C>G	G:0.92 C:0.08
7	rs1799778	IVS3+20469 C>A	C:0.60 A:0.40
8	rs3213356	IVS4+21371 A>G	A:0.58 G:0.42
9	rs1799782	EX6 C>T (R194W)	C:0.91 T:0.09
10	rs 25487	EX10 G>A (R399Q)	G:0.40 A:0.60
11	rs3213371	IVS10+24552 C>G	G:0.97 C:0.03
12	rs3213403	STOP+764 A>G (3'UTR)	A: 0.91 G:0.09

Tabella 4.3.1 - Identificativi dei polimorfismi di XRCC1 e loro frequenza allelica -

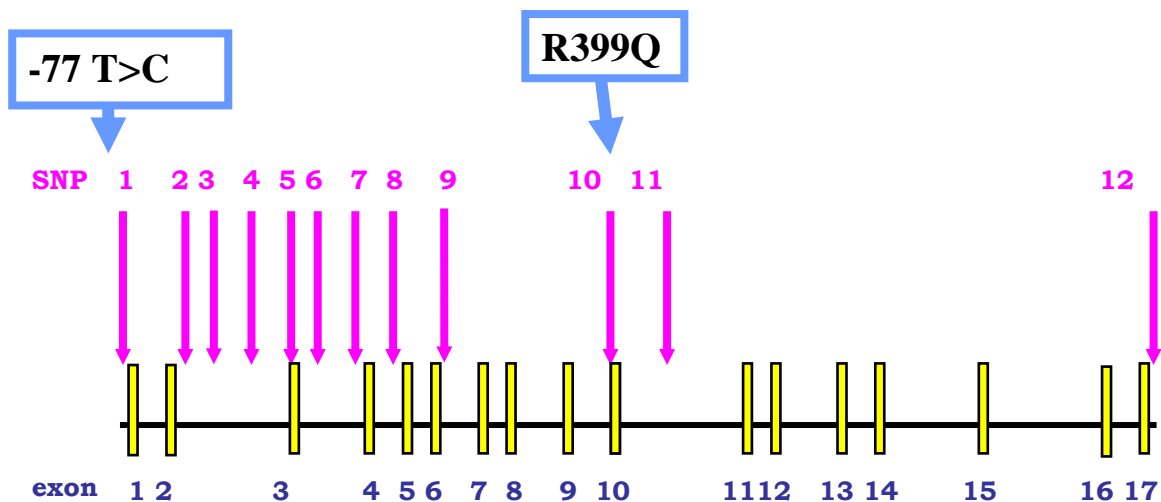
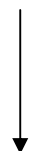


Figura 4.3 - Polimorfismi di XRCC1 e relativa localizzazione -

Aplotipi di XRCC1: per i soli soggetti esposti ad amianto

-77 T>C

R399Q



A PLOTIPI	FREQUENZA	OR*	95%CI
<u>T</u> GGGGGAACAGA	0.2931	1.75	1.04-2.95
CGGAGGCGCGGA	0.1785	1 (ref.)	
<u>C</u> GGGGGCGCGGA	0.2123	1.47	0.85-2.55
TGGGGCCACGGA	0.0505	1.25	0.51-3.03
TGGGGCCGCGGA	0.0209	2.95	0.87-9.9
TGGGGGCACGCA	0.0646	1.02	0.45-2.27
TGGGGGCACGGA	0.0423	1.48	0.58-3.78
TGGGGGCACGGG	0.0754	1.065	0.51-2.23
TTGGGGAACAGA	0.0338	1.65	0.60-4.57

Tabella 4.3.2 - Aplotipi di XRCC1: per i soli soggetti esposti ad amianto -

OR* aggiustati per età e sesso

Capitolo 5

Discussione e Conclusioni e Sviluppi futuri

Il cancro è una malattia multifattoriale in cui sono coinvolti sia fattori ambientali che genetici. Il mesotelioma maligno della pleura, in particolare, è un tumore associato ad un importante fattore ambientale, l'esposizione all'amianto.

Poiché solo il 5-10% dei soggetti con elevata esposizione ad asbesto sviluppa la patologia, alcuni autori hanno ipotizzato come fattore eziologico di MM non la sola esposizione ad amianto, ma anche il ruolo di fattori genetici implicati nei meccanismi biologici di restauro dei danni ossidativi determinati dalle fibre di amianto a livello del DNA (*Dianzani et al. 2006*).

L'ipotesi dello studio si basa sul fatto che, tra i soggetti esposti all'amianto, quelli che presentano sistemi di restauro del DNA meno efficienti possano presentare un rischio maggiore di sviluppare il MM.

I campioni di sangue sono stati raccolti nell'ambito di uno studio caso-controllo di popolazione. Si è deciso di limitare la raccolta dei campioni alla popolazione di Casale Monferrato e alle zone limitrofe. Questa popolazione, infatti, risulta particolarmente esposta ai danni determinati dall'amianto, poiché a Casale Monferrato è stato operante fino al 1986 un amianto-cementificio. Gli operai della fabbrica presentano altissimo rischio di sviluppare il mesotelioma; ciò è vero anche per le loro mogli, esposte agli indumenti inquinati (*Ferrante et al. 2007*), e persino per tutti gli abitanti della città in rapporto alla distanza della loro abitazione dal cementificio (*Magnani et al. 1993, 2000; Maule et al. 2007*).

Dati riscontrati sulla popolazione di quest'area hanno evidenziato che i lavoratori del cementificio hanno una probabilità di 30-35 volte superiore rispetto alla popolazione del Piemonte di sviluppare il mesotelioma e di 50 volte superiore rispetto alla popolazione rurale. Inoltre, è stato osservato che per i residenti in Casale Monferrato il rischio di insorgenza del tumore aumenta di 15-25 volte a seconda della distanza delle loro abitazioni dal cementificio.

Particolare cura è stata posta nella raccolta dei controlli, residenti nella stessa area dei casi e appaiati a questi ultimi per età e sesso.

Lo scopo del nostro lavoro è stato quello di valutare il ruolo di specifici polimorfismi a livello di un gene che codifica per una proteina coinvolta nel processo di restauro del DNA danneggiato, nello

sviluppo di mesotelioma maligno, in una popolazione esposta ad alti livelli di un noto fattore genotossico, quale l'amianto.

L'obiettivo è stato quello di verificare se i soggetti esposti all'amianto con mesotelioma abbiano dei sistemi di restauro del DNA meno efficienti rispetto a soggetti esposti, ma non ammalati. In questo caso le mutazioni indotte dall'amianto non verrebbero corrette, determinando l'insorgenza del tumore pleurico.

Solo due geni sono risultati significativamente associati ad MM, cioè XRCC1 e ERCC1, entrambi coinvolti nella riparazione del DNA.

Le analisi statistiche sono state condotte su 403 soggetti e su un sottogruppo di soggetti con esposizione all'asbesto (325).

Nell'ambito di questo studio caso-controllo di popolazione, sono stati analizzati dodici polimorfismi a singolo nucleotide (SNPs) del gene XRCC1, noto in letteratura per essere associato ad alcuni tipi di cancro.

Si tratta di polimorfismi molto frequenti nella popolazione caucasica e alcuni di essi sono già stati associati ad un incremento del rischio per altri tumori o ad una ridotta funzionalità dei meccanismi di riparazione del DNA in vari studi (*Hung et al. 2005*).

I nostri risultati hanno mostrato un'associazione statisticamente significativa tra la variante XRCC1-399Q e l'insorgenza del MM della pleura nei soggetti esposti all'amianto. Il rischio aumenta significativamente con l'aumentare del numero di alleli polimorfici (alleli varianti), mostrando una sorta di dose-effetto.

Considerando i genotipi di XRCC1-R399Q suddivisi in due categorie (genotipi a rischio e genotipo non a rischio) in base alle conoscenze relative alla significatività funzionale della variante, l'odds ratio relativo gli eterozigoti XRCC1 R/Q + omozigoti varianti Q/Q verso omozigoti wild type R/R è risultato pari a 1.57 (I.C. 95% 0.98-2.50), tra i soli esposti ad amianto; e tra tutti i soggetti l'odds ratio è risultato pari a 1.45 (I.C. 95% 0.91-2.30). I soggetti esposti ad amianto mostrano un OR pari a 24 (I.C. 95% 5.6-101.6), rispetto ai soggetti non esposti.

La probabilità a priori che l'associazione tra una variante genica e una malattia sia reale è fortemente influenzata dalle conoscenze della funzione biologica del gene, dal significato funzionale della variante e dalle evidenze epidemiologiche.

Si tratta di una variabile soggettiva, il cui range varia dal 50% o valori superiori, probabilità appropriata quando c'è una forte potenza biologica ed una consistente evidenza epidemiologica, allo 0,1% quando sia le conoscenze biologiche sia quelle epidemiologiche sono inadeguate (*Wacholder et al. 2004; Matullo et al. 2005; Hung et al. 2005*)

In letteratura esistono diversi studi epidemiologici che riportano un'associazione tra il polimorfismo R399Q e la predisposizione genetica al cancro.

In particolare, XRCC1-399Q è stato associato ad alcuni tipi di tumore: carcinoma a cellule squamose della testa e del collo (*Sturgis et al. 2002*), cancro dello stomaco (*Shen et al. 2000*), carcinoma polmonare (*Divine et al. 2001*), cancro della vescica (*Matullo et al. 2001 a, Shen et al. 2003*), il cancro del colon-retto, (*Yiang et al., 2010*) e il cancro alla prostata, (*Zhang et al., 2010*). Tale associazione viene meno per altri tipi di tumore: XRCC1-399Q non sembra giocare un ruolo importante nel carcinoma mammario (*Duell et al. 2001, Smith et al. 2003, Shu et al. 2003*), nel cancro della prostata (*Rybicki et al. 2004*) e nel linfoma maligno (*Matsuo et al. 2004*).

La variante XRCC1-R399Q non sembra essere una fattore rilevante per il tumore della mammella in uno studio caso-controllo condotto da *Shu et al. 2003* e in uno studio di *Deligezer et al. 2004*. Tale variante risulta essere un fattore di rischio per tale tipo di tumore solo tra le donne fumatrici in uno studio condotto da *Patel et al. 2005*.

Un potenziale ruolo di tale variante sul rischio di tumore alla vescica è riportato in uno studio caso-controllo di *Kelsey et al. 2004*.

La variante non sembra associata all'insorgenza del tumore gastrico (*Lee et al. 2002*), e sembra giocare un ruolo importante nel tumore della cervice in uno studio condotto da *Huang et al 2007*.

È possibile che l'associazione tra un polimorfismo genico e una malattia sia il risultato di un *linkage disequilibrium* tra un marker allelico e un allele predisponente la malattia. Il *linkage disequilibrium* solitamente riflette l'origine storica di una mutazione a livello di uno specifico cromosoma indicando un caratteristico set di combinazioni alleliche.

Il polimorfismo XRCC1-399Q potrebbe essere in *linkage disequilibrium* con un altro polimorfismo nello stesso gene direttamente associato con il mesotelioma. Per questo motivo, abbiamo esteso l'analisi ad altri siti polimorfici di XRCC1.

L'analisi degli aplotipi ha mostrato un aumento del rischio di MM tra i soggetti con aplotipo TGGGGGAACAGA vs CGGAGGCGCGGA.

Il primo aplotipo descritto, include l'allele T di XRCC1-77 e l'allele di rischio A di XRCC1-399Q. In letteratura da *Hao et al. (2006)* mostra che l'allele C in posizione -77 nel promotore di XRCC1, ha una maggiore affinità con il repressore trascrizionale Sp1 rispetto all'allele T nella stessa posizione. La nostra ipotesi è che l'allele T porti a ridotta affinità del fattore trascrizionale Sp1 nel promotore di XRCC1 e quindi ad un'augmentata espressione della proteina 399Q, e di conseguenza ad una ridotta attività di restauro dai danni ossidativi.

In conclusione, il nostro lavoro mostra un'associazione tra un polimorfismo del gene XRCC1, coinvolto nel restauro del DNA e il mesotelioma maligno della pleura.

Questa è la prima identificazione di un'associazione tra MP e un gene di riparazione del DNA, in questo caso con XRCC1, sulla base di una ipotesi a priori sul meccanismo di danno da fibre di amianto.

Tale studio ha suggerito che una diminuzione della risposta al danno al DNA può favorire cancerogenicità dell'amianto, (*Dianzani et al., 2006*).

La meta-analisi con i dati relativi di XRCC1 e ERCC1 effettuata da Gemignani et al. (2009), indipendentemente dalla esposizione all'amianto, ha confermato ed esteso i nostri risultati. XRCC1 R399Q, valutato in tutti gli individui indipendentemente dall'esposizione all'amianto, non è associato a MP, come invece risulta dai dati di Casale Monferrato e Torino.

Così, XRCC1 R399Q sembra essere un fattore di rischio solo per soggetti esposti all'amianto. La meta-analisi ha confermato i nostri dati mostrando che ERCC1 N118N è un fattore di rischio. Gli aplotipi sia per XRCC1 e ERCC1 sono stati inoltre valutati, ma solo l'aplotipo XRCC1-TGGGGGAACAGA è risultato statisticamente significativo, essendo più rappresentato nei casi che nei controlli. I nostri dati sembrano favorire l'ipotesi che l'effetto contigua dei geni XRCC1 e ERCC1 non è dovuta a LD.

Il sequenziamento del promotore e la regione codificante di XRCC1 in pazienti e controlli non hanno rivelato un altro cambiamento del DNA in LD con R399Q che potrebbe spiegare l'associazione funzionale. Così l'associazione deve essere dovuta allo SNP studiato o ad altri SNP situati nelle regioni non sequenziate.

Sia R399Q XRCC1 e ERCC1 N118N sono stati trovati associati con il cancro in diversi studi (*De Ruyck et al., 2007, Sterpone et al., 2010, Huang et al., 2010, Jang et al., 2010, Zhan et al., 2010, Kalikaki et al. 2009, Ricceri et al., 2010*). La combinazione di polimorfismi di ERCC1 e XRCC1 prevede un migliore risultato clinico della chemioterapia nel carcinoma metastatico del colon-retto, (*Liang et al., 2010*). Tuttavia, poco è conosciuto circa l'effetto funzionale di questi SNP.

È interessante notare, che R399Q si trova nel dominio BRCT1, contenente il sito di legame per PARP, cioè la poli (ADP-ribosio) polimerasi I. La struttura tridimensionale del dominio wild-type XRCC1-BRCT1 è caratterizzato da quattro alfa eliche e tre beta fogli. La struttura della proteina variante 399Q mostra l'assenza di tre alfa eliche e due beta fogli. Questo suggerisce che 399Q può indurre un significativo cambiamento conformazionale nel dominio BRCT. Dal momento che le alfa eliche sono coinvolte in interazioni proteina-proteina, è possibile che la variante 399Q modifichi la funzione della struttura di XRCC1, (*Monaco et al., 2007*).

Inoltre, l'aplotipo XRCC1 associato ad MM include un altro SNP che può avere rilevanza funzionale. Il -77T>C SNP si trova nella regione del promotore del XRCC1 all'interno del nucleo di una predetta sequenza legame Sp1. Sp1 è un zinc-finger fattore di trascrizione che può agire come un repressore trascrizionale o attivatore, a seconda del contesto. Utilizzando diverse linee di cellule non pleuriche *Hao et al., (2006)* hanno dimostrato che l'allele-77C ha un'elevata affinità con Sp1, ma è associato ad una ridotta trascrizione attività in vitro. Essi hanno concluso che Sp1 agisce come un repressore trascrizionale della espressione XRCC1 e che la ridotta espressione XRCC1 per l'allele C può essere la causa della sua associazione con il cancro polmonare, (*Li et al., 2008, Hsieh et al., 2009*) e il cancro gastrico, (*Corso et al., 2009*).

I nostri risultati mostrano che-77C gioca un ruolo protettivo per MP. Dal momento che -77T e 399Q si trovano sullo stesso aplotipo a rischio, la nostra ipotesi era che la ridotta affinità di Sp1 a causa dell'allele -77T può causare una aumentata espressione della variante della proteina 399Q portando ad una alterata funzione, come anormali interazioni con altre proteine di riparazione del DNA del complesso BER.

Tuttavia, non sono disponibili dati per l'espressione di XRCC1 in tessuti pleurici relativi a specifici genotipi XRCC1.

Controversi studi di associazione epidemiologici sono evidenti anche per ERCC1 N118N. Questo SNP è stato associato con la risposta per il trattamento del cancro polmonare, (*Kalikaki et al., 2009*), ma non con cancro colon-rettale, (*Hansen et al., 2008*).

Uno studio pubblicato da *Ricceri et al., (2010)*, mostra che non solo ERCC1- N118N, ma anche gli aplotipi di ERCC1 modificano il rischio di cancro alla vescica.

Sebbene abbiamo trovato un'associazione tra MP e un aplotipo XRCC1 ed una combinazione di varianti di XRCC1 e ERCC1, non abbiamo osservato un'associazione con aplotipi di ERCC1. I meccanismi biologici che spiegano l'associazione di questi SNP con il MP sono ancora oscuri.

La nostra meta-analisi mostra che anche un altro gene del riparo del DNA, APEX, è associato con il MP utilizzando il modello codominante.

APEX è parte di BER, come XRCC1, (*Christmann et al., 2003*). Ulteriori dati sono necessari per accertare questa associazione.

In conclusione, questo studio mostra un'associazione tra due geni di riparazione del DNA e MP e rafforza l'ipotesi di un ruolo per i fattori di rischio genetici nella cancerogenicità dell'amianto. Va sottolineato che questi rischi sono inferiori di uno-due ordini di grandezza rispetto al rischio causato dalla esposizione all'amianto (OR di 50-100 per l'amianto rispetto all' 1-2 per fattori genetici).

Nello studio pubblicato da *Betti et al., (2009)* è stato studiato il gene NAT2.

Gli enzimi N-acetil-transferasi (NAT1 e NAT2) sono coinvolti nell'attivazione degli effetti carcinogenetici di ammine aromatiche ed eterocicliche. Essi catalizzano sia O-acetile, portando all'attivazione sia dell'N-acetile che alla disattivazione di queste ammine (*Hein et al., 2000 a, b*). Poiché sono polimorfici negli esseri umani e sono rappresentati da molte varianti caratterizzate da una diversa attività, il loro ruolo nella suscettibilità del cancro è stato postulato per molti anni. In particolare i polimorfismi, NAT1 e NAT2 sono stati coinvolti nello sviluppo del cancro alla vescica, del colon-retto, della mammella, della testa e del collo, del polmone e della prostata, spesso con risultati controversi. Per esempio, il fenotipo acetilatore lento è stato coinvolto nello sviluppo del cancro della vescica, mentre il fenotipo acetilatore veloce è stato associato con il cancro del colon (*Hein, 2002*). Questa discrepanza può essere dovuta alla diversa patogenesi dei due tumori. Infatti, NAT2 disattiva le ammine aromatiche, il cui accumulo nella vescica è cancerogeno, ma lo stesso enzima attiva le ammine eterocicliche, che sono coinvolte nel tumore del colon. Pertanto, una riduzione dell'attività NAT2 favorisce il cancro della vescica, mentre può esercitare un effetto protettivo nel caso di cancro al colon. Risultati opposti ottenuti sullo stesso tipo di cancro sono più difficili da spiegare, come quelli riportati per il cancro polmonare (*Hein et al., 2000a, b*) e anche per MM.

I genotipi NAT2 sono stati tra i primi polimorfismi implicati nello sviluppo MM, ma i risultati sono stati contraddittori: il fenotipo acetilatore veloce è stato segnalato come un fattore di rischio nella popolazione italiana e un fattore protettivo nella popolazione finlandese (*Hirvonen et al., 1995; Neri et al., 2005*). Il numero molto basso di casi e controlli utilizzati in entrambi questi studi e l'eterogeneità di tali risultati ci hanno spinto ad approfondire l'associazione in un insieme indipendente di casi e controlli. Abbiamo così analizzato i genotipi NAT2 in un gruppo di pazienti e controlli di Casale Monferrato. Ulteriori soggetti provenienti dalla Liguria sono stati sottoposti a genotipizzazione, ed è stata effettuata un'analisi combinata di questi dati.

I risultati di due aree del Nord Italia erano concordanti, e dopo la ri-analisi NAT2 "acetilatori veloci" hanno mostrato un aumento del rischio MM, anche se la significatività statistica non è stata raggiunta. I dati mostrano che i genotipi NAT2 non hanno un forte effetto sulla suscettibilità MM, anche se è possibile che un maggior numero di casi e controlli consentirebbe di raggiungere la significatività statistica. Inoltre, il meccanismo relativo al ruolo per NAT2 nello sviluppo di MM è poco chiaro. L'amianto non è un substrato NAT2, nemmeno arilammina o l'esposizione ad ammina eterociclica sono mai state associate con lo sviluppo MM.

È stato ipotizzato che NAT2 può essere coinvolto nella carcinogenesi attraverso il metabolismo dei folati: NAT1 e NAT2 può acetilare il para aminobenzoico L glutammato, un catabolita folato

(Wang *et al*, 2005.). L'associazione tra fenotipi acetilatori e rischio di MM è stato ipotizzato essere mediata dalla fase di acetilazione nella interconversione di poliammine (Hirvonen *et al*, 1995; Seiler and Bolkenius, 1985).

In conclusione, l'ipotesi di un ruolo di un'associazione di polimorfismi NAT2 nella suscettibilità l'MM può richiedere ulteriori indagini.

L'identificazione dei genotipi a rischio può permettere:

- una miglior stima del rischio in merito all'esposizione all'amianto;
- un miglioramento delle conoscenze sui meccanismi di cancerogenesi dell'asbesto;
- l'identificazione precoce della malattia nei soggetti ad alto rischio.

Infine, questo progetto ci ha permesso di allestire una genoteca unica di casi di mesotelioma pleurico e relativi controlli, provenienti da un'area caratterizzata da elevata esposizione all'amianto, per i quali l'esposizione è stata accuratamente valutata. A nostra conoscenza, una simile banca dati non è mai stata allestita fino ad ora e potrà permettere nel tempo la raccolta di notevoli informazioni di carattere genetico ed epidemiologico.

Sono attualmente in corso estrazioni di DNA e di RNA da tessuti pleurici, per poter effettuare tramite esperimenti futuri, la valutazione dell'espressione del gene XRCC1.

Riferimenti Bibliografici

Amendola P., Belli S., Binazzi A., Cavalleri A., Comba P., Mastrantonio M., Trinca S., **“Mortality from malignant pleural neoplasms in Broni (Pavia), 1980-1997”**, *Epidemiol Prev.*; 2003; **27**: 86-90.

Apostolou S., Mitsuuchi Y., Testa J. R., **“Association of the 15-kDa selenoprotein gene (SEP15) with malignant mesothelioma”**, *Am. J. Hum. Genet.*; 2001; **65** (suppl) Abstract 384:249.

Apostolou S., O Klein J., Mitsuuchi Y., Shetler J., Poulikakos P., Jhanwar S., Kruger W., Testa J. R., **“Growth inhibition and induction of apoptosis in mesothelioma cells by selenium and dependence on selenoprotein SEP15 genotype”**; *Oncogene*; 2004; **23**: 5032-5040.

Bewick MA., Conlon MS., Lafrenie RM., **“Haplotypes of XRCC1 and survival outcome in patients with metastatic breast cancer”**; *Breast Cancer Res Treat.*; 2009 Jan 7.

Boiteux S., Radicella J. P., **“The human OGG1 gene: structure, functions and its implication in the process of carcinogenesis”**; *Arch. Biochem. Biophys.*; 2000; **377**: 1-8.

Burmeister B., Schwerdtle T., Poser I., Hoffmann E., Hartwig A., Muller WU., Rettenmeier AW., Seemayer NH., Dopp E., **“Effects of asbestos on initiation of DNA damage, induction of DNA-strand breaks, P53-expression and apoptosis in primary, SV40-transformed and malignant human mesothelial cells”**, *Mutat Res.*; 2004; **558**: 81-92.

Butkiewicz D., Rusin M., Enewold L., Shields P. G., Chorazy M., Harris C. C., **“Genetic polymorphisms in DNA repair genes and risk of lung cancer”**; *Carcinogenesis*; 2001; **22**: 593-7.

Cacciotti P., Libener R., Betta P., Martini F., Porta C., Procopio A., Strizzi L., Penengo I., Tognon M., Mutti L., Gaudino G., **“SV40 replication in human mesothelial cells induces HGF/Met receptor activation: a model for viral-related carcinogenesis of human malignant mesothelioma”**; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*; 2001; **98**: 12032-7.

Cardon LR., Palmer LL., **“Population stratification and spurious allelic association”**, *Lancet*; 2003; **361**: 598-604.

Ceresoli GL., Gridelli C., Santoro A., **“Multidisciplinary treatment of malignant pleural mesothelioma”**; *The Oncologist*; 2007; **12**: 850-863.

Chen Q., Marsh J., Ames B., Mossman B., **“Detection of 8-oxo-2'-deoxyguanosine, a marker of oxidative DNA damage, in culture medium from human mesothelial cells exposed to crocidolite asbestos”**; *Carcinogenesis*; 1996; **17**: 2525-7.

Chen S., Tang D., Xue K., Xu L., Ma G., Hsu Y., Cho SS., **“DNA repair gene XRCC1 and XPD polymorphisms and risk of lung cancer in a Chinese population”**; *Carcinogenesis*; 2002; **23**: 1321-5.

Cheng L., Spitz M. R., Hon W. K., Wei Q., **“Reduced expression levels of nucleotide excision repair genes in lung cancer: a case control analysis”**; *Carcinogenesis*; 2000; **21**: 1527-30.

Chiappino G., Sebastien P., Todaro A., **“Atmospheric asbestos pollution in the urban environment: Milan, Casale Monferrato, Brescia, Ancona, Bologna and Florence”**; *Med Lav.*; 1991 Sep-Oct; **82** (5): 424-38.

Cicala C., Pompetti F., Carbone M., **“SV40 induces mesotheliomas in hamsters”**; *Am. J. Pathol.*; 1993; **142**: 1524-1533.

Ciuffreda L., Franchini L., Mistrangelo M., Novarino A., **“Predisposizione genetica nelle neoplasie del colon e della mammella”**; *Medicine Doctor.*; 2007; **25**.

Coviello V., Carbonara M., Bisceglia L., Di Pierri C., Ferri GM., Lo Izzo A., Porro A., Sivo D., Assennato G., **“Mortality in a cohort of asbestos cement workers in Bari”**; *Epidemiol Prev.*; 2002; **26**: 65-70.

Cugell DW., Kamp DW., **“Asbestos and the pleura: a review”**; *Chest*; 2004; **125**: 1103-17

David-Beabes G. L., Lunn R. M., London S. J., **“No association between the XPD (Lys751Gln) polymorphism or the XRCC3 (Thr241Met) polymorphism and lung cancer risk”**; *Cancer Epidemiol. Biomar.*; 2001; **10**: 911-2.

Deligezer U., Dalay N., **“Association of the XRCC1 gene polymorphisms with cancer risk in Turkish breast cancer patients”**; *Exp Mol Med.*; 2004; **36**: 572-5.

Dherin C., Radicella JP., Dizdaroglu M., Boiteux S., **“Excision of oxidatively damaged DNA base by the human alpha-hOGG1 protein and polymorphic alpha-OGG1 (Ser326Cys) which is frequently found in human populations”**; *Nucl. Acids Res*; 1999; **27**: 4001-4007.

Dianzani I., Gibello L., Biava A., Giordano M., Bertolotti M., Betti M., Ferrante D., Guarrera S., Betta GP., Mirabelli D., Matullo G., Magnani C., **“Polymorphisms in DNA repair genes as risk factors for asbestos-related malignant mesothelioma in a general population study”**; *Mutat Res.*; 2006; **599**: 124-34.

Ding X., Yang J., Hu S., Wu X., Li Q., **“Evaluation of p53, p21waf1, and PCNA in the diagnosis on lung cancer”**; *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi*; 2001; **22**: 54-7.

Divine KK., Gilliland FD., Crowell RE., Stidley CA., Bocklage TJ., Cook DL., Belinsky SA., **“The XRCC1 399 glutamine allele is a risk factor for adenocarcinoma of the lung”**; *Mutat Res.*; 2001 Jan 5; **461** (4): 273-8.

Duell E. J., Millikan R. C., Pittman G. S., Winkel S., Lunn R. M. Tse C. K., Eaton A., Mohernweiser H.W., Newman B., Bell D.A. **“Polymorphism in the DNA repair gene XRCC1 and breast cancer”**; *Cancer Epidemiol Biomar.*; 2001; **10**: 217-22.

Esteller M., Herman J. G., **“Generating mutations but providing chemosensitivity: the role of O⁶-methylguanine DNA methyltransferase in human cancer”**; *Oncogene*; 2004; **24**: 1-8.

Ferrante D., Bertolotti M., Todesco A., Mirabelli D., Terracini B., Magnani C., **“Cancer Mortality and Incidence of Mesothelioma in a Cohort of Wives of Asbestos Workers in Casale Monferrato, Italy”**; *Environ Health Perspect.*; 2007, **115**: 1401-1405.

Fung H., Kow YW., Van Houten B., Mossman BT., **“Patterns of 8-hydroxydeoxyguanosine formation in DNA and indications of oxidative stress in rat and human pleural mesothelial cells after exposure to crocidolite asbestos”**; *Carcinogenesis*; 1997; **18**: 825-32.

Gamble JF., Gibbs GW., **“An evaluation of the risks of lung cancer and mesothelioma from exposure to amphibole cleavage fragments”**; *Regul Toxicol Pharmacol.*; 2008 Oct; **52** (1 Suppl): S154-86.

Gasparri A., Pizzo AM., Gorini G., Seniori Costantini A., Silvestri S., Ciapini C., Innocenti A., Berry G., **“Prediction of mesothelioma and lung cancer in a cohort of asbestos exposed workers”**; *Eur J Epidemiol*; 2008; **23** (8): 541-6.

Gennaro V., Montanaro F., Lazzarotto A., Bianchelli M., Celesia MV., Canessa PA., **“Mesothelioma registry of the Liguria region. Incidence and occupational etiology in a high risk area”**; *Epidemiol Prev*; 2000; **24**: 213-8.

Gennaro V., Ugolini D., Viarengo P., Benfatto L., Bianchelli M., Lazzarotto A., Montanaro F., Puntoni R., **“Incidence of pleural mesothelioma in Liguria Region, Italy (1996-2002)”**; *Eur J Cancer*; 2005; **41**: 2709-14.

González JR., Armengol L., Solé X., Guinó E., Mercader JM., Estivill X., Moreno V., **“SNPassoc: an R package to perform whole genome association studies”**; *Bioinformatics*; 2007; **23**: 654-655.

Hao B., Miao X., Li Y., Zhang X., Sun T., Liang G., Zhao Y., Zhou Y., Wang H., Chen X., Zhang L., Tan W., Wei Q., Lin D., He F., **“A novel T-77C polymorphism in DNA repair gene XRCC1 contributes to diminished promoter activity and increased risk of non-small cell lung cancer”**; *Oncogene*; 2006 Jun 15; **25**: 3613-20.

Hein D., Doll M., Fretland A., Leff M., Webb S., Xiao G., Devanaboyina U., Nangju N., Feng Y., **“Molecular genetics and epidemiology of the NAT1 and NAT2 acetylation polymorphism”**; *Cancer Epidemiol. Biomark.*; 2000; **9**: 29-42.

Hibi K., Takahashi T., Yamakawa K., Ueda R., Sekido Y., Aryoshi Y., Suyama M., Takagi H., Nakamura Y., **“Three distinct regions involved in 3p deletion in human lung cancer”**; *Oncogene*; 1992; **7**: 445-9.

Hillerdal G., **“Mesothelioma: cases associated with non-occupational and low dose exposure”**; *Occup. Environ. Med.*; 1999; **56**: 505-513.

Hirvonen A., Pelin K., Tammilehto L., Karjalainen A., Mattson K., Linnainmaa K., **“Inherited GSTM1 and NAT2 defect as concurrent risk modifiers in asbestos-related human malignant mesothelioma”**; *Cancer Res.*; 1995; **55**: 2981-2983.

Hirvonen A., Saarikoski S., Linnainmaa K., Koskinen K., Husgafvel-Pursiainen K., Mattson K., Vainio H., **“Glutathione S-transferase and N-acetyltransferase genotypes and asbestos-associated pulmonary disorders”**; *J. Natl. Cancer I.*; 1996; **88**, No. 24.

Ho T., Li G., Lu J., Zhao C., Wei Q., Sturgis EM., **“Association of XRCC1 polymorphisms and risk of differentiated thyroid carcinoma: a case-control analysis”**; *Thyroid.*; 2009 Feb 19; **2**: 129-35.

Hosoe S., Shigedo Y., Ueno K., Tachibana I., Osaki T., Tanio Y., Kawase I., Kamakawa k., Nakamura Y., Kishimoto T., **“Detailed deletion mapping of the short arm of chromosome 3 in small cells and non-small cell carcinoma of the lung”**; *Lung Cancer*; 1994; **10**: 297-305.

Hou S. M., Falt S., Angelini S., Yang k., Nyberg F., Lambert B., Hemminki K., **“The XPD variant alleles are associated with increased aromatic DNA adduct level and lung cancer risk”**; *Carcinogenesis*; 2002; **23**: 599-603.

Hou S. M., Ryk C., Kannio A., Angelini S., Falt S., Nyberg F., **“Husgafvel-Pursiainem K. Influence of common XPD and XRCC1 variant alleles on p53 mutation in lung tumors”**; *Environ. Mol. Mutagen.*; 2003; **41**: 37-42.

Huang J., Ye F., Chen H., Lu W., Xie X., **“The nonsynonymous single nucleotide polymorphisms of DNA repair gene XRCC1 and susceptibility to the development of cervical carcinoma and high-risk human papillomavirus infection”**; *Int J Gynecol Cancer*; 2007; **17**: 668-75.

Hung J., Brennan P., Canzian F., Szeszenia-Dabrowska N., Zaridze D., Lissowska J., Rudnai P., Fabianova E., Mates D., Foretova L., Janout V., Bencko V., Chabrier A., Borel S., Hall J., Boffetta P., **“Large-scale investigation of base excision repair genetic polymorphism and lung cancer risk in a multicenter study”**; *J. Natl. Cancer I.*; 2005; **97** (8).

Janssen K., Schlink K., Gotte W., Hipper B., Kaina B., Oesch F., **“DNA repair activity of 8-oxoguanine DNA glycosylase 1 in human lymphocytes is not dependent on genetic polymorphism Ser326/Cys326”**; *Mutat Res*; 2001; **486**: 207-216.

Jensen C. G., Jensen L. C., Rieder C. L., Cole R. W., Ault J. G., **“Long crocidolite asbestos fibers cause polyploidy by sterically blocking cytokinesis”**; *Carcinogenesis*; 1996 **17**: 2013-21.

Kelsey KT., Park S., Nelson HH., Karagas MR., **“A population-based case-control study of the XRCC1 Arg399Gln polymorphism and susceptibility to bladder cancer”**; *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.*; 2004; **13**: 1337-41.

Kielkowski D., Nelson G., Rees D., **“Risk of mesothelioma from exposure to crocidolite asbestos: a 1995 update of a South African mortality study”**; *Occup. Environ. Med.*; 2000; **57**: 563-567.

King C. R., Yu J., Freimuth R. R., McLeod H. L., Marsh S., **“Interethnic variability of ERCC2 polymorphisms”**; *Pharmacogenomics*; 2005; **5**: 54-59.

Kiran M., Saxena R., Chawla YK., Kaur J., **“Polymorphism of DNA repair gene XRCC1 and hepatitis-related hepatocellular carcinoma risk in Indian population”**; *Mol Cell Biochem.*; 2009 Feb 5.

Kohno T., Shinmura K., Tosaka M., Tani M., Kim S., Sugimura H., Nohmi T., Kasai H., Yokota J. Genetic polymorphism and alternative splicing of the hOGG1 gene, that is involved in the repair of 8-hydroxyguanine in damaged DNA. *Oncogene* 16: 3219-3225, 1998.

Kumaraswamy E., Malykh A., Korotkov K., Kozyavkin S., Hu Y., **“Structure-expression relationship of the 15-Kda selenoprotein gene”**; *J. Biol. Chem.*; 2000; **275**, No. 45.

Landi S., Gemignani F., Neri M., Barale R., Bonassi S., Bottari F., Canessa PA., Canzian F., Ceppi M., Filiberti R., Ivaldi GP., Mencoboni M., Scaruffi P., Tonini GP., Mutti L., Puntoni R., **“Polymorphisms of glutathione-S-transferase M1 and manganese superoxide dismutase are associated with the risk of malignant pleural mesothelioma”**; *Int J Cancer*; 2007; **120**: 2739-43.

Lee SG., Kim B., Choi J., Kim C., Lee I., Song K., **“Genetic polymorphisms of XRCC1 and risk of gastric cancer”**; *Cancer Lett.*; 2002; **187**:53-60.

Le Marchand L., Donlon T., Lum-Jones A., Seifried A., Wilkens L., **“Association of the hOGG1 Ser326Cys polymorphism with lung cancer risk”**; *Cancer Epidemiol. Biomar.*; 2002; **11**: 409-412,.

Lescure A., Gautheret D., Carbon P., Krol A., **“Novel selenoproteins identified in silico and in vivo by using a conserved RNA structural motif”**; *J. Biol. Chem.*;1999; **274**: 38147-54.

Livak KJ., **“Allelic discrimination using fluorogenic probes and the 5' nuclease assay”**; *Genetic Analysis Biomol. Eng.*; 1999; **14** (5-6): 143-149.

Lu J. C., Shi L. Y., Liao Y. D., Zhou S., Wang X. Y., Li Y. Y., Bin X. N., Zeng B. H., Chen J. K., **“A study on the role of DNA repair gene O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase in the development on human cancer”**; *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi*; 2003; **24** (1): 40-4.

Lunn R.M., Langlois R.G., Hsieh L.L., Thompson C.L., Bell D.A., **“XRCC1 polymorphism: effects on aflatoxin B₁-DNA adducts and glycophorin A variant frequency”**; *Cancer Res.*; 1999; **59**: 2557-61.

Ma X., Jin Q., Forsti A., Hemminki K., Kumar R., **“Single nucleotide polymorphism analyses of the human proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and flap endonuclease (FEN1) genes”**; *Int. J. Cancer*; 2000; **88**: 938-942.

Magnani C., Terracini B., Ivaldi C., Botta M., Budel P., Mancini A., Zanetti R., **“A cohort study on mortality among wives of workers in the asbestos cement industry in Casale Monferrato, Italy”**, *Br. J. Ind. Med.*; 1993; **50**: 779-84.

Magnani C., Terracini B., Ivaldi C., Botta M., Mancini A., Andrion A., **“Pleural malignant mesothelioma and non-occupational exposure to asbestos in Casale Monferrato, Italy”**; *Occup. Environ. Med.*; 1995; **52**: 362-7.

Magnani C., Terracini B., Ivaldi C., Mancini A., Botta M., **“Tumor mortality and from other causes in asbestos cement workers at the Casale Monferrato plant”**; *Med. Lav.*; 1996; **87**: 133-46.

Magnani C., Ivaldi C., Botta M., Terracini B., **“Pleural malignant mesothelioma and environmental asbestos exposure in Casale Monferrato, Piedmont. Preliminary analysis of a case-control study”**; *Med. Lav.*; 1997; **88**: 302-9.

Magnani C., Leporati M., **“Mortality from lung cancer and population risk attributable to asbestos in an asbestos cement manufacturing town in Italy”**; *Occup. Environ. Med.*; 1998; **55**: 111-4.

Magnani C., Agudo A., Gonzalez C. A., Andrion A., Calleja A., Chellini E., Dalmaso P., Escolar A., Hernandez S., Ivaldi C., Mirabelli D., Ramirez J., Turuguet D., Usel M., Terracini B., **“Multicentric study on malignant pleural mesothelioma and non-occupational exposure to asbestos”**; *Brit. J. Cancer*; 2000; **83**: 104-11.

Magnani C., Dalmaso P., Biggeri A., Ivaldi C., Mirabelli D., Terracini B., **“Increased risk of malignant mesothelioma of the pleura after residential or domestic exposure to asbestos: a case-control study in Casale Monferrato, Italy”**; *Environ Health Perspect.*; 2001; **109**:915-919

Magnani C., Viscomi S., Dalmaso P., Ivaldi C., Mirabelli D., Terracini B., **“Survival after pleural malignant mesothelioma: a population-based study in Italy”**; *Tumori*; 2002; **88**: 266-269.

Magnani C., Ferrante D., Barone Adesi F., Bertolotti M., Todesco A., Mirabelli D., Terracini B., **“Cancer risk after cessation of asbestos exposure. A cohort study of Italian asbestos cement workers”**; *Occup Environ Med.*; 2007; **115**:1401-1405.

Marconi A., Cecchetti G., Barbieri M., **“Airborne mineral fibre concentrations in an urban area near an asbestos-cement plant”**; *IARC Sci Publ.*; 1989; **90**:336-46.

Marczynski B., Rozynek P., Kraus T., Schlosser S., Raithel HJ., Baur X., **“Levels of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in DNA of white blood cells from workers highly exposed to asbestos in Germany”**; *Mutat Res.*; 2000; **468**:195-202.

Marinaccio A., Binazzi A., Cauzillo G., Cavone D., Zotti RD., Ferrante P., Gennaro V., Gorini G., Menegozzo M., Mensi C., Merler E., Mirabelli D., Montanaro F., Musti M., Pannelli F., Romanelli A., Scarselli A., Tumino R., **“Analysis of latency time and its determinants in asbestos related malignant mesothelioma cases of the Italian register”**; *Italian Mesothelioma Register (ReNaM) Working Group. Eur J Cancer.*; 2007 Dec; **43**(18): 2722-8.

Marsin S., Vidal A.E., Sossou M., Menissier-de Murcia J., Le Page F., Boiteux S., de Murcia G., Radicella J.P., **“Role of XRCC1 in the coordination and stimulation of oxidative DNA damage repair initiated by the DNA glycosylase hOGG1”**; *J. Biol. Chem.*; 2003; **278**: 44068-74.

Mastrantonio M., Belli S., Binazzi A., Carboni M., Comba P., Fusco P., Grignoli M., Iavarone I., Martuzzi M., Nesti M., Trinca S., Uccelli R., **“Rapporto ISTISAN 2002/12 - La mortalità per tumore maligno della pleura nei comuni italiani (1988-1997)”**

Matsuo K., Hamajima N., Suzuki R., Andoh M., Nakamura S., Seto M., Morishimae Y., Tajima K., **“Lack of association between DNA base excision repair gene XRCC1 Arg399Gln polymorphism and risk of malignant lymphoma in Japan”**; *Cancer Genet Cytogen.*; 2004; **149**: 77-80.

Matullo G., Guarrera S., Carturan S., Peluso M., Maleville C., Davico L., Piazza A., Vineis P., **“DNA repair gene polymorphism, bulky DNA adducts in white blood cells and bladder cancer in a case-control study”**; *Int. J. Cancer*; 2001 a ; **92**: 562-67.

Matullo G., Palli D., Peluso M., Guarrera S., Carturan S., Celentano E., Krogh V., Munnia A., Tumino R., Polidoro S., Piazza A., Vineis P., **“XRCC1, XRCC3, XPD gene polymorphism, smoking and P-DNA adducts in a sample of healthy subjects”**; *Carcinogenesis*; 2001 b; **22**: 1437-45.

Matullo G., Berwick N., Vineis P., **“Gene-environment interactions: how many false positives?”**; *J. Natl. Cancer I*; 2005; **97**: 550-551.

Maule MM., Magnani C., Dalmaso P., Mirabelli D., Merletti F., Biggeri A., **“Modeling mesothelioma risk associated with environmental asbestos exposure”**; *Environ Health Perspect*; 2007; **115**:1066-71.

Mirabelli D., Stura A., Gangemi M., Bertolotti M., Maule MM., Magnani C., **“Incidence of malignant mesothelioma in Piedmont, 1990-2001”**; *Epidemiol Prev.*; 2007 Mar-Jun; **31**(2-3): 132-8.

Mohrenweiser H., Jones I.M., **“Variation in DNA repair is a factor in cancer susceptibility: a paradigm for the promises and peril of individual and population risk estimation?”**; *Mutat. Res.*; 1998; **400**: 15-24.

Montanaro F, Rosato R, Gangemi M, Roberti S, Ricceri F, Merler E, Gennaro V, Romanelli A, Chellini E, Pascucci C, Musti M, Nicita C, Barbieri PG, Marinaccio A, Magnani C, Mirabelli D., **“Survival of pleural malignant mesothelioma in Italy: a population-based study”**; *Int J Cancer.*; 2009 Jan 1; **124**(1): 201-7.

Neri M., Filiberti R., Taioli E., Garte S., Paracchini V., Bolognesi C., Canessa P.A., Fontana V., Ivaldi G.P., Verna A., Bonassi S., Puntoni R., **“Pleural malignant mesothelioma, genetic susceptibility and asbestos exposure”**; *Mutat Res.*; 2005; **592**: 36-44.

Patel AV., Calle EE., Pavluck AL., Feigelson HS., Thun MJ., Rodriguez C., **“A prospective study of XRCC1 (X-ray cross-complementing group 1) polymorphisms and breast cancer risk”**; *Breast Cancer Res.*; 2005; **7**:R1168-73.

Ratnasinghe D., Yao S.X., Tangrea J.A., Qiao Y.L., Andersen M. R., Barret M. J., Giffen C.A., Erozan Y., Tockman M.S., Taylor P.R., **“Polymorphisms of the DNA repair gene XRCC1 and lung cancer risk”**; *Cancer Epidemiol. Biomark.*; 2001; **10**: 119-23.

Rybicki B. A., Conti D. V., Moreira A., Cicek M., Casey G., Witte J.S., **“DNA repair gene XRCC1 and XPD polymorphism and risk of prostate cancer”**; *Cancer Epidemiol. Biomark.*; 2004; **13**: 23-9.

Schreiber V., Amé JC., Dollé P., Schultz I., Rinaldi B., Fraulob V., Ménissier-de-Murcia J., de Murcia G., **“Poly(ADP-ribose) polymerase-2 (PARP-2) is required for efficient base excision DNA repair in association with PARP-1 and XRCC1”**; *J. Biol. Chem.*; 2002; **277**: 23028-36.

Shen M.R., Jones I.M., Mohrenweiser H., **“Non conservative amino acid substitution variants exist at polymorphic frequency in DNA repair genes in healthy humans”**; *Cancer Res.*;1998; **58**: 604-8.

Shen H., Xu Y., Qian Y., Yu R., Zhou L., Wang X., Spitz M.R., Wei Q., **“Polymorphism of DNA repair gene XRCC1 and risk of gastric cancer in a Chinese population”**; *Int. J. Cancer*; 2000; **88**: 601-6.

Shen M, Hung RJ, Brennan P, Malaveille C, Donato F, Placidi D, Carta A, Hautefeuille A, Boffetta P, Porru S, **“Polymorphisms of the DNA repair genes XRCC1, XRCC3, XPD, interaction with environmental exposures, and bladder cancer risk in a case-control study in northern Italy”**; *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.*; 2003; **12**: 1234-40.

Shields P.G., Harris C.C., **“Cancer risk and low-penetrance susceptibility genes in gene-environment interactions”**; *J. Clin. Oncol.*; 2000; **18**: 2309-15.

Shu XO., Cai Q., Gao YT., Wen W., Jin F., Zheng W., **“A population-based case-control study of the Arg399Gln polymorphism in DNA repair gene XRCC1 and risk of breast cancer”**; *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.*; 2003; **12**: 1462-7.

Smith TR., Miller MS., Lohman K., Lange EM., Case LD., Mohrenweiser HW., Hu JJ., **“Polymorphisms of XRCC1 and XRCC3 genes and susceptibility to breast cancer”**; *Cancer Lett.*; 2003; **190**: 183-90.

Solé X., Guinó E., Valls J., Iniesta R., Moreno V., **“SNPStats: a web tool for the analysis of association studies”**; *Bioinformatics*; 2006; **22**: 1928-1929.

Sturgis E.M., Dahlstrom K.R., Spitz M.R., Wei Q., **“DNA repair gene ERCC1 and ERCC2/XPD polymorphism and risk of squamous cell carcinoma of the head and neck”**; *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.*; 2002; **128**: 1084-8.

Vidal A.E., Boiteux S., Hickson I.D., Radicella J.P., **“XRCC1 coordinates the initial and late stages of DNA abasic site repair through protein-protein interaction”**; *EMBO J.*; 2001; **20**: 6530-39.

Vogelzang NJ., Rusthoven JJ., Symanowski J., Denham C., Kaukel E., Ruffie P., Gatzemeier U., Boyer M., Emri S., Manegold C., Niyikiza C., Paoletti P., **“Phase III study of pemetrexed in combination with cisplatin versus cisplatin alone in patients with malignant pleural mesothelioma”**; *J Clin Oncol.*; 2003; **21**:2636-44.

Wacholder S., Chanock S., Garcia-Closas M., El Ghormli L., Rothman N., **“Assessing the probability that a positive report is false: an approach for molecular epidemiology studies”**; *J Natl Cancer Inst.*; 2004; **96**: 434-42.

Wagner JC., Sleggs CA. & Marchand P., **“Diffuse pleural mesothelioma and asbestos exposure in the North Western Cape Province”**; *Brit. J. Indust. Med.*; 1960; **17**:260-271

Wang D., Kreutzer D.A., Essigmann J.M., **“Mutagenicity and repair of oxidative DNA damage: insights from studies using defined lesions”**; *Mutat. Res.*;1998; **400**: 99-115.

Wang Y., Spitz M. R., Zhu Y., Dong Q., Shete S., Wu X., **“From genotype to phenotype: correlating XRCC1 polymorphism with mutagen sensitivity”**; *DNA Repair*; 2003; **2**: 901-908.

Whitehouse C. J., Taylor R.M., Thistlethwaite A., Zhang H., Kamiri-Busheri F., Lasko D. D., Weinfeld M., Caldecott K.W., **“XRCC1 stimulates human polynucleotide kinase activity at damaged DNA termini and accelerates DNA single-strand break repair”**; *Cell*; 2001; **104**: 107-17.

Wild C. P., Law G. R., **“Roman E. Molecular epidemiology and cancer: promising areas for future research in the post-genomic era”**; *Mutat. Res.*; 2002; **499**: 3-12.

Xiao G.H., Jeffers M., Bellacosa A., Mitsuuchi Y., Vande Woude G.F., Testa J.R., **“Anti-apoptotic signaling by hepatocyte growth factor/Met via the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and mitogen-activated protein kinase pathways”**; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*; 2001; **98**: 247-52.

Yamada N., Hinz J., Kopf V., Segalle K., Thompson L., **“XRCC3 ATPase activity is required for normal XRCC3-Rad51C complex dynamics and homologous recombination”**; *J. Biol. Chem.*; 2004; **279**: 23250-23254.

Yeh CC., Sung FC., Tang R., Chang-Chieh CR., Hsieh LL., **“Polymorphisms of the XRCC1, XRCC3, & XPD genes, and colorectal cancer risk: a case-control study in Taiwan”**; *BMC Cancer*.; 2005; **5**:12.

Yokota J., Sugimura T., **“Multiple steps in carcinogenesis involving alterations of multiple tumour suppressor genes”**; *FASEB J.*; 1993; **7**: 920-5.

Zhou W., Liu G., Miller D., Thurston S., Xu L., Wain J., Lynch T., Su L., Christiani D., **“Polymorphism in the DNA repair genes XRCC1 and ERCC2, smocking and lung cancer risk”**; *Cancer Epidemiol. Biomar.*; 2003; **12**: 359-65.

Elenco dei siti Internet da cui è stato tratto il materiale:

<http://www.assoamianto.it>

<http://www.mesoteliomamaligno.it/info.htm>

<http://www.sicurezzaonline.it>

<http://www.airc.it>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?CMD=search&DB=pubmed>

<http://it.wikipedia.org>

<http://jnci.oxfordjournals.org/cgi/content/abstract/96/6/434>

<http://medicinaonline.altervista.org/Mesoteliomi.htm>

<http://www.hapmap.org>

<http://www.inail.it>

Elenco dei libri consultati:

Khoury MJ, Beaty TH, Cohen BH, “*Fundamentals of Genetic Epidemiology*”;
Oxford University press. 1993

Rothman KJ, “*Modern Epidemiology*”;
Little, Brown and Company. Boston/Toronto. 1986

Hayat MA, “*Handbook of Immunoistochemistry and in situ Hibridization of Human Carcinomas VOL. 1 - Molecular Genetics: lung and breast carcinomas*”;
Elsevier. 2004

Sartelli M. - Scibè R., “*Il Trattamento Chirurgico del Carcinoma del Colon-Retto*”;
ALPES. 2007

Ringraziamenti

Ringrazio il Prof. Corrado Magnani per la fiducia dimostratami fin dall'inizio e per avermi dato l'opportunità di frequentare il suo ufficio di Statistica Medica, consentendomi di realizzare da sempre il sogno di lavorare nella ricerca e ampliare i miei orizzonti, portando così a termine il corso di studi sino al dottorato.

Un ringraziamento alla Prof.ssa Irma Dianzani e ad Elisa ed Anna del Laboratorio di Patologia Genetica per il contributo dato alla realizzazione degli esperimenti e soprattutto alla Dott.ssa Marta Betti per i preziosi consigli sulla tesi, per quanto concerne gli aspetti genetici e per quanto accade nel lavoro di ogni giorno.

Un grazie particolare alla Dott. Daniela Ferrante, carissima amica, per la sua costante disponibilità, mi è stata vicina fin dall'inizio, trasmettendomi con pazienza le giuste conoscenze e per avermi seguita ed aiutata in tutte le fasi di stesura della tesi, per avermi sostenuta sempre.

A mio fratello ed al suo aiuto incondizionato.

A mia nonna che non può far altro che accettare il mio umore ballerino e che con assidua presenza sa ascoltarmi e capirmi, nei momenti di sconforto.



XRCC1 and ERCC1 variants modify malignant mesothelioma risk: A case–control study

M. Betti^a, D. Ferrante^b, M. Padoan^b, S. Guarrera^c, M. Giordano^d, A. Aspesi^a, D. Mirabelli^{e,f}, C. Casadio^g, F. Ardisson^h, E. Ruffiniⁱ, P.G. Betta^j, R. Libener^j, R. Guaschino^k, G. Matullo^{c,l}, E. Piccolini^m, C. Magnani^b, I. Dianzani^{a,*}

^a Laboratory of Genetic Pathology, Department of Medical Sciences, University of Piemonte Orientale, Novara, Italy

^b CPO-Piemonte and Unit of Medical Statistics and Epidemiology, Department of Medical Sciences, University of Piemonte Orientale, Novara, Italy

^c Human Genetics Foundation, HuGeF, Turin, Italy

^d Laboratory of Genetics, Department of Medical Sciences, University of Piemonte Orientale, Novara, Italy

^e Interdepartmental Center “G. Scansetti”, University of Turin, Turin, Italy

^f Cancer Epidemiology Unit, CPO Piemonte and University of Turin, Turin, Italy

^g Thoracic Surgery Unit, University of Piemonte Orientale, Novara, Italy

^h Chest Surgery, Department of Clinical and Biological Sciences, University of Turin, Orbassano, Italy

ⁱ Chest Surgery, Department of Clinical Physiopathology, University of Turin, Turin, Italy

^j Pathology Unit, Azienda Ospedaliera Nazionale SS, Antonio e Biagio e Cesare Arrigo, Alessandria, Italy

^k Transfusion Centre, Azienda Ospedaliera Nazionale SS, Antonio e Biagio e Cesare Arrigo, Alessandria, Italy

^l Department of Genetics, Biology and Biochemistry, University of Turin, Turin, Italy

^m Pneumology Unit, Santo Spirito Hospital, Casale Monferrato, Italy

ARTICLE INFO

Article history:

Received 9 August 2010

Received in revised form

10 December 2010

Accepted 14 January 2011

Available online 26 January 2011

Keywords:

Mesothelioma

Asbestos

DNA repair genes

Single nucleotide polymorphisms (SNPs)

Haplotype

ABSTRACT

Malignant pleural mesothelioma (MPM) is a rare aggressive tumor associated with asbestos exposure. The possible role of genetic factors has also been suggested and MPM has been associated with single nucleotide polymorphisms (SNPs) of xenobiotic and oxidative metabolism enzymes. We have identified an association of the DNA repair gene XRCC1 with MPM in the population of Casale Monferrato, a town exposed to high asbestos pollution. To extend this observation we examined 35 SNPs in 15 genes that could be involved in MPM carcinogenicity in 220 MPM patients and 296 controls from two case–control studies conducted in Casale (151 patients, 252 controls) and Turin (69 patients, 44 controls), respectively. Unconditional multivariate logistic regression was used to estimate odds ratios (ORs) and 95% confidence intervals (95% CIs). Two DNA repair genes were associated with MPM, i.e. XRCC1 and ERCC1. Considering asbestos-exposed only, the risk increased with the increasing number of XRCC1-399Q alleles (Casale: OR = 1.44, 95%CI 1.02–2.03; Casale+Turin: OR = 1.34, 95%CI 0.98–1.84) or XRCC1-77T alleles (Casale+Turin: OR = 1.33, 95%CI 0.97–1.81). The XRCC1-TGGGGGAAACAGA haplotype was significantly associated with MPM (Casale: OR = 1.76, 95%CI 1.04–2.96). Patients heterozygotes for ERCC1 N118N showed an increased OR in all subjects (OR = 1.66, 95%CI 1.06–2.60) and in asbestos-exposed only (OR = 1.59, 95%CI 1.01–2.50). When the dominant model was considered (i.e. ERCC1 heterozygotes CT plus homozygotes CC versus homozygotes TT) the risk was statistically significant both in all subjects (OR = 1.61, 95%CI 1.06–2.47) and in asbestos-exposed only (OR = 1.56, 95%CI 1.02–2.40). The combination of ERCC1 N118N and XRCC1 R399Q was statistically significant (Casale: OR = 2.02, 95%CI 1.01–4.05; Casale+Turin: OR = 2.39, 95%CI 1.29–4.43). The association of MPM with DNA repair genes support the hypothesis that an increased susceptibility to DNA damage may favour asbestos carcinogenicity.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Malignant mesothelioma (MM) is a rare and aggressive tumor that arises from mesothelial cells. Most frequent locations are in the order pleura (malignant pleural mesothelioma, MPM) and peri-

toneum. In Western Europe, 5000 patients die of MM each year. In countries where asbestos use has been discontinued or banned, the incidence of MM is increasing and it is expected to peak in the year 2020 [1]. Asbestos represents the main risk factor for the development of MM, but its mechanisms of carcinogenicity are not fully understood. Asbestos fibers could interfere with the mitotic spindle formation of cells resulting in chromosomal abnormalities [2]. Asbestos can also lead to the generation of reactive oxygen species (ROS) either by iron-catalyzed reactions on the surface of

* Corresponding author. Tel.: +39 0321 660644; fax: +39 0321 620421.

E-mail address: irma.dianzani@med.unipmn.it (I. Dianzani).

the fibers or during frustrated phagocytosis [3]. Asbestos-induced oxidative damage has been clearly demonstrated, both *in vitro* and *in vivo*. Its consequences include DNA single-strand breaks and DNA base modifications [4]. Moreover asbestos fibers may induce signal transduction (i.e. activation of NF-KB pathway [5]) and methylation of gene promoters [6].

According to the Italian Mesothelioma Register, that collects data from over 2500 patients, the median latency period between the time of initial asbestos exposure and the development of MPM was about 45 years [7]. The male:female ratio was approximately 3:1, likely due to occupational exposure [8]. Eighty per cent of MPM patients have a history of asbestos exposure, but only 2% to 10% of the individuals with heavy, prolonged asbestos exposure develop MPM [9]. The combined role of genetics and asbestos exposure in familial aggregation is debated [10–12] and has been discussed in two extensive literature reviews [13,14]. Several genetic association studies addressed the identification of the traits that may predispose to asbestos damage susceptibility and MPM [15]. We were the first group to report an association between XRCC1 399Q variant and MPM and to suggest a role of deficient DNA repair in MPM carcinogenesis [16]. In the present paper, we expand the analyses to 35 single nucleotide polymorphisms (SNPs) in 15 genes possibly involved in asbestos carcinogenicity (i.e. DNA repair, redox state control and inflammation). Our data highlight a significant association of MPM with two DNA repair genes, i.e. XRCC1 and ERCC1.

2. Material and methods

2.1. Study subjects

2.1.1. Casale Monferrato panel

We conducted a population based case–control study on MPM within the Local Health Authority (LHA) of Casale Monferrato. This area was characterized by widespread exposure to asbestos in the general population because of an asbestos cement factory that had been active from 1907 to 1986 [17].

The case group included subjects with histologically diagnosed MPM, resident in the LHA of Casale Monferrato, who were recruited between January 2001 and December 2006. Two controls per patient, matched for age (± 18 months) and gender, were randomly selected from the local population using the rosters of the LHA of Casale Monferrato. Trained personnel submitted a standard questionnaire to MPM cases and controls to collect information about demographic variables, life-style, occupational history and asbestos exposure [17]. The evaluation of asbestos exposure was conducted blindly by an industrial hygienist (D. Mirabelli) and summarized as: “certain occupational”, “probable occupational”, “possible occupational”, “household exposure”, “environmental exposure” and “no evidence of exposure”. Exposure was further considered as a binary variable (exposed versus non-exposed). All subjects in the study signed an informed consent form before the interview. Blood samples were collected before therapy in vacutainers with ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) and stored at -20°C until use.

Ninety-four cases and three hundred controls refused to give their blood sample. Consequently, the study involved 151 MPM patients and 252 population controls. Table 1 summarizes the main characteristics of patients and controls who participated in the study. All participants were caucasians with the same ethnic origin, evaluated by place of birth.

2.1.2. Turin panel

We also conducted a hospital-based case–control study on MPM in the Turin area. The case group included subjects with a histolog-

ically confirmed diagnosis of MPM, admitted to the chest surgery units of the San Giovanni Battista (Turin) or the San Luigi Gonzaga (Orbassano) hospitals between January 2004 and October 2008. All cases were resident in Turin or in the province of Turin at the time of diagnosis. After case identification, control was chosen among inpatients within the same hospital (mostly in the general medicine or urology units) of the corresponding case, and had to live in Turin or in the province of Turin at the time of admission and were not affected by neoplastic or respiratory conditions. All study subjects were Caucasians. Patients and controls were interviewed using the same questionnaire described above. Asbestos exposure was evaluated as for the Casale group. All subjects in the study signed an informed consent form. Blood samples were collected and stored as reported above.

We had planned to select one control per patient matched by age (± 24 months) and gender, but no eligible control was found for 25 cases. Thus, the study involved 69 MPM patients and 44 controls. Table 1 summarizes the main characteristics of patients and controls who participated in the study.

2.2. SNP study

2.2.1. SNP selection

SNPs were chosen because some have a significant effect on the transcript (i.e. amino acid substitution or possible splice defect) and/or have been associated with certain cancer types and/or deficient DNA repair [18–25].

In detail, 10 out of 15 genes (14 SNPs) are involved in the repair of DNA damage. Our working hypothesis is that the presence of polymorphic variants could reduce the efficiency of the DNA repair machinery. The unrepaired DNA damage caused by asbestos exposure would result in mutagenesis and cancer.

The *SEP15* gene (one SNP) was analyzed because the encoded selenoprotein is downregulated in 60% MPM cell lines [26].

Moreover, we evaluated two genes (two SNPs) involved in the control of the cellular redox state (*SOD2*, *GPX1*). In this case, our working hypothesis was that a reduced protection from ROS could predispose mesothelial cells to neoplastic transformation.

Our study included also the *OPN* gene (three SNPs) that encodes an inflammatory cytokine, since a higher susceptibility to inflammation might be a risk factor for mesothelioma. High plasma OPN levels have been considered a marker of MPM [27].

For haplotype analyses we studied nine SNPs in *XRCC1* and six SNPs in *ERCC1* and its adjacent gene *RAI*: these SNPs were reported as tag SNPs by Haploview v4.1 on HapMap CEU panel, release #24.

2.2.2. SNP analysis

Genomic DNA was isolated and purified from peripheral blood lymphocytes using QIAamp[®] DNA Blood Maxi Kit (QIAGEN).

We used different genotyping approaches to analyze SNPs involved in the study (Table 2). Most of the polymorphisms (rs1799782, rs3213247, rs12973352, rs2854496, 2307174, rs2023614, rs1799778, rs3213356, rs3213371, rs3213403, rs1799796, rs1799793, rs11615, rs2298881, rs3212948, rs3212965, rs3136820, rs12917, rs3626, rs10412761, rs4803817, rs6966) were genotyped with the PCR-based fluorescence 5' exonuclease assay (TaqMan[®] Genotyping Master Mix, Applied Biosystems). The other polymorphisms (rs25487, rs3213245, rs861539, rs13181, rs1052133, rs1805794, rs101028, rs7687316, rs45594140, rs9138, rs1799725, rs1050450, rs1136410) were genotyped with the SNaPshot assay (SNaPshot[®] Multiplex Kit, Applied Biosystems) that uses a multiplex primer extension technique and primers of different length to analyze at the same time up to eight/ten SNPs.

Table 1
Characteristics of cases and controls in the study.

	Casale Monferrato		Turin ^a	
	Cases (%)	Controls (%)	Cases (%)	Controls (%)
Eligible	245 (100%)	552 (100%)	201 (100%)	44 (100%)
Blood sample given	151 (62%)	252 (46%)	69 (34%)	44 (100%)
Blood sample refused ^a	94 (38%)	300 (54%)	132 (66%)	0
Samples included in the analyses	151 (100%)	252 (100%)	69 (100%)	44 (100%)
Gender				
Males	101 (67%)	173 (69%)	48 (70%)	34 (77%)
Females	50 (33%)	79 (31%)	21 (30%)	10 (23%)
Age (mean ± standard deviation)	66.8 ± 11.5	61.7 ± 11.1	68.9 ± 8.4	68 ± 8.7
Histology				
Epithelioid	102 (68%)		48 (70%)	
Sarcomatous	14 (9%)		8 (12%)	
Mixed	31 (21%)		10 (14%)	
Undefined	2 (1%)		3 (4%)	
Missing	2 (1%)		0	
Asbestos exposure				
Occupational	71 (47%)	111 (44%)	54 (78%)	18 (41%)
Domestic	26 (17%)	24 (10%)	4 (6%)	2 (5%)
Environmental	34 (23%)	59 (23%)	9 (13%)	5 (11%)
Not exposed	2 (1%)	58 (23%)	1 (1.5%)	19 (43%)
Undefined	18 (12%)	0	1 (1.5%)	0

^a Turin study: no eligible control refused blood sample, but 132 cases had confirmation of diagnosis after discharge and had no further admission to the recruiting hospitals.

Table 2
SNPs analyzed in this study.

Gene	Chromosome	Function ^a	rs	Variants
XRCC1	19q13.2	BER	25487	R399Q
			3213245	–77T>C
			1799782	R194W
			3213247	IVS2 G>T
			12973352	IVS2 A>G
			2854496	IVS2 A>G
			2307174	E50E
			2023614	IVS3 C>G
			1799778	IVS3 A>C
			3213356	IVS4 A>G
			3213371	IVS10 C>G
			3213403	3'UTR A>G
			XRCC3	14q32.3
1799796	IVS5 A>G			
ERCC2	19q13.3	NER	13181	K751Q
			1799793	D312N
OGG1	3p26.2	BER	1052133	S326C
ERCC1	19q13.2	NER	11615	N118N
			2298881	IVS1 G>A
			3212948	IVS3 C>G
			3212965	IVS5 C>T
APEX	14q11.2	BER	3136820	D148E
MGMT	10q26	DRR	12917	L84F
PCNA	20p12	BER	3626	3'UTR G>C
NBS1	8q21	DSBR	1805794	E185Q
SEP15	1p31	Selenoprotein	101028	3' UTR G>A
OPN	4q21	Inflammatory Cytokine	7687316	–156delG
			45594140 9138	–66T>C +1239A>C
SOD2	6q25	Mn-Superoxide Dismutase	1799725 (4880)	A16V
GPX1	3p21.3	Glutathione Peroxidase 1	1050450	P198L
PARP (ADPRT)	1q41	BER	1136410	V762A
RAI (PPP1R13L)	19q13.2	Protein phosphatase 1 (inhibitor)	10412761	5'UTR A>G
			4803817	IVS1 A>G
			6966	EX13 A>T

^a BER, base excision repair; NER, nucleotide excision repair; DSBR, double-strand break repair; HR, homologous recombination; DRR, direct reversion repair.


```

01 02 03 04 05 06 07 08 09 10 11 12 13 14 15 16
AGGGGGCGAACCCCGGTGGGGAAAAACAGGTCCGACTG .315
AGGAGCGGCTCTCGGCGAGGAAAAACGCGTACATTCG .217
AGGAGCGGCCCCCGGCGGAAAAATAAGCGCCAACCG .125
GGGAGCAACCGCCGGCGGGGAAAAACGGGTCCGACTG .092
AGGAGCGGCTCTCCGCGGGGCAAAACGGGTCTGACTG .042
AGGAGCGACCCCTCGCGGGGCAAAACGGGTCTGACTG .042
AGGGGGCGAACCCCGGTGGGGAAAAACAGGTCCGACTT .035
AGGGGGCGAACCCCGATGGGGCAAAACGGGTCTGACTG .025
ACAACGACCCCGGCGGGGAAAGCGCGTCCGACTG .025
AGGAGCGGCCCCCGGCGGAAAAATAAGCACCAACCG .017

```

Fig. 1. *XRCC1* tag SNPs (TAG SNPs are loci that capture most of the genetic variation in a region and can be used in association studies to reduce the number of SNPs needed to detect LD-based association between a trait of interest and a region of the genome.) identified using Haploview v4.1. 01: rs3213403; 10: rs3213371; 20: rs3213356; 23: rs1799778; 34: rs2023614; 37: rs2307174; 50: rs2854496; 68: rs12973352; 81: rs3213247.

2.2.3. Quality control

For each SNP, samples with the three genotypes (i.e. homozygous for the wild-type sequence, heterozygous and homozygous for rarer sequence) were directly sequenced and used as internal control in each analysis. Ten per cent of samples were randomly sequenced. Concordance was 100% for all comparisons.

2.3. Sequencing

We sequenced the seventeen exons and exon–intron boundaries of *XRCC1* in ten wild-type homozygous, in ten heterozygous and in ten variant homozygous for SNP R399Q using ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

2.4. Haplotype analysis

By using Haploview v4.1 [28] and the HapMap–CEU panel genotype data (release #24) we identified nine different SNPs as *XRCC1* tag-SNPs and six different SNPs as *ERCC1 RAI* tag-SNPs (Figs. 1 and 2, respectively).

The haplotypes of *XRCC1* and *ERCC1 RAI* were inferred by SHEsis software platform [29]. Haplotype frequency and corresponding standard deviation was obtained from genotype data of each polymorphism with unknown genetic phase, using maximum likelihood estimation. The analyses were performed using HAPLO.STATS software package developed using the R language. Odds ratios (ORs) and 95% confidence intervals (95% CIs) were calculated

```

01 02 03 04 05 06 07 08 09 10 11 12 13 14 15 16
TCCAACAGCGCGTAGC .533
TCCGGCAGAGCGCGCC .183
ACCAACAGCGCGTAGC .108
TCCAGTCACGTTTGCC .042
TCCAGTCACGTTTGCA .042
TCCAGTCACGTTTGCC .017
ACCGGCAGAGCGCGCC .017
TCCGGCAGAACGCGCC .017

```

Fig. 2. *ERCC1 RAI* tag SNPs identified using Haploview v4.1. 01: RAI rs6966; 04: RAI rs4803817; 05: RAI rs10412761; 10: *ERCC1* rs3212965; 15: *ERCC1* rs3212948; 16: *ERCC1* rs2298881.

culated after estimating the number of patients and controls for each haplotype, considering the most frequent haplotype as reference. These analyses were carried out both in the overall sample and in the subgroup of subjects with asbestos exposure. All analyses were adjusted for age and gender.

2.5. *XRCC1* expression

Seventy-one samples of normal pleura were obtained from donors that were subjected to thoracoscopy for a condition different from MPM and signed an informed consent.

Total RNA was extracted from frozen, normal pleural tissues by RNeasy® Plus Mini Kit (QIAGEN) according to the manufacturer's protocol.

cDNA was retrotranscribed from 500 ng of total RNA using random primers (High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Applied Biosystems).

The levels of mRNA were measured by quantitative real-time PCR (qPCR).

Relative gene expression quantification for *XRCC1* and the reference gene *UBC* was carried out in triplicate, with TaqMan® chemistry using ABI Prism 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems). Primers and probes used to quantify the transcripts of *XRCC1* and *UBC* were Taqman gene expression assays (Applied Biosystems).

After initial denaturation at 95 °C for 10 min, the reaction proceeded with 40 cycles of 95 °C for 15 s and 60 °C for 1 min. To assess variation between experiments, a standard cDNA was included in each plate. The analyses were carried out using the comparative C_T method [30]. The threshold cycle (C_T), is defined as the number of cycles required for the fluorescent signal to cross the threshold (i.e. exceeds background level). C_T levels are inversely proportional to the amount of mRNA in the sample (i.e. the lower C_T level the greater the amount of mRNA in the sample).

C_T level was determined for each gene and the relative expression of *XRCC1* was then estimated by calculating the dC_T value, defined as the difference in the C_T value for the target gene (*XRCC1*) and the reference gene (*UBC*).

2.6. Statistical analysis

To evaluate the hypothesis of association between genetic polymorphisms and MPM, unconditional multivariate logistic regression method was used. ORs and 95% CIs were calculated for each genotype compared to the reference group, that is the homozygous for the more frequent allele among controls. Each SNP was considered in separate analyses as both a categorical variable (i.e. wild-type homozygous, heterozygous and variant homozygous) and a continuous variable (number of mutated alleles). Genotypes were also divided into two categories (risk versus non-risk genotypes) on the basis of literature (i.e. prior knowledge of the functional significance of the variants and existing epidemiological evidence) and of our data. In particular, *XRCC1* 399Q (rs25487) was considered a risk factor under a dominant model [16,31], whereas –77C (rs3213245) was considered a protective factor under a dominant model (our data).

For the analysis of the combination of *XRCC1* R399Q and *ERCC1* N1 18N polymorphisms, subjects were categorized according to the cumulative number of variant alleles.

The analyses were carried out both in overall sample and in the subgroup of subjects with asbestos exposure. All analyses were adjusted by age, gender and asbestos exposure for overall sample, and by age and gender for the asbestos-exposed subjects. The analyses were performed using SAS v.8.01 and the SNPAssoc software package developed using R language [32].

Since several of the SNPs that were studied in this work were the object of two previous papers [33,34], we also carried out a meta-analysis. Gemignani et al. [33] used two panels of controls: panel 1 included individuals whose asbestos exposure was known, whereas panel 2 included blood donors whose asbestos exposure had not been evaluated. We performed our meta-analysis using panel 1 only, since these controls were more similar to our control group, and had detailed information about asbestos exposure. Meta-analysis was carried out using a variance based (fixed effects) method. Study weights were proportional to the inverse variance of the OR, estimated from the confidence interval [35].

As the SNPs considered in the study were selected in accordance with a well defined hypothesis supported by previous observations, we did not apply a correction for multiple testing. Instead, we estimated the false-positive report probability (FPRP) using the Bayesian approach proposed by Wacholder et al. [36]. This method requires the estimation (from previous biochemical or molecular information and/or results from meta-analysis) of the prior probabilities that the specific SNPs are associated with the disease under study. We gave a high prior probability (0.2) when (a) the biological plausibility was high, and (b) the existing epidemiologic evidence of association with cancer was fair; a prior probability of 0.1 when biological plausibility was high but the prior epidemiological evidence was poor; a prior probability of 0.01 when both were poor [22]. The available epidemiologic evidence did not allow higher prior probabilities [19].

Analysis of variance and *t*-test were used to determine differences in the *XRCC1* mRNA relative expression levels (normalized to *UBC* levels) between subjects carrying different genotypes for *XRCC1* –77T>C.

3. Results

3.1. Subject characteristics

The main information on the cases and controls are reported in Table 1. The Casale Monferrato panel included 151 MPM patients and 252 population controls. Participation was not the same among cases and controls. Overall 151/245 cases and 252/552 controls in the Casale Monferrato panel agreed to donate a blood sample. That proportion was influenced by gender (in controls more often men accepted and women refused – $p < 0.05$ –, no gender differences were observed in cases) and age (in both cases and controls mean age for participating subjects was lower than for refusers, this difference was statistically significant – $p < 0.05$ – in controls). These figures were expected given the fact that blood sampling is an annoying procedure and it is less accepted in elderly women and in absence of a health related need (as shown by a lower participation among home interviewed controls compared to hospital admitted cases). No differences were observed by residence, thus participation was not associated to social pressure or exposure related feelings. As far as to our knowledge, none of the variables considered and influencing participation is associated to the analyzed SNPs and therefore differential participation cannot pose a confounding threat in the present study [37]. Almost all subjects were exposed to asbestos, only 23% of controls and 1% of cases were not exposed (12% of cases had an undefined asbestos exposure). The main asbestos exposure was occupational both in cases (47%) and in controls (44%). Environmental asbestos exposure in the area accounts for the very large proportion of exposed [38].

The Turin panel, including 69 MPM patients and 44 controls, derives from a hospital-based case–control study still under way. The imbalance between the number of cases and controls, thus, is due to the fact that controls are recruited after cases, so that for part of the MPM patients a suitable control had not been included yet

at the time of analysis. Almost all cases were exposed to asbestos. Only 1.5% were not exposed and 1.5% had an undefined asbestos exposure. The 56% of controls were exposed to asbestos. The main asbestos exposure was occupational both in cases (78%) and in controls (41%).

3.2. SNP analysis

We analyzed 35 SNPs in 15 genes (10 DNA repair genes, 1 selenoprotein, 2 redox state genes, 1 inflammatory gene and 1 phosphatase gene), listed in Table 2. All polymorphisms were in Hardy–Weinberg equilibrium both in cases and controls, except *ERCC2* rs13181 in Casale Monferrato controls, *ERCC2* rs1799793 and *OPN* rs7687316 in Turin controls. This may be due to the small size of Turin panel or to chance.

In Casale Monferrato panel, 18 MPM patients were excluded from statistical analyses because of an undefined asbestos exposure. For the same reason one patient was excluded from Turin panel. Data for *XRCC1* R399Q and *XRCC1* –77T>C are not available in one control of Turin panel.

First statistical analyses were carried out considering separately Casale Monferrato (133 MPM patients and 252 population controls) and Turin (68 MPM patients and 44 controls), then the panels were pooled (201 MPM patients and 296 controls). Moreover statistical analyses were performed in the subgroup of asbestos-exposed subjects (Casale: 131 MPM patients and 194 controls; Turin: 67 MPM patients and 25 controls; Casale+Turin: 198 MPM cases and 218 controls). Overall data are included in Supplementary Table S1, S2 and S3. The ORs for the statistically significant associations are listed in Tables 3 and 4. In Casale Monferrato panel (Table 3), when we considered only asbestos-exposed subjects, the risk of MPM increased with the increasing number of *XRCC1*-399Q alleles and results are statistically significant (OR = 1.44, 95%CI 1.02–2.03). When the dominant model was considered (i.e. *XRCC1* RQ heterozygotes plus QQ homozygotes versus RR homozygotes) the association with MPM was borderline significant (OR = 1.50, 95%CI 0.98–2.28). When *XRCC1* rs1799778 was considered as a continuous variable the risk was statistically significant (OR = 1.43, 95%CI 1.02–2.01). This change is located in intron 3. A possible functional role is not reported.

The present analysis includes the panel of patients and controls evaluated in our previous paper [16]. If we exclude these subjects the OR associated with *XRCC1* –399Q in asbestos exposed individuals becomes 1.25 (95%CI 0.76–2.06), based on 55 patients and 109 controls.

Data from Turin panel never reached statistical significance when considered separately, probably due to the small sample. However, even if not significant, the retrieved information was always consistent with that of Casale panel alone.

Considering the Casale Monferrato and Turin panels together (Table 4), in asbestos-exposed individuals the association between *XRCC1* –399Q and MPM decreased and became only borderline statistically significant (OR = 1.34, 95%CI 0.98–1.84). *XRCC1* –77C instead gave some indication of a protective effect with an OR = 0.52 (95%CI 0.27–1.01); though not statistically significant, this SNP suggests a protective effect of the variant allele also when it is considered as a continuous variable (OR = 0.75, 95%CI 0.55–1.03) and when the dominant model was considered (i.e. *XRCC1* TC heterozygotes plus TT homozygotes versus CC homozygotes (OR = 0.58, 95%CI 0.32–1.05).

The haplotype analysis performed by Haploview v4.1 on *XRCC1* R399Q and *XRCC1* –77T>C showed that they were in linkage disequilibrium (LD) ($D' = 0.94$; $r^2 = 0.27$).

To ascertain whether the effect of the reported association was due to a further variant in LD with the studied SNPs we then sequenced the coding and promoter region of *XRCC1*. Several doc-

Table 3
Odds ratios (ORs) and 95% confidence intervals (95%CI) from multivariate unconditional logistic regression adjusted by age, gender and asbestos exposure for all subjects, and by age and gender for the asbestos-exposed subjects in the Casale Monferrato panel.

Gene SNP (rs) Variants	Cases (%) ^a	Controls (%) All subjects	OR (95%CI)	Cases (%) Asbestos – exposed only	Controls (%)	OR (95%CI)
<i>XRCC1</i> R399Q (rs25487)						
RR	54 (41%)	114 (45%)	1.00 (ref.)	52 (40%)	93 (48%)	1.00 (ref.)
RQ	59 (44%)	113 (45%)	1.34 (0.82–2.19)	59 (45%)	83 (43%)	1.45 (0.89–2.38)
QQ	20 (15%)	25 (10%)	1.88 (0.90–3.92)	20 (15%)	18 (9%)	2.05 (0.97–4.35)
Continuous variable	133 (34.5%)	252 (65.5%)	1.36 (0.97–1.91)	131 (40%)	194 (60%)	1.44 (1.02–2.03)
<i>XRCC1</i> –77T>C (rs3213245)						
TT	49 (37%)	86 (34%)	1.00 (ref.)	49 (37%)	63 (33%)	1.00 (ref.)
TC	67 (50%)	127 (51%)	0.86 (0.52–1.42)	66 (51%)	101 (52%)	0.83 (0.50–1.38)
CC	17 (13%)	39 (15%)	0.69 (0.33–1.44)	16 (12%)	30 (15%)	0.62 (0.29–1.30)
Continuous variable	133 (34.5%)	252 (65.5%)	0.84 (0.59–1.18)	131 (40%)	194 (60%)	0.80 (0.56–1.13)
<i>XRCC1</i> IVS3 A>C (rs1799778)						
AA	54 (40%)	114 (45%)	1.00 (ref.)	52 (40%)	93 (48%)	1.00 (ref.)
AC	58 (44%)	112 (44%)	1.34 (0.82–2.19)	58 (44%)	82 (42%)	1.45 (0.88–2.39)
CC	21 (16%)	26 (10%)	1.85 (0.90–3.81)	21 (16%)	19 (10%)	2.02 (0.97–4.21)
Continuous variable	133 (34.5%)	252 (65.5%)	1.36 (0.97–1.89)	131 (40%)	194 (60%)	1.43 (1.02–2.01)
<i>ERCC1</i> N118N (rs11615)						
TT	43 (32%)	99 (39%)	1.00 (ref.)	43 (33%)	78 (40%)	1.00 (ref.)
TC	71 (53%)	119 (47%)	1.49 (0.90–2.44)	69 (53%)	91 (47%)	1.42 (0.86–2.34)
CC	19 (14%)	34 (14%)	1.38 (0.67–2.82)	19 (14%)	25 (13%)	1.39 (0.68–2.88)
Continuous variable	133 (34.5%)	252 (65.5%)	1.24 (0.89–1.74)	133 (40%)	194 (60%)	1.24 (0.88–1.74)

Boldfaced letters: statistically significant.

^a In Casale Monferrato panel, 18 MPM patients were excluded from statistical analyses because of an undefined asbestos exposure.

umented changes were identified, but none characterized only *XRCC1* 399Q or –77C patients.

An association was found also for *ERCC1* N118N. Heterozygotes (versus wild-type) showed an increased OR both in all subjects (OR = 1.66, 95%CI 1.06–2.60) and in asbestos-exposed only (OR = 1.59, 95%CI 1.01–2.50). Homozygotes CC did not show an association with MPM (probably due to the small size of the group). When the dominant model was considered (i.e. *ERCC1* heterozygotes CT plus homozygotes CC versus homozygotes TT) the risk to develop MPM conferred by the variant allele C was statistically significant both in all subjects (OR = 1.61, 95%CI 1.06–2.47) and in asbestos-exposed only (OR = 1.56, 95%CI 1.02–2.40).

Meta-analysis was performed for those SNPs that were studied either by Gemignani et al. [33] or Landi et al. [34] and in this study. We evaluated also the heterogeneity between these studies and we found that our study and Gemignani et al. were homogeneous, whereas our study and Landi et al. were heterogeneous.

Table 4
Odds ratios (ORs) and 95% confidence intervals (95%CI) from multivariate unconditional logistic regression adjusted by age, gender, panel and asbestos exposure for all subjects, and by age, gender and panel for the asbestos-exposed subjects in the Casale Monferrato and Turin panel together.

Gene SNP (rs) Variants	Cases ^a	Controls (%) All subjects	OR (95%CI)	Cases (%) Asbestos – exposed only	Controls (%)	OR (95%CI)
<i>XRCC1</i> R399Q (rs25487)						
RR	85 (42%)	133 (45%)	1.00 (ref.)	82 (41%)	105 (48%)	1.00 (ref.)
RQ	90 (45%)	131 (44%)	1.34 (0.87–2.07)	90 (46%)	92 (42%)	1.46 (0.94–2.27)
QQ	26 (13%)	31 (11%)	1.50 (0.76–2.95)	26 (13%)	21 (10%)	1.67 (0.83–3.34)
Continuous variable	201 (40.5%)	295 (59.5%)	1.26 (0.93–1.71)	198 (47.5%)	218 (52.5%)	1.34 (0.98–1.84)
<i>XRCC1</i> –77T>C (rs3213245)						
TT	75 (37%)	104 (35%)	1.00 (ref.)	75 (38%)	70 (32%)	1.00 (ref.)
TC	99 (49%)	144 (49%)	0.89 (0.57–1.39)	98 (49%)	111 (51%)	0.85 (0.54–1.34)
CC	27 (14%)	47 (16%)	0.63 (0.33–1.20)	25 (13%)	37 (17%)	0.52 (0.27–1.01)
Continuous variable	201 (40.5%)	295 (59.5%)	0.82 (0.60–1.10)	198 (47.5%)	218 (52.5%)	0.75 (0.55–1.03)
<i>ERCC1</i> N118N (rs11615)						
TT	64 (32%)	117 (40%)	1.00 (ref.)	64 (32%)	90 (41%)	1.00 (ref.)
TC	103 (51%)	137 (46%)	1.66 (1.06–2.60)	100 (51%)	99 (45%)	1.59 (1.01–2.50)
CC	34 (17%)	42 (14%)	1.47 (0.79–2.73)	34 (17%)	30 (14%)	1.49 (0.79–2.79)
Continuous variable	201 (40.5%)	296 (59.5%)	1.30 (0.96–1.74)	198 (47.5%)	219 (52.5%)	1.29 (0.96–1.75)

Boldfaced letters: statistically significant.

^a In Casale Monferrato panel, 18 MPM patients were excluded from statistical analyses because of an undefined asbestos exposure. Data for *XRCC1* IVS3 A>C (rs 1799778) are not available for Turin panel.

Consequently, we here presented only data of meta-analysis with Gemignani et al. A total of 252 patients and 356 controls were included in this meta-analysis (Table 5 and Table S4). Asbestos exposure could not be considered. Interestingly, *APEX* D148E and *ERCC1* N118N showed a statistically significant association with MPM (*APEX* EE homozygotes OR = 1.72, 95%CI 1.02–2.91; *ERCC1* N118N heterozygotes OR = 1.51, 95%CI 1–2.26).

XRCC1 R399Q was not associated to MPM in this meta-analysis (Table S4).

3.3. The combination of *ERCC1* N118N and *XRCC1* R399Q polymorphisms

In order to evaluate the joint effect of *ERCC1* and *XRCC1* polymorphisms, we divided subjects into four groups. We defined *ERCC1* TT genotype and *XRCC1* GG genotypes as reference group. The group with at least one variant allele for both polymorphisms

Table 5
Meta-analysis of our data and Gemignani' data [33].

Gene SNP (rs)	OR	95%CI	p (heterog)
APEX D148E (rs3136820)			
Homozygous			
Study			
Casale Monf.to	1.63	0.85–3.1	0.779
Gemignani et al. 2009	1.91	0.78–4.66	
Pool	1.72	1.02–2.91	
Heterozygous			
Study			
Casale Monf.to	1.04	0.63–1.73	0.739
Gemignani et al. 2009	1.2	0.61–2.52	
Pool	1.09	0.73–1.64	
ERCC1 N118N (rs11615)			
Homozygous			
Study			
Casale Monf.to	1.38	0.67–2.82	0.932
Gemignani et al.	1.45	0.6–3.52	
Pool	1.41	0.80–2.46	
Heterozygous			
Study			
Casale Monf.to	1.49	0.9–2.44	0.939
Gemignani et al.	1.54	0.78–3.03	
Pool	1.51	1.00–2.26	

Boldfaced letters: statistically significant.

showed a statistically significant association with MPM in asbestos exposed subjects both in Casale Monferrato panel (OR = 2.02, 95%CI 1.01–4.05) and in Casale Monferrato and Turin pooled (OR = 2.39, 95%CI 1.29–4.43) (Table 6).

Indexes of synergy, measured as departure from additive interaction [39], were not statistically significant.

3.4. Haplotype analysis

The *XRCC1* haplotypes were characterized by nine tag SNPs (identified by Haploview v4.1 on HapMap CEU panel, release #24) and three other SNPs that we analyzed previously (rs3213245, rs1799782, rs25487). The pairwise linkage disequilibrium (D' and r^2 values) between *XRCC1* genetic markers in the controls group of the Casale Monferrato panel is shown in Fig. S1.

We estimated haplotype frequencies for cases and controls by the SHEsis software platform. We considered only haplotypes with a frequency >3%. Results are reported in Table 7. The *XRCC1*-TGGGGGAACAGA haplotype was more represented in cases than in controls. Among the subjects exposed to asbestos (131 cases, 194 controls) that haplotype was significantly associated with an increased risk to develop MPM (OR = 1.76, 95%CI 1.04–2.96).

We analyzed also the haplotypes that encompassed *ERCC1* and the adjacent gene *RAI*. Overall we examined six tag SNPs (identified by Haploview v4.1) and a further SNP of the region (i.e.

Table 6
The combination of *ERCC1* N118N and *XRCC1* R339Q polymorphisms.

<i>XRCC1</i> combined with <i>ERCC1</i> genotypes	Cases (%)	Controls (%)	OR (95%CI)	Cases (%)	Controls (%)	OR (95%CI)
		All subjects		Asbestos-exposed only		
Casale Monferrato panel						
GG + TT	20 (13%)	46 (18%)	1.00 (ref.)	19 (15%)	37 (19%)	1.00 (ref.)
GG + CC GG + CT	43 (29%)	68 (27%)	1.24 (0.60–2.54)	33 (25%)	56 (29%)	1.12 (0.54–2.32)
AA + TT GA + TT	27 (18%)	53 (21%)	1.19 (0.55–2.58)	24 (18%)	41 (21%)	1.21 (0.56–2.62)
AA + CT AA + CC GA + CC GA + CT	61 (40%)	85 (34%)	1.97 (0.99–3.92)	55 (42%)	60 (31%)	2.02 (1.01–4.05)
Casale Monferrato + Turin panels						
GG + TT	30 (14%)	59 (20%)	1.00 (ref.)	29 (14%)	47 (21%)	1.00 (ref.)
GG + CC GG + CT	65 (30%)	74 (25%)	1.92 (1.02–3.64)	53 (27%)	58 (27%)	1.76 (0.92–3.34)
AA + TT GA + TT	38 (17%)	58 (20%)	1.65 (0.83–3.29)	35 (18%)	43 (20%)	1.68 (0.84–3.38)
AA + CT AA + CC GA + CC GA + CT	87 (39%)	104 (35%)	2.31 (1.25–4.25)	81 (41%)	70 (32%)	2.39 (1.29–4.43)

Boldfaced letters: statistically significant.

Table 7
XRCC1 haplotype analysis: frequencies in cases and controls and OR (95%CI) adjusted for age and gender.

Haplotype ^a	Cases (%) ^b	Controls (%) ^b	OR (95%CI)
TGGGGGAACAGA	87 (33.2%)	104 (26.9%)	1 (ref.)
CGGAGGC CGGA	40 (15.3%)	75 (19.4%)	0.57 (0.34–0.96)
CGGGGCGCGGA	58 (22.1%)	81 (20.8%)	0.84 (0.53–1.34)
TGGGGGCATGGG	16 (6.1%)	33 (8.5%)	0.61 (0.31–1.19)
TGGGGGCACGCA	14 (5.3%)	28 (7.2%)	0.58 (0.28–1.2)
TGGGGCCACGGA	13 (5%)	20 (5.1%)	0.71 (0.32–1.60)
TGGGGGCACGGA	11 (4.2%)	17 (4.3%)	0.84 (0.35–2.04)
TTGGGGAACAGA	9 (3.4%)	12 (3.1%)	0.94 (0.36–2.48)

Boldfaced letters: statistically significant.

^a The haplotype is defined as the allele present at position –77 (T>C, rs3213245), IVS2 (G>T, rs3213247), IVS2 (A>G, rs129763352), IVS2 (A>G, rs2854496), codon 50 (G>A, rs2307174), IVS3 (A>C, rs2023614), IVS3 (A>C, rs1799778), IVS4 (A>G, rs3213356), codon 194 (C>T, rs1799782), codon 399 (G>A, rs25487), IVS10 (C>G, rs3213371), +816 (A>G, rs3213403).

^b Haplotype frequencies analyzed by SHEsis software platform. Haplotypes with frequencies <3% in both cases and controls are dropped.

rs11615). No haplotype was found significantly associated (data not shown).

3.5. FPRP

FPRP was estimated for significant results pertaining *XRCC1* R399Q, *XRCC1* –77T>C, *XRCC1* IVS3, *ERCC1* N118N and *XRCC1* haplotype. Data are reported in supplementary Table S5.

3.6. Expression analysis

Since *XRCC1* –77T>C (rs3213245) is located into the gene promoter and affects a Sp1 binding site, we evaluated mRNA expression levels from seventy-one normal pleural tissues. All the samples were genotyped for *XRCC1* –77T>C and the analyses were performed considering CC genotype as reference group. When we compared the different genotypes (i.e. 29 TT, 27 CT, 15 CC), for variation in gene expression level, the difference was not statistically significant ($p = 0.3$).

4. Discussion

Our group was the first one to identify an association between MPM and a DNA repair gene, *XRCC1*, on the basis of an a priori hypothesis on the mechanism of damage from asbestos fibers. Our study suggested that a decreased response to DNA damage may favour asbestos carcinogenicity [16]. More recently, by using a custom-made SNP microarray another Italian group studied 50 SNPs in xenobiotic and oxidative metabolism enzymes (XME) genes and 76 SNPs in genes involved in genome stability (GS) in a panel that included 119 MPM patients and two groups of controls (104

with and 695 without documented asbestos exposure). Statistical analysis showed a significant association with the nucleotidic change 282C>T within *NAT2* [33], reinforcing existing evidences that genetic polymorphisms are possibly involved in the etiology of MPM [40]. That observation is difficult to explain biologically because the mechanism by which *NAT2* may influence asbestos carcinogenicity is not clear. Some of the studied DNA repair genes revealed significant associations, but most of them disappeared after Bonferroni correction for multiple analyses. A further study from the same group reported an association with *SOD2* 16A [34].

To extend previous observation we investigated the association of 35 SNPs with MPM in a panel of 220 Italian patients and 296 controls whose asbestos exposure had been accurately evaluated. The largest portion of patients and controls were from Casale Monferrato, a town whose population experienced widespread, non-occupational exposure to asbestos, additional to that of workers employed in the local asbestos-cement factory. It is expected that this situation should reveal genetic susceptibility by increasing penetrance.

Only two genes were found significantly associated with MPM, i.e. *XRCC1* and *ERCC1*, both involved in DNA repair.

Although our study design has some limitations (e.g. low response rate and selection of patients) the *XRCC1* R399Q, *XRCC1* IVS3 and *XRCC1* haplotype associations showed an acceptable level of false reports with a prior probability of 0.25 and an expected OR of 1.5. However, the *XRCC1* -77T>C and *ERCC1* N118N associations showed a low level of false reports only with an expected OR of 2.0 (power = 97%).

A dosage effect, suggestive of a dominant model, was shown for *XRCC1* 399Q.

The meta-analysis with the data on *XRCC1* and *ERCC1* by Gemignani et al. [33], regardless of asbestos exposure, confirmed and extended our results. *XRCC1* R399Q, evaluated on all individuals independently from asbestos exposure, is not associated to MPM, like in the Casale Monferrato and Turin serie. Thus, *XRCC1* R399Q seems to be a risk factor only for asbestos-exposed subjects. Conversely, the meta-analysis confirmed our data and showed that *ERCC1* N118N is a risk factor per se.

Haplotypes for both *XRCC1* and *ERCC1* were also evaluated, but only the *XRCC1*-TGGGGGAACAGA haplotype was found statistically significant, being more represented in cases than in controls. Our data seem to favour the hypothesis that the effect of the contiguous genes *XRCC1* and *ERCC1* is not due to LD.

Sequencing of the promoter and coding region of *XRCC1* in patients and controls did not reveal another DNA change in LD with the R399Q that could functionally explain the association. Thus the association should be due to the studied SNPs or to other SNPs located in the non-sequenced regions.

Both *XRCC1* R399Q and *ERCC1* N118N have been found associated with cancer in different studies [41–47]. The combination of *ERCC1* and *XRCC1* polymorphisms better predicts clinical outcome to oxaliplatin-based chemotherapy in metastatic colorectal cancer [48]. However, little is known about the functional effect of these SNPs.

Epidemiological association studies, performed on different cancer types, have often been inconclusive or contradictory. The *XRCC1* -399Q variant has been associated with lung cancer [41], breast cancer [42,43], colorectal cancer [44], prostate cancer [45], but not with bladder cancer [49].

Functional studies pointed out that *XRCC1* -399Q may be associated with increased DNA damage measured by aflatoxin B1-DNA adducts, glycothorin A (GPA) variant frequency [50], sister chromatid exchange and polyphenol DNA adducts [51]. Moreover, carriers of the 399Q variant showed a significant increase in chromosomal deletions in whole-blood cells [52].

Differently, the 399R and 399Q equally complement both the single-strand break repair defect and the sensitivity to methyl methanesulfonate (MMS) *in vitro* in *XRCC1*-deficient CHO cells, suggesting that the 399Q variant retained a substantial level of function in those experimental conditions [53].

Interestingly, R399Q is located in the BRCT1 domain, i.e. the poly (ADP-ribose) polymerase I (PARP) interaction site. The three-dimensional structure of the wild-type *XRCC1*-BRCT1 domain is characterized by four α helices and three β sheets. The predicted structure of the variant 399Q protein shows the absence of three α helices and two β sheets. This suggests that 399Q may induce a significant conformational change in the BRCT domain. Since α helices are involved in protein–protein interactions, it is possible that the 399Q variant modifies the scaffold function of *XRCC1* [54].

Moreover, the *XRCC1* haplotype that is associated to MPM includes another SNP that may have functional relevance. The -77T>C SNP is located in the promoter region of *XRCC1* within the core of a predicted Sp1-binding sequence. Sp1 is a zinc-finger transcription factor that may act as a transcriptional repressor or activator, depending on the context. Using several non-pleural cell lines Hao et al. [55] demonstrated that the -77C allele has an high affinity to Sp1, but is associated with a reduced transcriptional activity *in vitro*. They concluded that Sp1 acts as a transcriptional repressor of *XRCC1* expression and that the reduced *XRCC1* expression due to the C allele may be the reason of its association with lung [56,57] and gastric cancer [58].

On the contrary, our results show that -77C plays a protective role for MPM. Since -77T and 399Q lie on the same at-risk haplotype our hypothesis was that the reduced Sp1 affinity due to the -77T allele may cause an increased expression of the 399Q variant protein leading to an impaired function, such as abnormal interactions with other DNA repair protein of the BER complex.

However, no data are available for expression of *XRCC1* in pleural tissues relative to specific *XRCC1* genotypes. To ascertain our hypothesis we analyzed *XRCC1* expression in genotyped healthy subjects using real-time PCR. Our data do not suggest an effect of this SNP on *XRCC1* expression on pleural tissues. However, we evaluated expression in pleural tissue as a whole, not specifically in mesothelial primary cell cultures.

Controversial epidemiological association studies are also evident for *ERCC1* N118N. This SNP has been associated with response to treatment of lung cancer [46], but not with colorectal cancer [59]. On the other hand, a study of some authors of this paper showed that not only the *ERCC1* N118N, but also *ERCC1* haplotypes modify bladder cancer risk [47].

The *ERCC1* gene and the *XRCC1* gene are located close one another (approximately 2 Mb apart). Hoeijmakers et al. [60] found that *ERCC1* 3'-terminus overlapped with the 3'-end of another gene, designated *ASE1*. This exceptional type of gene overlap was conserved in mouse and even in the yeast *ERCC1* homolog, *RAD10*, suggesting an important biologic function of this region (19q13.2–q13.3). Besides, haplotypes in this region have been found associated with increased cancer risk [61–65]. Although we have found an association between MPM and a *XRCC1* haplotype and a cumulative of *XRCC1* and *ERCC1* variants, we have not observed an association with *ERCC1* haplotypes. The biological mechanisms that explain the association of these SNPs with MPM are still obscure.

Interestingly, our meta-analysis shows that also another DNA repair gene, *APEX*, is associated to MPM using the codominant model. *APEX* is part of BER, as *XRCC1* [66]. More data are needed to ascertain this association.

In conclusion, this study shows an association between two DNA repair genes and MPM and strengthen the hypothesis of a role for genetic risk factors in asbestos carcinogenicity. It should be stressed that these risks are one-two orders of magnitude lower than the

risk caused by asbestos exposure itself (OR of 50–100 for asbestos versus 1–2 for genetic factors).

Funding source

This study was made possible by grants from Regione Piemonte Ricerca Sanitaria Finalizzata 2007, 2008, 2009, CIPE, Fondazione Buzzi Unicem Onlus 2007, AIRC 2007–2010.

Conflicts of interest of statement

None declared.

Acknowledgements

We are greatly indebted to all those who agreed to participate in this study and contributed to it, in particular the MPM patients, their physicians, the controls and their family doctors. We are also indebted to the heads and the medical staff of the Units of Oncology (M. Botta, B. Castagneto, A. Muzio and D. Degiovanni) and Medicine (V. Cocito) of Casale Monferrato Hospital. This study was made possible by grants from Regione Piemonte Ricerca Sanitaria Finalizzata 2007, 2008, 2009, CIPE, Fondazione Buzzi Unicem Onlus 2007, AIRC 2007–2010.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi: 10.1016/j.mrfmmm.2011.01.001.

References

- [1] B.W. Robinson, R.A. Lake, Advances in malignant mesothelioma, *N. Engl. J. Med.* 353 (2005) 1591–1603.
- [2] C.G. Jensen, L.C.W. Jensen, C.L. Rieder, R.W. Cole, J.A. Ault, Long crocidolite asbestos fibers cause polyploidy by sterically blocking cytokinesis, *Carcinogenesis* 17 (1996) 2013–2021.
- [3] D.W. Kamp, S.A. Weitzman, The molecular basis of asbestos induced lung injury, *Thorax* 54 (1999) 638–652.
- [4] D. Wang, D.A. Kreutzer, J.M. Essigmann, Mutagenicity and repair of oxidative DNA damage: insight from studies using defined lesions, *Mutat. Res.* 400 (1998) 99–115.
- [5] H. Yang, M. Bocchetta, B. Kroczyńska, A.G. Elmshad, Y. Chen, Z. Liu, C. Bubici, B.T. Mossman, H.I. Pass, J.R. Testa, G. Franzoso, M. Carbone, TNF- α inhibits asbestos-induced cytotoxicity via a NF- κ B-dependent pathway, a possible mechanism for asbestos-induced oncogenesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103 (2006) 10397–10402.
- [6] B.C. Christensen, J.J. Godleski, C.J. Marsit, E.A. Houseman, C.Y. Lopez-Fagundo, J.L. Longacker, R. Bueno, D.J. Sugarbaker, H.H. Nelson, K.T. Kelsey, Asbestos exposure predicts cell cycle control gene promoter methylation in pleural mesothelioma, *Carcinogenesis* 29 (2008) 1555–1559.
- [7] A. Marinaccio, A. Binazzi, G. Cauzillo, D. Cavone, R.D. Zotti, P. Ferrante, V. Genaro, G. Gorini, M. Menegozzo, C. Mensi, E. Merler, D. Mirabelli, F. Montanaro, M. Musti, F. Pannelli, A. Romanelli, A. Scarselli, R. Tumino, Italian Mesothelioma Register (ReNaM) Working Group, analysis of latency time and its determinants in asbestos related malignant mesothelioma cases of the Italian register, *Eur. J. Cancer* 43 (2007) 2722–2728.
- [8] F. Montanaro, R. Rosato, M. Gangemi, S. Roberti, F. Ricceri, E. Meier, V. Genaro, A. Romanelli, E. Chellini, C. Pascucci, M. Musti, C. Nicita, P.G. Barbieri, A. Marinaccio, C. Magnani, D. Mirabelli, Survival of pleural malignant mesothelioma in Italy: a population-based study, *Int. J. Cancer* 124 (2009) 201–207.
- [9] D.W. Cugell, D.W. Kamp, Asbestos and the pleura: a review, *Chest* 125 (2004) 1103–1117.
- [10] V. Ascoli, C.C. Scalzo, C. Bruno, F. Facciolo, M. Lopergolo, P. Granone, F. Nardi, Familial pleural malignant mesothelioma: clustering in three sisters and one cousin, *Cancer Lett.* 130 (1998) 203–207.
- [11] I. Roushdy-Hammady, J. Siegel, S. Emri, J.R. Testa, M. Carbone, Genetic-susceptibility factor and malignant mesothelioma in the Cappadocian region of Turkey, *Lancet* 357 (2001) 444–445.
- [12] M. Metintas, G. Hillerdal, S. Metintas, P. Dumortier, Endemic malignant mesothelioma: exposure is more important than genetic factors, *Arch. Environ. Occup. Health* 65 (2010) 86–93.
- [13] V. Ascoli, D. Cavone, E. Merler, P.G. Barbieri, L. Romeo, F. Nardi, M. Musti, Mesothelioma in blood related subjects: report of 11 clusters among 1954 Italy cases and review of the literature, *Am. J. Ind. Med.* 50 (2007) 357–369.
- [14] D. Ugolini, M. Neri, M. Ceppi, A. Cesario, I. Dianzani, R. Filiberti, F. Gemignani, S. Landi, C. Magnani, L. Mutti, R. Puntoni, S. Bonassi, Genetic susceptibility to malignant mesothelioma and exposure to asbestos: the influence of the familial factor, *Mutat. Res.* 658 (2008) 162–171.
- [15] M. Neri, D. Ugolini, I. Dianzani, F. Gemignani, S. Landi, A. Cesario, C. Magnani, L. Mutti, R. Puntoni, S. Bonassi, Genetic susceptibility to malignant pleural mesothelioma and other asbestos-associated diseases, *Mutat. Res.* 659 (2008) 126–136.
- [16] I. Dianzani, L. Gibello, A. Biava, M. Giordano, M. Bertolotti, M. Betti, D. Ferrante, S. Guarrera, G.P. Betta, D. Mirabelli, G. Matullo, C. Magnani, Polymorphisms in DNA repair genes as risk factors for asbestos-related malignant mesothelioma in a general population study, *Mutat. Res.* 599 (2006) 124–134.
- [17] C. Magnani, P. Dalmasso, A. Biggeri, C. Ivaldi, D. Mirabelli, B. Terracini, Increased risk of malignant mesothelioma of the pleura after residential or domestic exposure to asbestos: a case-control study in Casale Monferrato, Italy, *Environ. Health Perspect* 109 (2001) 915–919.
- [18] G. Matullo, D. Palli, M. Peluso, S. Guarrera, S. Carturan, E. Celentano, V. Krogh, A. Munnia, R. Tumino, S. Polidoro, A. Piazza, P. Vineis, XRCC1, XRCC3, XPD gene polymorphisms, smoking and (32)P-DNA adducts in a sample of healthy subjects, *Carcinogenesis* 22 (2001) 1437–1445.
- [19] G. Matullo, S. Guarrera, C. Sacerdote, S. Polidoro, L. Davico, S. Gamberini, M. Karagas, G. Casetta, L. Rolle, A. Piazza, P. Vineis, Polymorphisms/haplotypes in DNA repair genes and smoking: a bladder cancer case-control study, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 14 (2005) 2569–2578.
- [20] L.I. Wang, D.P. Miller, Y. Sai, G. Liu, L. Su, J.C. Wain, T.J. Lynch, D.C. Christiani, Manganese superoxide dismutase alanine-to-valine polymorphism at codon 16 and lung cancer risk, *J. Natl. Cancer Inst.* 93 (2001) 1818–1821.
- [21] B. Hao, H. Wang, K. Zhou, Y. Li, X. Chen, G. Zhou, Y. Zhu, X. Miao, W. Tan, Q. Wei, D. Lin, F. He, Identification and genetic variants in base excision repair pathway and their associations with risk of esophageal squamous cell carcinoma, *Cancer Res.* 64 (2004) 4378–4384.
- [22] J. Hung, P. Brennan, F. Canzian, N. Szeszenia-Dabrowska, D. Zaridze, J. Lissowska, P. Rudnai, E. Fabianova, D. Mates, L. Foretova, V. Janout, V. Bencko, A. Chabrier, S. Borel, J. Hall, P. Boffetta, Large-scale investigation of base excision repair genetic polymorphism and lung cancer risk in a multicenter study, *J. Natl. Cancer Inst.* 97 (2005) 567–576.
- [23] C.H. Lee, K.Y. Lee, K.H. Choe, Y.C. Hong, S.I. Noh, S.Y. Eom, Y.J. Ko, Y.W. Zhang, D.H. Yim, J.W. Kang, H. Kim, Y.D. Kim, Effects of oxidative DNA damage and genetic polymorphism of the glutathione peroxidase 1 (GPX1) and 8-oxoguanine glycosylase 1 (hOGG1) on lung cancer, *J. Prev. Med. Public Health* 39 (2006) 130–134.
- [24] V. Moreno, F. Gemignani, S. Landi, L. Gioia-Patricola, A. Chabrier, I. Bianco, S. González, E. Guino, G. Capella, F. Canzian, Polymorphisms in genes of nucleotide and base excision repair: risk and prognosis of colorectal cancer, *Clin. Cancer Res.* 12 (2006) 2101–2108.
- [25] R.K. Thirumaran, J.L. Bermejo, P. Rudnai, E. Gurzau, K. Koppova, W. Goessler, M. Vahter, G.S. Leonard, F. Clemens, T. Fletcher, K. Hemminki, R. Kumar, Single nucleotide polymorphisms in DNA repair genes and basal cell carcinoma skin, *Carcinogenesis* 27 (2006) 1676–1681.
- [26] S. Apostolou, J.O. Klein, Y. Mitsuuchi, J.N. Shetler, P.I. Poulikakos, S.C. Jhanwar, W.D. Kruger, J.R. Testa, Growth inhibition and induction of apoptosis in mesothelioma cells by selenium and dependence on selenoprotein SEP15 genotype, *Oncogene* 24 (2004) 5032–5040.
- [27] H.I. Pass, D. Lott, F. Lonardo, M. Harbut, Z. Liu, N. Tang, M. Carbone, C. Webb, A. Wali, Asbestos exposure, pleural mesothelioma, and serum osteopontin levels, *N. Engl. J. Med.* 353 (2005) 1564–1573.
- [28] J.C. Barrett, B. Fry, J. Maller, M.J. Daly, Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps, *Bioinformatics* 21 (2005) 263–265.
- [29] Y.Y. Shi, L. He, SHEsis, a powerful software platform for analyses of linkage disequilibrium, haplotype construction, and genetic association at polymorphism loci, *Cell Res.* 15 (2005) 97–98.
- [30] User Bulletin #2: ABI PRISM 7700 Sequence Detection System.
- [31] J. Hung, P. Brennan, F. Canzian, N. Szeszenia-Dabrowska, D. Zaridze, J. Lissowska, P. Rudnai, E. Fabianova, D. Mates, L. Foretova, V. Janout, V. Bencko, A. Chabrier, S. Borel, J. Hall, P. Boffetta, Large-scale investigation of base excision repair genetic polymorphism and lung cancer risk in a multicenter study, *J. Natl. Cancer Inst.* 97 (2005) 576–576.
- [32] J.R. González, L. Armengol, X. Solé, E. Guinó, J.M. Mercader, X. Estivill, V. Moreno, SNPpass: an R package to perform whole genome association studies, *Bioinformatics* 23 (2007) 644–645.
- [33] F. Gemignani, M. Neri, F. Bottari, R. Barale, P.A. Canessa, F. Canzian, M. Ceppi, I. Spitaleri, M. Cipollini, G.P. Ivaldi, M. Mencoboni, P. Scaruffi, G.P. Tonini, D. Ugolini, L. Mutti, S. Bonassi, S. Landi, Risk of malignant mesothelioma and polymorphisms in genes involved in the genome stability and xenobiotics metabolism, *Mutat. Res.* 671 (2009) 76–83.
- [34] S. Landi, F. Gemignani, M. Neri, R. Barale, S. Bonassi, F. Bottari, P.A. Canessa, F. Canzian, M. Ceppi, R. Filiberti, G.P. Ivaldi, M. Mencoboni, P. Scaruffi, G.P. Tonini, L. Mutti, R. Puntoni, Polymorphisms of glutathione-S-transferase M1 and manganese superoxide dismutase are associated with the risk of malignant pleural mesothelioma, *Int. J. Cancer* 120 (2007) 2739–2743.
- [35] D.B. Petitti, Meta-analysis decision analysis and cost effectiveness analysis, Oxford University Press, New York, 107–113.
- [36] S. Wacholder, S. Chanock, M. Gracia-Closas, L. El Ghormli, N. Rothman, Assessing the probability that a positive report is false: an approach for molecular epidemiology studies, *J. Natl. Cancer Inst.* 96 (2004) 434–442.
- [37] K.J. Rothman, S. Greenland, T.L. Lash, Modern epidemiology, Lippincott Williams & Wilkins.

- [38] M.M. Maule, C. Magnani, P. Dalmaso, D. Mirabelli, F. Merletti, A. Biggeri, Modeling mesothelioma risk associated with environmental asbestos exposure, *Environ. Health Perspect.* 115 (2007) 1066–1071.
- [39] D.W. Hosmer, S. Lemeshow, *Applied logistic regression*, John Wiley & Sons, New York (NY), 1989.
- [40] M. Betti, M. Neri, D. Ferrante, S. Landi, A. Biava, F. Gemignani, M. Bertolotti, D. Mirabelli, M. Padoan, D. Ugolini, M. Botta, S. Bonassi, C. Magnani, I. Dianzani, Pooled analysis of NAT2 genotypes as risk factors for asbestos-related malignant mesothelioma, *Int. J. Hyg. Environ. Health* 212 (2009) 322–329.
- [41] K. De Ruyck, M. Szaumkessel, I. De Rudder, A. Dehoorne, A. Vral, K. Claes, A. Velghe, J. Van Meerbeeck, H. Thierens, Polymorphisms in base-excision repair and nucleotide-excision repair genes in relation to lung cancer risk, *Mutat. Res.* 631 (2007) 101–110.
- [42] S. Sterpone, V. Mastellone, L. Padua, F. Novelli, C. Patrono, T. Cornetta, D. Giammarino, V. Donato, A. Testa, R. Cozzi, Single-nucleotide polymorphisms in BER and HHR genes, XRCC1 haplotypes and breast cancer risk in Caucasian women, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 136 (2010) 631–636.
- [43] Y. Huang, L. Li, L. Yu, XRCC1 Arg399Gln, Arg194Trp and Arg280His polymorphisms in breast cancer risk: a meta-analysis, *Mutagenesis* 24 (2009) 331–339.
- [44] Z. Jiang, C. Li, Y. Xu, S. Cai, A meta-analysis on XRCC1 and XRCC3 polymorphisms and colorectal cancer risk, *Int. J. Colorectal Dis.* 25 (2010) 169–180.
- [45] J. Zhang, I.B. Dhakal, G. Greene, N.P. Lang, F.F. Kadlubar, Polymorphisms in hOGG1 and XRCC1 and risk of prostate cancer: effects modified by plasma antioxidants, *Urology* 75 (2010) 779–785.
- [46] A. Kalikaki, M. Kanaki, H. Vassalou, J. Souglakos, A. Voutsina, V. Georgoulas, D. Mavroudis, DNA repair gene polymorphisms predict favourable clinical outcome in advanced non-small-cell lung cancer, *Clin. Lung Cancer* 10 (2009) 118–123.
- [47] F. Ricceri, S. Guarrera, C. Sacerdote, S. Polidoro, A. Allione, D. Fontana, P. Destefanis, A. Tizzani, G. Casetta, G. Cucchiarella, P. Vineis, G. Matullo, ERCC1 haplotypes modify bladder cancer risk: a case-control study, *DNA Repair* 9 (2010) 191–200.
- [48] J. Liang, T. Jiang, R. Yao, Z. Liu, H. Lv, W. Qi, The combination of ERCC1 and XRCC1 gene polymorphisms better predicts clinical outcome to oxaliplatin-based chemotherapy in metastatic colorectal cancer, *Cancer Chemother. Pharmacol.* 66 (2010) 493–500.
- [49] T. Lao, W. Gu, Q. Huang, A meta-analysis on XRCC1 R399Q and R194W polymorphisms, smoking and bladder cancer risk, *Mutagenesis* 23 (2008) 523–532.
- [50] R.M. Lunn, R.G. Langlois, L.L. Hsieh, C.L. Thompson, D.A. Bell, XRCC1 polymorphisms: effects on aflatoxin B1-DNA adducts and glycophorin A variant frequency, *Cancer Res.* 59 (1999) 2557–2561.
- [51] E.J. Duell, J.K. Wiencke, T.J. Cheng, A. Varkonyi, Z.F. Zuo, T.D.S. Ashok, E.J. Mark, J.C. Wain, D.C. Christiani, K.T. Kelsey, Polymorphisms in the DNA repair genes XRCC1 and ERCC2 and biomarkers of DNA damage in human blood mononuclear cells, *Carcinogenesis* 21 (2000) 965–971.
- [52] W.W. Au, S.A. Salama, C. Sierra-Torres, Functional characterization of polymorphisms in DNA repair gene using cytogenetic challenge assay, *Environ. Health Perspect* 111 (2003) 1843–1850.
- [53] R.M. Taylor, A. Thistlethwaite, K.W. Caldecott, Central role for the XRCC1 BRCT 1 domain in mammalian DNA single-strand break repair, *Mol. Cell. Biol.* 22 (2002) 2256–2263.
- [54] R. Monaco, R. Rosal, M.A. Dolan, M.R. Pincus, P.W. Brandt-Rauf, Conformational effects of a common codon 399 polymorphism on the BRCT1 domain of the XRCC1 protein, *Protein J.* 26 (2007) 541–546.
- [55] B. Hao, X. Miao, Y. Li, X. Zhang, T. Sun, G. Liang, Y. Zhao, Y. Zhou, H. Wang, X. Chen, L. Zhang, W. Tan, Q. Wei, D. Lin, F. He, A novel –77T>C polymorphism in DNA repair gene XRCC1 contributes to diminished promoter activity and increase risk of non-small cell lung cancer, *Oncogene* 25 (2006) 3613–3620.
- [56] M. Li, Z. Yin, P. Guan, X. Li, Z. Cui, J. Zhang, W. Bai, Q. He, B. Zhou, XRCC1 polymorphisms, cooking oil fume and lung cancer in Chinese women non-smokers, *Lung Cancer* 2 (2008) 145–151.
- [57] W.C. Hsieh, Y.W. Cheng, C.J. Lin, M.C. Chou, C.Y. Chen, H. Lee, Prognostic significance of X ray cross-complementing group 1 T–77C polymorphism in resected non-small cell lung cancer, *Jpn. J. Clin. Oncol.* 39 (2009) 81–85.
- [58] G. Corso, D. Marrelli, C. Pedrazzani, J.C. Machado, S. Mancini, R. Seruca, F. Roviello, Gastric cardiac carcinoma is associated with the promoter –77T>C gene polymorphism of X-ray cross-complementing group 1 (XRCC1), *J. Gastrointest. Surg.* 13 (2009) 2233–2238.
- [59] R.D. Hansen, M. Sorensen, A. Tjonneland, K. Overvad, H. Wallin, O. Raaschou-Nielsen, U. Vogel, A haplotype of polymorphisms in ASE-1, RAI and ERCC1 and the effects of tobacco smoking and alcohol consumption on risk of colorectal cancer: a Danish prospective case-cohort study, *BMC Cancer* 8 (2008) 54–62.
- [60] J.H.J. Hoeijmakers, G. Weeda, C. Troelstra, M. van Duin, J. Wiegant, M. van der Ploeg, A.H.M. Geurts van Kessel, A. Westerveld, D. Bootsma, (sub) chromosomal localization of the human excision repair genes ERCC-3 and -6, and identification of a gene (ASE-1) overlapping with ERCC-1, *Cytogenet. Cell Genet.* 51 (1989) 1014.
- [61] B.A. Nexø, U. Vogel, A.E.A. Olsen, A specific haplotype of single nucleotide polymorphisms on chromosome 19q13.2-3 encompassing the gene rai is indicative of post-menopausal breast cancer before age 55, *Carcinogenesis* 24 (2003) 899–904.
- [62] E. Rockenbauer, M.H. Bendixen, Z.E.A. Bukowy, Association of chromosome 19q13.2-3 haplotypes with basal cell carcinoma: tentative delineation of an involved region using data for single nucleotide polymorphisms in two cohorts, *Carcinogenesis* 23 (2002) 1149–1153.
- [63] U. Vogel, I. Laros, N.R. Jacobsen, B.L. Thomsen, H. Bak, A. Olsen, Z. Bukowy, H. Wallin, K. Overvad, A. Tjonneland, B.A. Nexø, O. Raaschou-Nielsen, Two regions in chromosome 19q13.2-3 are associated with risk of lung cancer, *Mutat. Res.* 546 (2004) 65–74.
- [64] J. Yin, E. Rockenbauer, M.E.A. Hedayati, Multiple single nucleotide polymorphisms on human chromosome 19q13.2-3 associate with risk of basal cell carcinoma, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 11 (2002) 1449–1453.
- [65] J. Yin, U. Vogel, Y. Ma, R. Qi, H. Wang, Haplotypes of nine single nucleotide polymorphisms on chromosome 19q13.2-3 associated with susceptibility of lung cancer in a Chinese population, *Mutat. Res.* 641 (2008) 12–18.
- [66] M. Christmann, M.T. Tomcic, W.P. Boss, B. Kaina, Mechanisms of human DNA repair: an update, *Toxicology* 193 (2003) 3–34.

Pooled analysis of NAT2 genotypes as risk factors for asbestos-related malignant mesothelioma

Marta Betti^a, Monica Neri^b, Daniela Ferrante^c, Stefano Landi^d, Alessandra Biava^a, Federica Gemignani^d, Marinella Bertolotti^c, Dario Mirabelli^e, Marina Padoan^c, Donatella Ugolini^{f,g}, Mario Botta^h, Stefano Bonassi^b, Corrado Magnani^c, Irma Dianzani^{a,*}

^aDepartment of Medical Sciences, University of Piemonte Orientale, Via Solaroli 17, 28100 Novara, Italy

^bUnit of Molecular Epidemiology, National Cancer Research Institute, Genova, Italy

^cUnit of Medical Statistics and Cancer Epidemiology, Department of Medical Sciences, University of Piemonte Orientale and CPO-Piemonte, Novara, Italy

^dDepartment of Biology, University of Pisa, Pisa, Italy

^eCPO-Piemonte and Unit of Cancer Epidemiology, Department of Human Oncology and Biomedical Sciences, University of Turin, Turin, Italy

^fDepartment of Oncology, Biology and Genetics, University of Genova, Genova, Italy

^gUnit of Epidemiology and Biostatistics, National Cancer Research Institute, Genova, Italy

^hUnit of Medical Oncology, Casale Monferrato Hospital, Local Health Authority Casale Monferrato, Italy

Received 20 May 2008; received in revised form 31 July 2008; accepted 4 August 2008

Abstract

Malignant mesothelioma (MM) is a rare and aggressive tumor of the pleura. The most important causal factor for the development of MM is occupational exposure to asbestos. Different lines of evidence suggest a role of genetic background in MM development, as for other cancers. Two published studies observed an association between MM and *N*-acetyl-transferase 2 (NAT2) polymorphisms. First, a Finnish study observed that the NAT2 slow acetylator phenotype was associated with an increased risk of MM. Conversely, MM risk was higher in Italian subjects carrying the NAT2 fast acetylator genotypes. The conflicting results obtained in Finland and Italy could be ascribed to random chance, considering the small panel of patients and controls in the two studies, but also ethnic or other differences may have been important. To ascertain the role of NAT2 genotype, we performed a study on 252 MM patients and 262 controls recruited in two Northern Italy areas that were characterized by high asbestos exposure, due to intense industrial activities (an asbestos cement factory in Casale Monferrato, mainly shipyards and refineries in Liguria). Unconditional multivariate logistic regression was used to estimate odds ratios (ORs) and 95% confidence intervals (CIs). NAT2 fast acetylator genotypes showed an increased OR, although not statistically significant, both in asbestos-exposed subjects (OR = 1.47; 95% CI = 0.96–2.26) and in the entire population (OR = 1.38; 95% CI = 0.93–2.04). These results suggest that NAT2 polymorphisms do not exert a strong effect on individual susceptibility to MM.

© 2008 Elsevier GmbH. All rights reserved.

Keywords: Asbestos; Mesothelioma; *N*-acetyltransferase; Oxidative stress; Single nucleotide polymorphism

*Corresponding author. Tel.: +39 0321 660644; fax: +39 0321 620421.

E-mail address: irma.dianzani@med.unipmn.it (I. Dianzani).

Introduction

The association of asbestos exposure and malignant mesothelioma (MM) is well documented, but the mechanism of action has not been completely clarified (Robinson et al., 2005). Asbestos fibers chronically retained in the lung and the pleura can be carcinogenic as the result of mechanical effects, such as interference with mitotic spindle formation and the segregation of chromosomes, leading to breaks and aberrations (Jensen et al., 1996). A different hypothesis involves the generation of reactive oxygen species (ROS) either by reactions promoted by catalytic iron ions contained in asbestos molecules or by frustrated phagocytes (Chen et al., 1996; Fung et al., 1997). Asbestos-induced oxidative damage has been clearly demonstrated, both in vitro and in vivo: its consequences include DNA single-strand breaks and DNA base modification (Wang et al., 1998). A promotion effect is also suggested by the effect of asbestos exposure on the induction of signal transduction and methylation of gene promoters (Lee and Testa, 1999; Manning et al., 2002; Yang et al., 2006; Zanella et al., 1996; Christensen et al., 2008).

About 80% of MM patients have a history of asbestos exposure (Robinson et al., 2005), but only 5–10% of individuals exposed to high levels actually develop MM and its onset is usually 30–40 years after the first exposure (Bianchi et al., 1997). The combined role of genetics and asbestos exposure, suggested by familial aggregation (Ascoli et al., 1998; Roushdy-Hammady et al., 2001), has been discussed recently in two extensive literature reviews (Ascoli et al., 2007; Ugolini et al., 2008).

Several genetic association studies addressed the identification of the traits that may predispose to asbestos damage susceptibility and MM (reviewed in Neri et al., 2008). Most studies so far have addressed specific hypotheses, under the candidate gene approach. An association of gene polymorphisms leading to defective DNA repair with an increased risk of MM has been explored, for the first time, in the framework of a population-based case–control study conducted in Casale Monferrato, a Northern Italian area subjected to heavy exposure due to an important asbestos cement factory (Dianzani et al., 2006). An association of *XRCC1*-399Q and *XRCC3*-241T with the risk of MM was observed.

Other studies were focused on genes involved in xenobiotic metabolism and in protection from ROS, under the hypothesis that a reduced protection might increase DNA damage and facilitate carcinogenesis. A group of subjects from the Cancer of RESpiratory Tract (CREST) biorepository in Liguria (Northern Italy), where asbestos has been extensively used in port, shipyard and industrial activities, showed an increased risk of MM in subjects bearing a *GSTM1* null allele and

in those with the Ala/Ala genotypes at codon 16 within *MnSOD* (Landi et al., 2007).

Controversial results were found regarding MM risk associated to *N*-acetyltransferase 2 (*NAT2*). Hirvonen et al. (1995, 1996) showed an increased risk of MM in Finnish subjects occupationally exposed to asbestos and carrying the *NAT2* slow acetylator phenotype, whereas Neri et al. (2005) found an increased risk for *NAT2* fast acetylator in CREST subjects. The latter study also reported an association of MM with microsomal Epoxide Hydrolase (*mEH*) and found that *mEH* interacted with both *NAT2* and *GSTM1* genes according to a multiplicative model. The *GSTM1* null genotype showed an increased risk in studies from both Finland and Liguria (Neri et al., 2006).

The discrepancies among the studies of Hirvonen and Neri could be due to chance, but the different ethnic origin and habits of the two studied populations, the Finns and the Italians, could have a role. A main drawback of these studies was the low number of cases and controls.

NAT2 phenotypes have been associated with other cancer types, such as bladder cancer (Sanderson et al., 2007; Vineis, 2002): in this case the biological effect is expected to be mediated by exposure to carcinogenic aromatic amines. The carcinogenic mechanism favoured by these SNPs in MM is unclear.

In this paper, we evaluated *NAT2* genotypes in two studies conducted in Northern Italy: a panel of 133 cases and 182 controls from the case–control study in Casale Monferrato and 119 patients and 80 controls from Liguria CREST biorepository. The pooled analysis of both datasets was carried on.

Patients and methods

Study population: the Casale Monferrato panel

A population-based case–control study on MM of the pleura was conducted within Casale Monferrato Local Health Authority (LHA) to assess the risk associated with environmental asbestos exposure and the interaction of such exposure with genetic polymorphisms. Asbestos exposure (both occupational and domestic/environmental) was frequent because an asbestos cement factory had been active in Casale from 1907 to 1985 (Magnani et al., 2000, 2001, 2007).

This study involved the cases of MM histologically diagnosed during the study period (from January 2001 to December 2005) in subjects resident in Casale Monferrato LHA. Routine histology included immunohistochemical staining. Histological types of patients are reported in Table 1.

The study design has been reported in detail elsewhere (Dianzani et al., 2006). Briefly, controls were randomly sampled from the local population using the rosters

Table 1. Descriptive analyses of the subjects included in the study

	Casale Monferrato		CREST-Liguria	
	Cases <i>n</i> (%)	Controls ^a <i>n</i> (%)	Cases <i>n</i> (%)	Controls ^a <i>n</i> (%)
Gender				
Male	89 (67%)	127 (70%)	100 (84%)	57 (71%)
Female	44 (33%)	55 (30%)	19 (16%)	23 (29%)
Total	133 (100%)	182 (100%)	119 (100%)	80 (100%)
		<i>p</i> = 0.59		<i>p</i> = 0.03
Age (mean ± standard deviation)	66.3 ± 11.8	62.8 ± 11.3	68.3 ± 10.3	63.2 ± 13.0
		<i>p</i> = 0.008		<i>p</i> = 0.002
Asbestos exposure				
Exposed	115 (86%)	131 (72%)	99 (83%)	40 (50%)
Not exposed	2 (2%)	51 (28%)	20 (17%)	40 (50%)
n.a.	16 (12%)	0	0	0
		<i>p</i> < 0.0001		<i>p</i> < 0.0001
Type of asbestos exposure				
Occupational (high)	63 (55%)	70 (54%)	80 (81%)	14 (35%)
Domestic/environmental (low)	52 (45%)	61 (46%)	19 (19%)	26 (65%)
Total	115 (100%)	131 (100%)	99 (100%)	40 (100%)
Histological subtypes				
Epithelioid	94 (71%)		75 (63%)	
Sarcomatous	10 (8%)		8 (7%)	
Mixed	26 (20%)		16 (13%)	
Undefined	3 (2%)		20 (17%)	
Total	133 (100%)		119 (100%)	

^aIn both Casale and Liguria participation was higher for cases than controls and, for the latter among younger subjects. In Liguria a difference was also observed for the two sexes. In both groups the expected association of mesothelioma with asbestos exposure was observed. All analyses were adjusted for these factors.

made available from the LHA of Casale Monferrato and including all the residents in the area. Cases and controls were matched by sex and age (1-year-interval). In order to increase the study power in the age classes when mesothelioma incidence is lower, two sampling ratios were used: two controls per case if the case was older than 60 or four controls per case if the case was younger than 60 years.

Informations about cases and controls (lifelong occupational, residential history) were collected with a standard questionnaire (Magnani et al., 2000). An informed consent statement was signed by all participants before the interview. Blood samples were collected from 133 MM patients and 182 controls out of the 185 and 418 eligible.

The information about asbestos exposure, collected by the questionnaires, was evaluated blindly by an industrial hygienist (Dr. Mirabelli) and summarized as: “certain occupational”, “probable occupational”, “possible occupational”, “household occupational”, “environmental occupational” and “no evidence of exposure”. Exposure was further summarized as a binary variable (exposed versus non-exposed).

Study population: the Liguria panel from CREST biorepository

The Cancer of RESpiratory Tract (CREST) biobank was established in 1996 within the National Cancer Research Institute of Genoa. The main objective of this initiative was to support the conduction of multi-centric molecular epidemiology and translational studies of lung cancer and MM to investigate biological mechanisms and to develop tools and strategies for primary and secondary prevention of respiratory tract cancer, with a special focus on MM (Ugolini et al., manuscript in preparation). The establishment of specialized biorepositories linked to extensive databases of clinical and epidemiological information is an efficient approach to address emerging priorities in cancer research.

Biological specimens are collected from incident cases recruited in pneumology departments of major general hospitals located in Liguria region. MM incidence is particularly high here, because of the high concentration of asbestos related industries, including an extensive shipyard activity (Gennaro et al., 2005). Controls are

healthy subjects (blood donors, recreational associations) and controls hospitalized for non-neoplastic, non-respiratory conditions (mostly traumatic diseases or eye diseases). In addition, patients hospitalized for non-neoplastic respiratory conditions, mostly Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) and asbestosis, were recruited, but were not included in the present study.

Subjects are recruited after active search, and before contributing any kind of biological sample they are requested to sign an informed consent.

An extensive questionnaire is administered by trained personnel, including socio-demographic data, residence history, current and past occupations or hobbies in which the subject may have been in contact with asbestos, lifestyle information (tobacco smoke and diet), medical history and family history of cancer in first degree relatives. Questionnaires are then processed and valid data are stored in the CREST database.

Peripheral blood samples are collected with coded vacutainers by routine venipuncture. Several different biological samples are preserved: whole blood, plasma, serum, lymphocytes and, whenever possible, pleural fluid and bioptic or surgery cancer tissue samples. Collection, transportation, and storage are performed according international standards. The overall number of subjects recruited as of January 2008 is 1600 (including 210 MM and 440 lung cancer). The bank includes a total of 10,055 sample aliquots.

Genotyping analysis: the Casale Monferrato panel

Human blood samples (6ml) were collected into EDTA-vacutainer and stored at -20°C . Genomic DNA was extracted from peripheral blood lymphocytes using QIAamp[®] DNA Blood Maxi Kit (QIAGEN).

A fragment of 559 bp of NAT2 gene was amplified by PCR. The PCR reactions were performed in a total volume of 25 μl containing 100 ng genomic DNA, 1 U Taq polymerase (PE Applied Biosystems) in 1X Buffer (Tris-HCl, KCl), 2 mM MgCl_2 , 0.2 mM dNTPs and 0.5 μM each primers (NAT2F 5'-TGACGGCAGGAA-TTACATTGTC-3' and NAT2R 5'-ACACAAGGGTT-TATTTTGTCC-3').

The NAT2 genotypes were determined using a SNaPshot technique, a multiplex primer extension that allow to study at the same time until eight SNPs using primers with increasing length (primer SNP NAT2 M2 5'-ATTTACGCTTGAACCTC-3', primer SNP NAT2 M1 5'-AAAAAAAAGAGAGGAATCTGGTAC-3', primer SNP NAT2 M3 5'-AAAAAAAACCAAACCTGGTGATG-3').

From these genotypes we derived NAT2 alleles and their associated phenotypes (slow and fast acetylator) according with the NAT2 nomenclature database

(www.louisville.edu/medschool/pharmacology/NAT.html) (Hein et al., 2000a, b).

For the determination of acetylator status, we classified as fast acetylator phenotypes those genotypes possessing at least one NAT2*4 allele (the NAT2*4 allele has been designated as the wild-type human allele) (Hein et al., 2000a, b). We classified as slow acetylator phenotypes those genotypes possessing two variant alleles. It should be noted that some authors consider also an intermediate phenotype, that includes genotypes heterozygous for the NAT2*4 allele.

Genotyping analysis: the Liguria panel from CREST biorepository

Blood samples (3 ml) were obtained by venipuncture, collected in vacutainer containing sodium citrate and stored at -80°C until use. All samples were coded to ensure a blind analysis. DNA was extracted from peripheral blood lymphocytes and genotyping analyses were performed on all the subjects.

Subjects have been genotyped for NAT2 polymorphism by RFLP-PCR firstly (Neri et al., 2005). Subsequently, most of the same patients plus a number of newly recruited subjects have been genotyped as described in Landi et al. (2007), by a microarray technique (APEX) that was capable to give information on hundreds of SNPs, including NAT2.

With RFLP-PCR method, three slow acetylator alleles (NAT2*5, NAT2*6 and NAT2*7) were identified using primers 5'-TGACGGCAGGAA-TTACATTGTC and 3'-ACACAAGGGTTTATTTTGTCC in the PCR. Aliquots of the PCR products were incubated with restriction enzymes *Kpn* I, *Taq* I and *Bam* HI to distinguish the slow acetylator alleles from the wild type NAT2*4 allele (Neri et al., 2005).

With the APEX method, the polymorphisms were analysed all at once for a given sample by a microarray technique based on the arrayed-primer extension (APEX) principle. APEX consists of a sequencing reaction primed by an oligonucleotide anchored with its 5' end to a glass slide and terminating just one nucleotide before the polymorphic site. Details on this technique were reported extensively in several previous publications and are not described here for brevity (Guo et al., 1994; Landi et al., 2003, 2005; Metspalu and Shumaker, 1999). For each polymorphism, the flanking sequences and their related APEX-probes are available elsewhere (Gemignani et al., 2002). Five-prime (C-12) aminolinker oligonucleotides were synthesized by Sigma Genosys (Sigma-Genosys Ltd., Cambridge, UK) and spotted onto silanized slides (Rothman, 1990; Tönisson et al., 2002). Slides were imaged by a Genorama-003 four-color detector, equipped with Genorama image analysis software (Asper Biotech, Tartu, Estonia).

Fluorescence intensities at each position were converted automatically into base calls by the software, under the supervision of trained personnel. In case of more than one signal present on a given position, only the main signal was considered if the intensity of the weaker signal was lower than 10% of the main signal.

Haplotypes were reconstructed using the software PHASE (Stephens and Donnelly, 2003) and a global test of hypothesis for the gene was carried out, followed by contrasts for specific haplotypes. Haplotypes with frequency below 5% were pooled, to reduce the degrees of freedom. *N*-acetyl transferase 2 genotypes were grouped according to Wikman and co-workers (Wikman et al., 2001). The haplotypes *4, *12, and *13 were all considered associated with a 'fast' acetylator phenotype, whereas the haplotypes *5, *6, and *7 were considered as 'slow' acetylators. Thus, subjects were grouped according to their status as 'fast acetylators' when they carried two 'fast' alleles or when they carried one 'fast' and one 'slow' allele, and 'slow acetylators' when they carried two 'slow' alleles.

Quality control measures

DNA samples from case patients and control subjects were randomly distributed, and all genotyping was conducted by personnel who were blinded to the case–control status of the DNA sample. DNA samples from individuals of known genotypes were added to ensure the validity of the genotyping.

The Casale panel of patients and controls (in total 315 subjects) has been subjected to SNaPshot analysis. Sixty of these (20%) have been also analysed with a sequencing technique (ABI Prism 3100).

The Liguria panel (199 subjects) had been analysed by using a custom microarray based on the APEX technology. Moreover, several strategies were followed: (1) each APEX oligonucleotide was spotted in replicate, (2) each SNP was analysed independently, by genotyping both the sense and the anti-sense strands of the DNA (in case of disagreement the base call was discharged), (3) on the corners of the microarray, internal positive controls allowed to verify that the intensities of the four channels (A, C, T, G) were equilibrated, (4) base-calls were carried out by the surveillance of three independent trained operators; discordant results were re-checked, and, in case of disagreement, were discharged, (5) 10% of the study subjects were randomly selected (i.e., both case patients and control subjects) and re-analysed blindly for each polymorphism.

Statistical analysis

Odds Ratio (ORs) and 95% confidence interval (95% CI) were estimated using multivariate unconditional logistic regression. Analyses focused on phenotypes and asbestos exposure and were adjusted by age and gender.

The statistical analyses were conducted separately for Casale Monferrato and Liguria panel and the data of individual studies were pooled together, including the provenience of the samples, in the logistic model. SAS Software (Release 8.2, by SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) was used to perform all statistical analyses.

Results

Table 1 summarizes the main information on the patients and controls who participated in the study. Distribution of phenotypes by cases and controls is reported in Table 2.

In the Casale Monferrato panel NAT2 fast acetylators showed a non significantly increased OR for MM compared to slow acetylators, both in asbestos-exposed subjects (OR = 1.45; 95% CI = 0.86–2.44) and in the entire population (OR = 1.34; 95% CI = 0.80–2.23). No trend in OR was observed when the fast and intermediate acetylators were analysed separately (in asbestos exposed subjects: intermediate vs. slow OR = 1.49; 95% CI = 0.86–2.60; fast vs. slow OR = 1.27; 95% CI = 0.47–3.38). None of the results reached statistical significance.

Similarly, in the Liguria panel the OR was higher for subjects bearing the fast acetylator genotypes than for slow acetylators, both in asbestos-exposed subjects (OR = 1.66; 95% CI = 0.74–3.71) and in the entire population (OR = 1.54; 95% CI = 0.82–2.88), without reaching statistical significance.

When we considered the two populations together, we observed a non significant OR increase for MM, both in asbestos-exposed subjects (OR = 1.47; 95% CI = 0.96–2.26) and in the entire population (OR = 1.38; 95% CI = 0.93–2.04).

Discussion

N-acetyl-transferases (NAT1 and NAT2) enzymes are involved in the activation of the carcinogenetic effects of aromatic and heterocyclic amines. They catalyze both *O*-acetylation, leading to activation, and *N*-acetylation, leading to deactivation of these amines (Hein et al., 2000a, b). Since they are polymorphic in humans and are represented by many variants characterised by a different activity, their role in cancer susceptibility has been postulated for many years.

In particular, NAT1 and NAT2 polymorphisms have been involved in the development of bladder, colorectal, breast, head and neck, lung and prostate cancer, often with controversial results. For example, the slow acetylator phenotype has been involved in the development of bladder cancer, while the fast acetylator

Table 2. Association of NAT2 phenotypes and asbestos-related pleural malignant mesothelioma in subjects from Casale Monferrato, from Liguria CREST biorepository and pooled

Study group	NAT2 phenotype	All subjects			Asbestos-exposed subjects		
		Cases	Controls	OR (95% CI)	Cases	Controls	OR (95% CI)
Casale Monf.	Slow acetylator	70	108	1.0 (ref.)	60	81	1.0 (ref.)
	Fast acetylator	63	74	1.34 (0.80–2.23)	55	50	1.45 (0.86–2.44)
CREST Liguria	Slow acetylator	48	43	1.0 (ref.)	39	20	1.0 (ref.)
	Fast acetylator	71	37	1.54 (0.82–2.88)	60	20	1.66 (0.74–3.71)
Pooled ^a	Slow acetylator	118	151	1.0 (ref.)	99	101	1.0 (ref.)
	Fast acetylator	134	111	1.38 (0.93–2.04)	115	70	1.47 (0.96–2.26)

Odds Ratio (ORs) and 95% confidence interval (95% CI) from multivariate unconditional logistic regression adjusted by age and gender.

^aAdjusted for age, gender and study centre.

phenotype has been associated with colon cancer (Hein, 2002). This discrepancy may be due to the different pathogenesis of the two cancers. In fact, NAT2 deactivates the aromatic amines, whose accumulation in the bladder is carcinogenic; but the same enzyme activates the heterocyclic amines, that are involved in colon cancer. Thus, a reduction of NAT2 activity favours bladder cancer, while it may exert a protective effect in the case of colon cancer. Opposite results obtained on the same cancer type are more difficult to explain, such as those reported for lung cancer (Hein et al., 2000a, b) and also for MM.

NAT2 genotypes have been among the first polymorphisms implicated in MM development, but the results were contradictory: the fast acetylator phenotype was reported as a risk factor in Italians and a protective factor in Finns (Hirvonen et al., 1995; Neri et al., 2005). The very low number of cases and controls used in both these studies and the heterogeneity of those results prompted us to further investigate the association in an independent set of cases and controls. We have thus analysed NAT2 genotypes in a panel of patients and controls from Casale Monferrato. Additional subjects from the CREST biorepository in Liguria were also genotyped, and we finally performed a pooled analysis of these data.

This procedure allowed us to obtain the largest number of MM cases ever studied in a molecular epidemiology study. Results from the two Northern Italian areas were in agreement, and after re-analysis NAT2 fast acetylators showed an increased MM risk, although statistical significance was not reached.

Our data show that NAT2 genotypes do not have a strong effect on MM susceptibility, although it is possible that increased numbers of cases and controls would allow our data to reach statistical significance. Moreover, the mechanism that would explain a role for NAT2 in MM development is unclear. Asbestos is not a NAT2 substrate, neither arylamine or heterocyclic amine exposure has ever been associated with MM

development. It has been postulated that NAT2 may be involved in carcinogenesis through folate metabolism: NAT1 and NAT2 can acetylate *para*-aminobenzoyl-L-glutamate, a folate catabolite (Wang et al., 2005).

The association between acetylator phenotypes and risk of MM was hypothesized to be mediated by the acetylation step in the interconversion of polyamines (Hirvonen et al., 1995; Seiler and Bolkenius, 1985). It was shown that asbestos fibers are able to induce ornithine decarboxylase enzyme activity resulting in stimulated polyamine synthesis and increased cell proliferation (Marsh and Mossman, 1991). However, at the moment there are not evidences supporting a direct role of NAT2 in the metabolism of polyamines.

In conclusion, the hypothesis of a role of an association of NAT2 polymorphisms in MM susceptibility may require further investigation.

Acknowledgments

We are greatly indebted to all those who agreed to participate in this study and contributed to it, particularly the MM patients and their physicians and the controls and their family doctors. We are also indebted to the heads and the medical staff of the Units of Pneumology (E. Piccolini), Pathology (M. Pavesi), Oncology (M. Botta, B. Castagneto, A. Muzio, and D. Degiovanni), Blood Transfusion Department (R. Guaschino) and Medicine (V. Cocito) of Casale Monferrato Hospital. The work illustrated in this paper was partially funded by grants AIRC, Fondazione Buzzi Unicem Onlus, Regione Piemonte Ricerca Sanitaria Finalizzata and CIPE.

References

Ascoli, V., Scalzo, C.C., Bruno, C., Facciolo, F., Lopergolo, M., Granone, P., Nardi, F., 1998. Familial pleural

- malignant mesothelioma: clustering in three sisters and one cousin. *Cancer Lett.* 130, 203–207.
- Ascoli, V., Cavone, D., Merler, E., Barbieri, P.G., Romeo, L., Nardi, F., Musti, M., 2007. Mesothelioma in blood related subjects: report of 11 clusters among 1954 Italy case series review of the literature. *Am. J. Ind. Med.* 50, 357–369.
- Bianchi, C., Giarelli, L., Grandi, G., Brollo, A., Ramani, L., Zuch, C., 1997. Latency periods in asbestos-related mesothelioma of the pleura. *Eur. J. Cancer Prev.* 6, 162–166.
- Chen, Q., Marsh, J., Ames, B., Mossman, B.T., 1996. Detection of 8-oxo-2'-deoxyguanosine, a marker of oxidative DNA damage, in culture medium from human mesothelial cells exposed to crocidolite asbestos. *Carcinogenesis* 17, 2525–2527.
- Christensen, B.C., Godleski, J.J., Marsit, C.J., Houseman, E.A., Lopez-Fagundo, C.Y., Longacker, J.L., Bueno, R., Sugarbaker, D.J., Nelson, H.H., Kelsey, K.T., 2008. Asbestos exposure predicts cell cycle control gene promoter methylation in pleural mesothelioma. *Carcinogenesis*, (2008 February 28. [Epub ahead of print]).
- Dianzani, I., Gibello, L., Biava, A., Giordano, M., Bertolotti, M., Betti, M., Ferrante, D., Guarrera, S., Betta, G.P., Mirabelli, D., Matullo, G., Magnani, C., 2006. Polymorphisms in DNA repair genes as risk factors for asbestos-related malignant mesothelioma in a general population study. *Mutat. Res.* 599, 124–134.
- Fung, H., Kow, Y.W., Van Houten, B., Mossman, B.T., 1997. Patterns of 8-hydroxydeoxyguanosine formation in DNA and indications of oxidative stress in rat and human pleural mesothelial cells after exposure to crocidolite asbestos. *Carcinogenesis* 18, 825–832.
- Gemignani, F., Landi, S., Vivant, F., Zienolddiny, S., Brennan, P., Canzian, F., 2002. A catalogue of polymorphisms related to xenobiotic metabolism and cancer susceptibility. *Pharmacogenetics* 12, 459–463.
- Gennaro, V., Ugolini, D., Viarengo, P., Benfatto, L., Bianchelli, M., Lazzaretto, A., Montanaro, F., Puntoni, R., 2005. Incidence of pleural mesothelioma in Liguria Region, Italy (1996–2002). *Eur. J. Cancer* 41, 2709–2714.
- Guo, Z., Guilfoyle, R.A., Thiel, A.J., Wang, R., Smith, L.M., 1994. Direct fluorescence analysis of genetic polymorphisms by hybridization with oligonucleotide arrays on glass supports. *Nucleic Acids Res.* 22, 5456–5465.
- Hein, D.W., 2002. Molecular genetics and function of NAT1 and NAT2: role in aromatic amine metabolism and carcinogenesis. *Mutat. Res.* 506–507, 65–77.
- Hein, D.W., Doll, M.A., Fretland, A.J., Leff, M.A., Webb Xiao, G.H., Devanaboyina, U.S., Nangju, N.A., Feng, Y., 2000a. Molecular genetics and epidemiology of the NAT1 and NAT2 acetylation polymorphisms. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 9, 29–42.
- Hein, D.W., Grant, D.M., Sim, E., 2000b. Update on consensus *N*-acetyltransferase gene nomenclature. *Pharmacogenetics* 10, 291–292.
- Hirvonen, A., Pelin, K., Tammilehto, L., Karjalainen, A., Mattson, K., Linnainmaa, K., 1995. Inherited GSTM1 and NAT2 defects as concurrent risk modifiers in asbestos-related human malignant mesothelioma. *Cancer Res.* 55, 2981–2983.
- Hirvonen, A., Saarikoski, S.T., Linnainmaa, K., Koskinen, K., Husgafvel-Pursiainen, K., Mattson, K., Vainio, H., 1996. Glutathione S-transferase and *N*-acetyltransferase genotypes and asbestos-associated pulmonary disorders. *J. Natl. Cancer Inst.* 88, 1853–1856.
- Jensen, C.G., Jensen, L.C.W., Rieder, C.L., Cole, R.W., Ault, J.C., 1996. Long crocidolite asbestos fibers cause polyploidy by sterically blocking cytokinesis. *Carcinogenesis* 17, 2013–2021.
- Landi, S., Gemignani, F., Gioia-Patricola, L., Chabrier, A., Canzian, F., 2003. Evaluation of a microarray for genotyping polymorphisms related to xenobiotic metabolism and DNA repair. *Biotechniques* 35, 816–820, 822, 824–827.
- Landi, S., Gemignani, F., Monnier, S., Canzian, F., 2005. A database of single-nucleotide polymorphisms and a genotyping microarray for genetic epidemiology of lung cancer. *Exp. Lung Res.* 31, 223–258.
- Landi, S., Gemignani, F., Neri, M., Barale, R., Bonassi, S., Bottari, F., Vanessa, P.A., Canzian, F., Ceppi, M., Filiberti, R., Ivaldi, G.P., Mencoboni, M., Scaruffi, P., Tonini, G.P., Mutti, L., Puntoni, R., 2007. Polymorphisms of glutathione-S-transferase M1 and manganese superoxide dismutase are associated with the risk of malignant pleural mesothelioma. *Int. J. Cancer* 120, 2739–2743.
- Lee, W.C., Testa, J.R., 1999. Somatic genetic alterations in human malignant mesothelioma. *Int. J. Oncol.* 14, 181–188.
- Magnani, C., Agudo, A., Gonzales, C.A., Andron, A., Calleja, A., Chellini, E., Dalmaso, P., Escobar, A., Hernandez, S., Ivaldi, C., Mirabelli, D., Ramirez, J., Turuguet, D., Usel, M., Terracini, B., 2000. Multicentric study on malignant mesothelioma and non-occupational exposure to asbestos. *Br. J. Cancer* 83, 104–111.
- Magnani, C., Dalmaso, P., Biggeri, A., Ivaldi, C., Mirabelli, D., Terracini, B., 2001. Increased risk of malignant mesothelioma of the pleura after residential or domestic exposure to asbestos. A case-control study in Casale Monferrato-Italy. *Env. Health Persp.* 109, 915–919.
- Magnani, C., Ferrante, D., Barone Adesi, F., Bertolotti, M., Todesco, A., Mirabelli, D., Terracini, B., 2007. Cancer risk after cessation of asbestos exposure. A cohort study of Italian asbestos cement workers. *Occup. Environ. Med.*, 1–17.
- Manning, C.B., Cummins, A.B., Jung, M.W., Berlinger, I., Timblin, C.R., Palmer, C., Taatjes, D.J., Hemenway, D., Vacek, P., Mossman, B.T., 2002. A mutant epidermal growth factor receptor targeted to lung epithelium inhibits asbestos-induced proliferation and proto-oncogene expression. *Cancer Res.* 62, 4169–4175.
- Marsh, J.P., Mossman, B.T., 1991. Role of asbestos and active oxygen species in activation and expression of ornithine decarboxylase in hamster tracheal epithelial cells. *Cancer Res.* 51, 167–173.
- Metspalu, A., Shumaker, J.M., 1999. DNA resequencing mutation detection and gene expression analysis by oligonucleotide microchips. *Biomethods* 10, 371–397.
- Neri, M., Filiberti, R., Taioli, E., Garte, S., Paracchini, V., Bolognesi, C., Canessa, P.A., Fontana, V., Ivaldi, G.P., Verna, A., Bonassi, S., Puntoni, R., 2005. Pleural malignant mesothelioma, genetic susceptibility and asbestos exposure. *Mutat. Res.* 592, 36–44.
- Neri, M., Taioli, E., Filiberti, R., Ivaldi, G.P., Canessa, P.A., Verna, A., Marroni, P., Puntoni, R., Hirvonen, A., Garte, S., 2006. Metabolic genotypes as modulators of asbestos-related pleural malignant mesothelioma risk: a comparison

- of Finish and Italian populations. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 209, 393–398.
- Neri, M., Ugolini, D., Dianzani, I., Gemignani, F., Landi, S., Cesario, A., Magnani, C., Mutti, L., Puntoni, R., Bonassi, S., 2008. Genetic susceptibility to malignant pleural mesothelioma and other asbestos-associated diseases. *Mutat. Res.* 659, 126–136.
- Robinson, B.W., Musk, A.W., Lake, R.A., 2005. Malignant mesothelioma. *Lancet* 366, 397–408.
- Rothman, K.J., 1990. No adjustments are needed for multiple comparisons. *Epidemiology* 1, 43–46.
- Roushdy-Hammady, I., Siegel, J., Emri, S., Testa, J.R., Carbone, M., 2001. Genetic-susceptibility factor and malignant mesothelioma in the Cappadocian region of Turkey. *Lancet* 357, 444–445.
- Sanderson, S., Salanti, G., Higgins, J., 2007. Joint effects of the *N*-acetyltransferase 1 and 2 (NAT1 and NAT2) genes and smoking on bladder carcinogenesis: a literature-based systematic HuGE review and evidence synthesis. *Am. J. Epidemiol.* 166, 741–751.
- Seiler, N., Bolkenius, F.N., 1985. Polyamine reutilization and turnover in brain. *Neurochem. Res.* 10, 529–544.
- Stephens, M., Donnelly, P., 2003. A comparison of Bayesian methods for haplotype reconstruction from population genotype data. *Am. J. Hum. Genet.* 73, 1162–1169.
- Tõnisson, N., Zernant, J., Kurg, A., Pavel, H., Slavin, G., Roomere, H., Meiel, A., Hainaut, P., Metspalu, A., 2002. Evaluating the arrayed primer extension resequencing assay of TP53 tumor suppressor gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 5503–5508.
- Ugolini, D., Neri, M., Ceppi, M., Cesario, A., Dianzani, I., Filiberti, R., Gemignani, F., Landi, S., Magnani, C., Mutti, L., Puntoni, R., Bonassi, S., 2008. Genetic susceptibility to malignant mesothelioma and exposure to asbestos: the influence of the familial factor. *Mutat. Res.* 658, 162–171.
- Vineis, P., 2002. The relationship between polymorphisms of xenobiotic metabolizing enzymes and susceptibility to cancer. *Toxicology* 181–182, 457–462.
- Wang, D., Kreutzer, D.A., Essigmann, J.M., 1998. Mutagenicity and repair of oxidative DNA damage: insights from studies using defined lesions. *Mutat. Res.* 400, 99–115.
- Wang, H., Vath, G.M., Kawamura, A., Bates, C.A., Sim, E., Hanna, P.E., Wagner, C.R., 2005. Over-expression, purification, and characterization of recombinant human arylamine *N*-acetyltransferase 1. *Protein J.* 24, 65–77.
- Wikman, H., Thiel, S., Jager, B., Schmezer, P., Spiegelhalter, B., Edler, L., Dienemann, H., Kayser, K., Schulz, V., Drings, P., Bartsch, H., Risch, A., 2001. A relevance of *N*-acetyltransferase 1 and 2 (NAT1, NAT2) genetic polymorphisms in non-small cell lung cancer susceptibility. *Pharmacogenetics* 11, 157–168.
- Yang, H., Bocchetta, M., Kroczyńska, B., Elmishad, A.G., Chen, Y., Liu, Z., Bubici, C., Mossman, B.T., Pass, H.I., Testa, J.R., Franzoso, G., Carbone, M., 2006. TNF- α inhibits asbestos-induced cytotoxicity via a NF- κ B-dependent pathway, a possible mechanism for asbestos-induced oncogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103 (27), 10397–10402.
- Zanella, C.L., Posada, J., Tritton, T.R., Mossman, B.T., 1996. Asbestos causes stimulation of the extracellular signal-regulated kinase 1 mitogen-activated protein kinase cascade after phosphorylation of the epidermal growth factor receptor. *Cancer Res.* 56, 5334–5338.