

DELIBERAZIONE DEL DIRETTORE GENERALE
(Nominato con D.P.G.R.T. n. 233 del 13/12/2010)

N° 54 del 20/05/2013

Oggetto: Progetto "Targeting oxidative DNA damage at genomic and sequence level in a breast cancer case-control study and in vitro experiments" finanziato dalla Regione Toscana-ITT. Approvazione dello schema di convenzione, recepimento del finanziamento ed approvazione del piano economico finanziario.	
Struttura	S.C. Citopatologia, Citologia analitica e Biomolecolare
Proponente	
	Coordinatore Amministrativo
	Contabilità e Controllo di Gestione
Proposta n.	Responsabile del procedimento
	Estensore
	Monica Di Stasio

IMMEDIATAMENTE ESEGUIBILE

Conto Economico n. 3A01010201

Eseguibile a norma di Legge dal 04 GIU, 2013

Pubblicato a norma di Legge il 20 MAG, 2013

Inviato al Collegio Sindacale il 20 MAG, 2013

L'anno 2013, il giorno 20 del mese di Maggio
Il sottoscritto prof. Gianni Amunni, nella sua qualità di

DIRETTORE GENERALE

di questo Istituto per lo Studio e la Prevenzione Oncologica, con sede in Via Cosimo Il Vecchio 2 – 50139 Firenze, in forza del Decreto del Presidente della Giunta Regionale Toscana n. 233 del 13/12/2010.

Visto il D. Lgs.vo 30/12/1992 n. 502 e sue successive modifiche ed integrazioni e la L. R. Toscana n. 40 del 24/02/2005 di disciplina del Servizio Sanitario Regionale e successive modificazioni ed integrazioni;

vista la legge regionale 4 febbraio 2008, n. 3, così come modificata dalla Legge R.T. 32/12, ai sensi della quale è stato istituito ISPO – Istituto per lo Studio e la Prevenzione Oncologica - "ente del servizio sanitario regionale, dotato di personalità giuridica pubblica e di autonomia organizzativa, amministrativa e contabile" (art.1);

vista la delibera del Direttore Generale n. 4 del 12.01.2012 con la quale è stato approvato il regolamento dei progetti finalizzati;

visti:

- La Delibera della Giunta Regione Toscana n. 1148 del 28.12.2010 con la quale viene dato mandato alla Struttura della Direzione Generale Diritto di Cittadinanza e Coesione Sociale di indire un nuovo Bando per l'assegnazione di fondi per il finanziamento di progetti annuali, biennali e triennali di ricerca in campo oncologico;
- Il Decreto della Direzione Generale Diritto di Cittadinanza e Coesione Sociale n. 6709 del 31.12.2010 con il quale viene approvato il Bando per l'assegnazione di fondi per il finanziamento di progetti di ricerca in campo oncologico – anno 2010 - e la relativa modulistica prevedendo anche che i progetti ammissibili al finanziamento dovranno essere sottoposti alla valutazione di revisori qualificati e dell'International Scientific Advisory Board (ISAB) dell'ITT in modo da garantire un livello qualitativamente alto dei progetti da finanziare;
- Il Decreto della Direzione Generale Diritto di Cittadinanza e Coesione Sociale n. 4102 del 06.09.2012 con il quale viene approvato lo schema di convenzione per la disciplina dell'erogazione dei finanziamenti per i progetti di ricerca in campo oncologico;

preso atto che con Decreto della Direzione Generale Diritto di Cittadinanza e Coesione Sociale n. 6204 del 19.12.2012 a seguito dell'iter valutativo previsto, sono stati approvati dall'Ufficio di Direzione dell'ITT 26 progetti di ricerca tra cui 4 presentati da ISPO come sotto riportato:

1. *"Comparative risk assessment of social, behavioural and environmental risk factors"*, Resp. Prof. Annibale Biggeri, Euro 100.000,00, durata del progetto 2 anni;
2. *"Cancer clusters and citizens' alarms: epidemiological and statistical approaches"*, Resp. Dr.ssa Lucia Miligi, Euro 64.000,00, durata due anni;
3. *Molecular epidemiology of male breast cancer in Tuscany: genetic alterations and environmental factors"*, Resp. Dr. Domenico Palli, Euro 150.000,00, durata tre anni;
4. *"Targeting oxidative DNA damage at genomic and sequence level in a breast cancer case-control study and in vitro experiments"*, Resp. Dr. Marco Peluso, Euro 120.000,00, durata tre anni;

Preso atto che con nota protocollo ISPO n. 713 del 05.03.2013 l'Istituto Toscano Tumori ha inviato ad ISPO, per la sottoscrizione, il testo di convenzione (allegato alla presente sotto lettera "A" quale parte integrante e sostanziale) per regolare lo svolgimento dell'attività relativa al progetto di ricerca *"Targeting oxidative DNA damage at genomic and sequence level in a breast cancer case-control study and in vitro experiments"* il cui Responsabile per ISPO è il Dr. Marco Peluso; per il sopra citato progetto, la cui durata è di tre anni a decorrere dalla data di comunicazione avvio progetto da parte del responsabile, è previsto un finanziamento totale di € 120.000,00 che sarà erogato secondo le modalità previste in convenzione;

Vista la nota prot. 0017468/67sp del 18.03.2013, agli atti, con la quale il comitato Etico dell'Azienda USL 10 di Firenze ha espresso parere favorevole allo svolgimento dello studio;

rilevato che per le attività oggetto della convenzione che ISPO dovrà garantire, il Responsabile del progetto, Dr. Marco Peluso, Biologo Dirigente presso la SC Citopatologia, Citologia Analitica e Biomolecolare di ISPO, ha presentato una relazione progettuale per la realizzazione degli obiettivi previsti dal progetto, allegata alla presente sotto lettera "B" quale parte integrante e sostanziale;

ritenuto pertanto opportuno approvare il progetto, il relativo piano economico-finanziario (allegato alla presente sotto lettera "C" quale parte integrante e sostanziale) e lo schema di convenzione recependo il finanziamento totale pari ad Euro 120.000,00 (centoventimila/00);

vista la delibera del Direttore Generale n. 5 del 14.07.2008 con la quale è stato approvato il regolamento dell'ISPO;

con il visto di conformità giuridico amministrativa del Coordinatore Amministrativo;

con il parere favorevole del Direttore Sanitario

DELIBERA

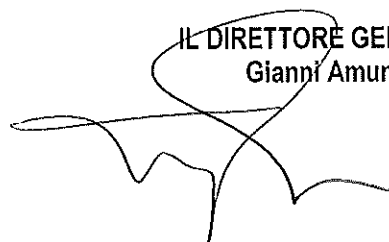
Per quanto esposto in narrativa, formante parte integrante e sostanziale del presente atto:

1. di approvare lo schema di convenzione per il progetto *Targeting oxidative DNA damage at genomic and sequence level in a breast cancer case-control study and in vitro experiments* allegato alla presente sotto lettera "A" quale parte integrale e sostanziale, finanziato dalla Regione Toscana- ITT autorizzandone al contempo la stipula e di recepire il relativo finanziamento pari ad Euro 120.000,00 (centoventimila/00);
2. di prendere atto ed approvare la relazione progettuale ed il relativo piano economico finanziario, redatti dal Dr. Marco Peluso, Responsabile del Progetto per ISPO, documenti allegati rispettivamente sotto le lettere "B" e "C" quali parti integranti e sostanziali;
3. di prendere atto che ISPO, per l'effettuazione delle attività connesse al progetto, riceverà dalla Regione Toscana-ITT la somma complessiva di Euro 120.000,00 (centoventimila/00), a valere dei ricavi registrati nel bilancio d'esercizio dell'Istituto per il periodo di competenza relativo, conto economico 3A01010201 "contributi da Regione Toscana-vincolati", aut. n. 85/13, cdc 698;
4. di trasmettere il presente atto all'albo di pubblicità degli atti di questo Istituto e al Collegio Sindacale.

IL DIRETTORE SANITARIO
Chiara Neri



IL DIRETTORE GENERALE
Gianni Amunni



Elenco degli allegati

Allegato A	Schema di convenzione tra ITT e ISPO	pagg. 36
Allegato B	relazione progettuale del Responsabile del progetto	pag. 02
Allegato C	piano economico finanziario	pag. 01

Strutture aziendali da partecipare:

S.C. Citopatologia, Citologia Analitica e Biomolecolare ISPO
S.S. Contabilità e Controllo di Gestione ISPO;
Gestione Contabile Progetti ISPO;
Supporto Amministrativo Attività Scientifica e di Ricerca ISPO;
Dipartimento Amministrazione e Finanza ASF.

20 MAG. 2013

REGIONE TOSCANA



Giunta Regionale

Progetti di ricerca ITT

CONVENZIONE

tra la Regione Toscana e l' ISPO - Istituto per lo Studio e la Prevenzione Oncologica per la realizzazione del progetto: "Targeting oxidative DNA damage at genomic and sequence level in a breast cancer case-control study and in vitro experiments".

La **REGIONE TOSCANA**, (di seguito chiamata Regione), Codice Fiscale 013866030488 rappresentata dal dirigente regionale Dr.ssa Simona Carli, nominata con decreto del Direttore Generale n. 220 del 04/02/2013 autorizzata, ai sensi della L.R. 1/2009, a sottoscrivere la presente convenzione approvata in schema con decreto n. 4102 del 06/09/2012;

E

ISPO - Istituto per lo Studio e la Prevenzione Oncologica - Codice Fiscale 94158910482 in persona del Prof. Gianni Amunni, nato a Firenze il 6/08/1954;

PREMESSO

- che la Regione con Decreto Dirigenziale n. 6709 del 31.12.2010 avente per oggetto "ITT - Approvazione del Bando per l'assegnazione di fondi per il finanziamento di progetti per la ricerca in campo oncologico - anno 2010 - e della relativa modulistica" ha approvato e di seguito diffuso un avviso pubblico;

- che la Regione in attuazione del suddetto Bando, con Decreto Dirigenziale n. 6204 del 19/12/2012 ha approvato il progetto, denominato "Targeting oxidative DNA damage at genomic and sequence level in a breast cancer case-control study and in vitro Experiments".

- che l'ISPO è in possesso dei titoli e dei requisiti richiesti dal Bando in oggetto per svolgere correttamente il progetto di ricerca;

- che il responsabile del progetto di ricerca è il Dr. Marco Peluso, nato a Genova il 18/11/1960;
- che il responsabile del progetto di ricerca condivide il contenuto della presente convenzione;

TUTTO CIÒ PREMESSO SI CONVIENE E SI STIPULA QUANTO SEGUE:

Art. 1

Premessa

La premessa costituisce parte integrante ed essenziale della presente convenzione.

Art. 2

Soggetto attuatore

L' ISPO, successivamente indicato anche come "soggetto attuatore", si impegna verso la Regione, a curare l'organizzazione e l'effettuazione delle attività indicate nel progetto di ricerca come sopra denominato, successivamente indicato semplicemente progetto, di cui si allega copia sotto la lettera A), quale parte integrante ed essenziale della presente convenzione.

Il soggetto attuatore, per la realizzazione delle attività progettuali, dovrà avvalersi di personale in possesso delle necessarie caratteristiche professionali specifiche; e si impegna al pieno rispetto della normativa in vigore, in particolare quella relativa alla sicurezza sui luoghi di lavoro. La Regione resta comunque estranea a qualsiasi rapporto di lavoro e collaborazione a qualunque titolo instaurato dal soggetto attuatore nello svolgimento e per le necessità del programma.

Art. 3

Finanziamento del progetto

Il progetto è finanziato dalla Regione per un costo complessivo di € 120.000 (centoventimila/00), secondo le modalità di erogazione previste al successivo art. 4, così ripartite, 1° anno € 40.000, 2° anno € 40.000, 3°anno € 40.000.

Il soggetto attuatore dichiara altresì che non esistono co-finanziamenti.

In particolare il soggetto attuatore dichiara di non cumulare il finanziamento approvato con altri ulteriori finanziamenti pubblici o privati già ottenuti per realizzare le stesse azioni e che non verranno chiesti in futuro altri finanziamenti pubblici per la realizzazione delle stesse azioni.

Il finanziamento previsto a carico della Regione si deve intendere al lordo di qualsiasi spesa e costituisce il tetto massimo di spesa rimborsabile. L'erogazione del saldo, al termine del progetto di ricerca, sarà subordinato all'obbligo di documentare le spese effettivamente sostenute, come meglio precisato anche nei successivi articoli della presente convenzione. La mancata presentazione, senza giustificato motivo della documentazione suddetta, entro i termini previsti dai successivi articoli, comporterà la decadenza del diritto al rimborso, nonché il recupero degli acconti già erogati, fatte salve eventuali altre azioni per la tutela degli interessi della Pubblica Amministrazione nelle sedi opportune.

Poiché trattasi di un contributo di ricerca, il finanziamento è fuori campo di applicazione IVA e non è oggetto alla ritenuta di acconto del 4% ai sensi dell'art. 28 del DPR 600/73.

Art. 4

Erogazione del Finanziamento

La Regione, in conformità del Bando Regionale in oggetto, si impegna ad erogare le somme di cui al precedente art. 3, al ricevimento della documentazione richiesta e con le seguenti modalità:

Il finanziamento relativo ai **progetti triennali** verrà erogato, salvo eccezioni, come segue:

- la prima erogazione, pari al 100% dell'importo finanziato per il primo anno, dopo la comunicazione di inizio del progetto di ricerca, firmata dal responsabile del progetto, contenente l'indicazione puntuale della data di avvio, non antecedente alla data del decreto di approvazione dei progetti.

- la seconda erogazione, pari al 100% dell'importo finanziato per il secondo anno, alla fine del primo anno dalla data dichiarata di inizio, inviando i seguenti documenti:

- Relazione scientifica sullo stato di avanzamento del progetto;
- Rendiconto delle spese effettivamente sostenute nell'intero primo anno di ricerca, da predisporre con gli stessi criteri utilizzati per la definizione del preventivo (vedi tab. 16 allegata al progetto). Il rendiconto dovrà essere redatto in relazione alle spese effettivamente sostenute per ogni singola voce del progetto, sulla base dei costi ammissibili previsti dalla normativa vigente;
- Dichiarazione sostitutiva resa ai sensi del DPR 28 Dicembre 2000, n. 445, con la quale il responsabile del progetto di ricerca attesta la veridicità ed esattezza dei dati esposti e dei documenti prodotti.

- la terza erogazione, pari al 70% dell'importo finanziato per il terzo anno, alla fine del secondo anno, seguito presentazione della medesima documentazione richiesta al termine del primo anno;

Si intende quindi che il 30% del finanziamento del terzo anno sarà anticipato dal soggetto attuatore; l'erogazione del saldo avverrà al termine della verifica dei documenti, nella misura delle spese effettivamente sostenute e documentate nel triennio, come dal successivo articolo 6.

Eventuali spostamenti di somme tra voci di spesa o da un anno all'altro, dovranno essere preventivamente autorizzati dalla Regione Toscana.

Tutti i documenti relativi al primo e al secondo anno del progetto dovranno essere trasmessi entro 30 giorni dal termine di ciascun anno.

L'esame della documentazione richiesta dovrà essere effettuato dagli organismi competenti entro 60 giorni dalla ricezione, in particolare la relazione scientifica sarà sottoposta a valutazione del Direttore Scientifico dell'ITT; entro tale termine dovrà essere

inoltre data comunicazione al responsabile del progetto sull'esito della verifica effettuata.

L'ultima rata del finanziamento verrà erogata a saldo delle spese effettivamente sostenute nella durata dell'intero progetto, rispettando il tetto massimo di spesa rimborsabile.

Entro 60 giorni dal termine del progetto, dovranno essere inviati:

- la relazione scientifica conclusiva stilata dal responsabile del progetto, corredata di eventuali pubblicazioni che dovranno citare il supporto della Regione Toscana -ITT,
- il rendiconto economico finale complessivo secondo quanto indicato al successivo art. 6.
- la dichiarazione sostitutiva resa ai sensi del DPR 28 Dicembre 2000, n. 445.

La documentazione finale dovrà essere approvata dall'Ufficio di Direzione dell'ITT entro 60 giorni dal ricevimento.

Ritardi o mancanza nel sottoporre questa documentazione potranno avere effetti negativi su successive richieste di finanziamento.

La Regione attuerà delle verifiche a campione sui documenti giustificativi di spesa utilizzando anche le strutture regionali competenti in materia. Il soggetto attuatore si impegna a restituire alla Regione gli importi da questa ricevuti, ma non riconosciuti ammissibili dall'Amministrazione stessa in sede di verifica finale del progetto, relativamente all'attività svolta. Il soggetto attuatore si impegna a restituire tali importi nelle forme e tempi indicati dalla Regione, fatto salvo il proprio diritto a prendere visione e controllare il verbale di accertamento finale delle spese, redatto in sede di verifica finale. L'eventuale recupero dei finanziamenti indebitamente ricevuti dal beneficiario finale sarà incrementato dagli interessi calcolati in base alla normativa vigente.

Art. 5 Durata del Progetto

Il progetto ha la durata di 3 anni. Il non avvio del progetto e la conseguente mancata comunicazione entro 30 (trenta) giorni dalla firma del presente atto comporterà la risoluzione della convenzione e non potrà essere rimborsata nessun tipo di spesa

Il progetto non potrà subire né modifiche né proroghe salvo in casi del tutto eccezionali per i quali saranno definite apposite procedure. Il soggetto attuatore ed il responsabile del progetto di ricerca invieranno motivata e ben documentata richiesta scritta alla Regione che, acquisito il parere del Direttore Scientifico dell'ITT, accorderà o meno tale richiesta. La concessione della eventuale proroga, che sarà subordinata alla riconosciuta sussistenza di ragioni di necessità e d'opportunità, non costituisce motivo di maggiorazione del corrispettivo accordato.

Qualora sia accertata la mancata o irregolare attuazione del programma la Regione potrà sospendere l'erogazione del finanziamento.

Art. 6

Rendiconto finale

Il soggetto attuatore si impegna a presentare alla Regione, entro 60 (sessanta) giorni dal termine delle attività, il rendiconto finale relativo alle spese effettivamente sostenute nella durata dell'intero progetto. Tale rendiconto verrà presentato utilizzando la tabella 16 e specificando all'interno di ogni macrovoce le singole voci di spesa, anno per anno, sulla base dei costi ammissibili previsti dalla normativa vigente.

Questo dovrà essere corredato dalla relazione illustrativa delle attività svolte e da una dichiarazione sostitutiva resa ai sensi del DPR 28 Dicembre 2000, n. 445, con la quale il responsabile del progetto di ricerca attesti la veridicità ed esattezza dei dati esposti e dei documenti prodotti.

Per quanto concerne l'I.V.A. e le altre imposte dirette o indirette che possono essere recuperate, rimborsate o compensate in qualsiasi modo e che pertanto non restano definitivamente a carico del soggetto attuatore, beneficiario finale del finanziamento, non possono essere ammesse a rimborso.

I documenti giustificativi di tutte le spese sostenute nel corso dell'attuazione del progetto, dovranno essere conservati secondo le norme di legge ed esibiti in originale, su richiesta della Regione, per le verifiche previste dall'art. 4.

Art. 7

Responsabile del progetto di ricerca

Se nel corso della durata del progetto termina il rapporto di lavoro tra il responsabile del progetto ed il soggetto attuatore, il finanziamento si intende sospeso.

Se ne esistono i presupposti, il soggetto attuatore o il responsabile del progetto possono far richiesta alla Regione Toscana affinché il finanziamento venga corrisposto ad altro soggetto attuatore o ad altro responsabile.

Art. 8

Parere Comitato Etico

Se il progetto prevede la sperimentazione umana, l'utilizzo di campioni biologici umani o la sperimentazione su animali o loro campioni biologici, è richiesto il parere positivo del Comitato Etico locale prima dell'avvio della ricerca. Per quanto riguarda la sperimentazione umana e l'utilizzo di campioni biologici umani deve essere prestata particolare attenzione alla sussistenza dei requisiti in materia di consenso informato.

Art. 9

Proprietà dei risultati e pubblicazione

Qualora il responsabile del progetto intenda procedere alla pubblicazione scientifica o divulgazione in forma orale e/o scritta di risultati, concernenti l'attività di ricerca relativa al progetto, potenzialmente suscettibili di tutela brevettuale, il responsabile del progetto dovrà farne richiesta attraverso comunicazione scritta all'ITT, allegando bozza della proposta di pubblicazione o della divulgazione. La richiesta si considera accolta qualora l'ITT, entro 30 (trenta) giorni dal ricevimento della predetta richiesta da parte del responsabile del progetto, non comunichi il proprio diniego.

L'ITT si avvarrà della collaborazione dell'Ufficio per la Valorizzazione della Ricerca Biomedica e Farmaceutica (UVaR), istituito presso la Direzione Generale Diritti di cittadinanza e coesione sociale, per la valutazione dei requisiti di brevettabilità dei risultati oggetto della suddetta pubblicazione e per eventuali azioni, concordate fra le parti, a tutela e valorizzazione della proprietà intellettuale relativa ai risultati derivanti dal progetto.

In caso di pubblicazione anche parziale dei risultati, è obbligatorio citare che la ricerca è stata fatta con il contributo della Regione Toscana-ITT.

La proprietà dei risultati eventualmente brevettabili sarà definita in ottemperanza a quanto stabilito dal "Codice della Proprietà Industriale" emanato con D. Lgs. 10 febbraio 2005, n. 30 a norma dell'art. 15 della L. 12.12.2002, n. 273 salvo particolari accordi che potranno essere stipulati anche successivamente tra le parti firmatarie del presente atto.

I proprietari dei risultati concedono l'uso degli studi, dei prodotti e delle metodologie sopra descritti per le finalità che le sono proprie, ferma restando la loro disponibilità in favore del Servizio Sanitario Regionale.

Art. 10
Foro Competente

Per ogni controversia che dovesse insorgere con riferimento alla presente convenzione è competente il Foro di Firenze.

Art. 11
Trattamento dati personali

Il trattamento dei dati personali viene effettuato ai sensi dell'art. 18 comma 2 del Decreto Legislativo n. 196 del 30 giugno 2003, per l'esclusivo svolgimento delle funzioni istituzionali dell'ente.

Art.12
Oneri Fiscali

La presente convenzione è redatta in due originali. In caso d'uso verrà registrata a tassa fissa, ai sensi del II comma dell'art. 5 (caso d'uso) e dell'art. 38 (tassa fissa) del DPR 26.10.72, n. 634 e successive modifiche ed integrazioni, a cura e spese del richiedente la registrazione. E' inoltre esente da bollo, ai sensi dell'art. 16, tab. B del DPR 26.10.72, n. 642, come modificato dall'art. 28 del DPR 30.12.82, n. 955.

Letto, approvato e sottoscritto

Per Regione Toscana

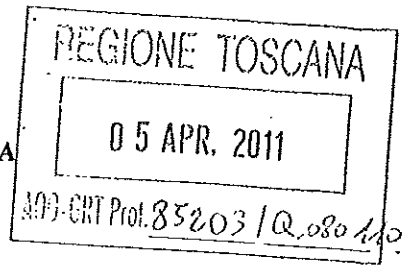
Simona Carli

Per ISPO

Gianni Amunni

Allegato "A"

ISTITUTO TOSCANO TUMORI (ITT) - REGIONE TOSCANA
GRANT PROPOSAL 2010



1. PRINCIPAL INVESTIGATOR (PI)

FIRST AND LAST NAME	MARCO PELUSO
POSITION TITLE	BIOLOGIST, RESPONSIBLE OF CANCER RISK FACTOR BRANCH
INSTITUTION	ANALYTICAL CYTOLOGY AND BIOMOLECULAR UNIT, ISPO-ISTITUTO PER LO STUDIO E LA PREVENZIONE ONCOLOGICA
ADDRESS	VIA COSIMO IL VECCHIO N°2
CITY	FLORENCE
PHONE	0553269786
E-MAIL	m.peluso@ispo.toscana.it
LEGAL REPRESENTATIVE	DR. G. AMUNNI
ADDRESS	VIA COSIMO IL VECCHIO N°2 50139
E-MAIL	g.amunni@ispo.toscana.it

2. PROJECT TITLE (Max 150 Characters)

Targeting oxidative DNA damage at genomic and sequence level in a breast cancer case-control study and in *in vitro* experiments

2.1 KEY-WORDS

Breast cancer
Oxidative DNA damage
Gene expression

3. ESTIMATED COMPREHENSIVE COSTS OF THE PROPOSED RESEARCH

Grant Requested to ITT (see n.16.5)	Euros	188000
Available Grant(s) co-financing the Proposal (see n. 17/17.1)	Euros	

4. PROJECT TIME-FRAME

Annual	
Biennial	
Triennial	X

5. EXTERNAL COLLABORATORS INVOLVED IN THE PROJECT (ADDITIONAL RESEARCH UNITS)

FIRST AND LAST NAME OF THE COLLABORATOR	INSTITUTION (FULL NAME AND ADDRESS)
Prof. Andrea Galli	Department of Clinical Physiopatology, University of Florence, Viale Pierraccini 6, Florence 50139

6. SIGNATURES

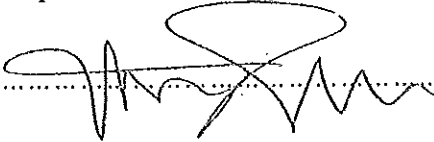
Principal Investigator	Legal Representative (o soggetto delegato alla firma)

6.1 DICHIARAZIONE DEL LEGALE RAPPRESENTANTE o DEL SOGGETTO DELEGATO ALLA FIRMA (obbligatoria)

Il Sottoscritto, in qualità di

DICHIARA:

- a) che il P.I. che presenta il progetto fa parte del personale "strutturato", dipendente con contratto a tempo indeterminato o determinato, dell'Istituzione proponente;
- b) che sul progetto presentato non esiste altra fonte di finanziamento se non quello dichiarato al punto 3. e specificato nel punto 17 e seguenti;
- c) di approvare quanto dichiarato al punto 16 e seguenti ed in particolare la tabella "justification on budget"

Firma del Legale Rappresentante (o Soggetto Delegato).....

6.2 DICHIARAZIONE DEL SOGGETTO DELEGATO

Se il progetto non è firmato dal Legale Rappresentante è necessario sottoscrivere anche la seguente dichiarazione:

Il Sottoscritto..... **DICHIARA** di essere legittimato a firmare essendo in possesso di delega del Legale Rappresentante.

Firma

6.3 DICHIARAZIONE DEL P.I.

Il P.I. nell'inoltrare la domanda, **DICHIARA** specificatamente, che sarà presente a tempo pieno nell'istituzione in cui si svolge il progetto.

Firma del P.I.....

7. ABSTRACT (Max 2500 Characters)

Breast cancer (BC) is a leading cause of cancer death in Western country women. An excessive generation of reactive oxygen species (ROS) appears to be an important mechanism of breast carcinogenesis and tumor progression. ROS can cause several oxidative DNA lesions, including 7,8-dihydrox-8-oxoguanine (8-OxodG), 5-hydroxy-cytosine, 8-oxoadenine, 5,6-dihydroxy-5,6-dihydrothymidine and malondialdehyde-dG (M₁dG), that, if unrepaired, can cause somatic mutations. In particular, 8-OxodG and M₁dG are considered promising biomarkers of BC risk.

We will investigate the role of oxidative DNA lesions in breast carcinogenesis and tumor progression, considering the influence of life-style BC risk factors. Our approach will consist of a case-control study to compare the prevalence of oxidative DNA lesions in BC cases, with increasing degree of differentiation and severity of cancer, in respect to controls. This will be done by measuring M₁dG in breast middle core biopsies of BC cases and controls by ³²P-postlabelling. We will, at the same time, analyse the production at nucleotide level of 8-OxodG, 5-hydroxy-cytosine, 8-oxoadenine, 5,6-dihydroxy-5,6-dihydrothymidine on the untranscribed strand of DNA binding domain of p53, involved in 20% of BC, by Ligation Mediated (LM-PCR). After *in vitro* characterization of oxidative DNA lesions induced from a ROS-generating xantine/xantine oxidase (X/XO) system in the elicel and kinase domains of phosphatidylinositol 3-kinase, a BC related gene, by LM-PCR, the analysis of this biomarker will be applied to the case-control study.

Evidence is accumulating that oxidative lesions, i.e. 8-OxodG in the consensus binding sequence of relevant AP-1, SP1 and NF-kappaB transcription factors (TF) of promoter elements, can modulate gene expression. Thus, stably transfected cells containing promoter regions of BC genes and driving a luciferase reporter gene will be treated with X/XO system to evaluate the capability of ROS to modify gene expression. After identification of TF binding sequences by Genomatrix, we will measure the production of oxidative DNA lesions in the TF binding sequences of X/XO inducible genes. We will apply to the case-control study the analysis of oxidative lesions at TF binding sequences of X/XO inducible genes. We will subject to site-specific mutagenesis the X/XO inducible genes to evaluate whether an experimentally induced mutation at the same site of highly damage TF binding sites will impair the promoter activity. Finally, we will study the influence of antioxidant on oxidative DNA lesions induced from X/XO system. The analysis of oxidative lesions at genomic and nucleotide level of BC genes, will allow us to find a panel of biomarkers in breast carcinogenesis and tumor progression by the induction of somatic mutations and gene expression modification. Lifestyle factors playing a role in breast carcinogenesis will be identified.

8. SPECIFIC AIMS (Max 2500 Characters)

The aim of the present project is to investigate the role of oxidative DNA lesions at genomic and sequence level in breast carcinogenesis and tumor progression in women suffering breast cancer (BC) in respect to controls. Our approach consisted of a molecular epidemiology case-control study to compare the prevalence of M₁dG adduct and a panel of oxidative DNA lesions in breast middle core biopsies of BC cases, with increasing the degree of differentiation and severity of cancer, in respect to controls, considering relevant life-style factors.

In detail, our aims will be to analyse:

- 1) the association between M₁dG adduct, a biomarker of oxidative reactive oxygen species (ROS) and lipid peroxidation, and BC risk, at different clinical stages, considering the influence of life-style factors;
- 2) the association between a panel of oxidative DNA lesions, including 7,8-dihydrox-8-oxoguanine, 5-hydroxy-cytosine, 8-oxoadenine and 5,6-dihydroxy-5,6-dihydrothymidine, analysed at nucleotide level of the untranscribed strand of DNA binding domain of p53 and of elical and kinase domains of phosphatidylinositol 3-kinase (PIK3CA), and BC risk, at different clinical stages, considering the influence of life-style factors;
- 3) the association between ROS generating xantine/xantine oxidase (X/XO) system treatment and gene expression modification in BC related genes;
- 4) the association between a panel of oxidative DNA lesions measured at nucleotide level of promoter regions of ROS inducible genes and BC risk, at different clinical stages, considering the influence of life-style factors.
- 5) the association between the presence of highly oxidative damaged in transcription factor binding sites in promoter regions of BC related genes and gene expression modification.
- 6) the association of ³²P-postlabelling and LM-PCR measurements with cancer status and cancer severity to evaluate whether the analysis of oxidative DNA lesions at sequence level increase the power of the study.

The analyse of oxidative DNA lesions at genomic and nucleotide level of BC genes will allow us to find a panel of biomarkers involved in breast carcinogenesis and tumor progression, possibly by the induction of somatic mutations and gene expression modification, to be used in clinical and cancer prevention studies. Lifestyle factors playing a relevant role in breast carcinogenesis will be identified and considered from future BC cancer prevention projects.

9. BACKGROUND AND RATIONALE (Max 4000 Characters)

Breast cancer (BC) is a leading cause of cancer death among Western country women and, at the same time, it is a disease still difficult to prevent because its aetiology is not well understood. Lifestyle factors, such as obesity and smoking habit, have been shown to be associated with increased BC risk (Bissonauth 2009). A nested case-control study has reported that women who smoked more than nine pack-years of cigarettes had a 59% higher BC risk (Bissonauth 2009). An association between estrogen exposure, chronic inflammation and increased risk of developing BC has been suggested (Bartsch 1999; Loft 2008; Peluso 2011).

Knowledge of how such risk factors induce tumorigenesis in breast tissues is not well defined, but it appears that an excessive generation of reactive oxygen species (ROS) can be an important mechanism of breast carcinogens (Bartsch 1999; Loft 2008; Peluso 2011). ROS have been shown to cause many oxidative DNA lesions, including 7,8-dihydrox-8-oxoguanine (8-oxoG), 7,8-dihydro-8-oxoadenine (8-oxoA), 5-hydroxy-cytosine (5-hydroxyC), 5,6-dihydroxy-5,6-dihydrothymidine (5,6-dihydroT) and, by base propanol formation and by lipid peroxidation, 3-(2-deoxy-β-D-erythro-pentafuranosyl)pyrimido[1,2-α]purin-10(3H)-one deoxyguanosine (M₁dG) adduct.

Enhanced 8-OxoG level has been associated with BC (Dziaman 2009). We have recently conducted a pilot BC case-control study to evaluate the frequency of Fine Needle Aspirate (FNA) M₁dG adduct, a biomarker of ROS and LPO, in the development and progression of BC (Peluso 2011). Our results indicate that an increment of frequency of M₁dG adduct can contribute to the development and progression of BC. An M₁dG increment (not statistically significant) was observed in smoker women, indicating tobacco smoking such as a relevant source of ROS in BC tissue (Peluso 2011).

Such DNA lesions, if unrepaired, can induce somatic mutations and ultimately cancer progression (Cooke 2003; Loft 2008). Evidence is accumulating that oxidative DNA lesions can modulate DNA protein interactions and affect promoter function (Cooke 2003; Mitchel and Ghosh, 2007; Zhang 2008). Oxidative lesions in the consensus binding sequence of AP-1, SP1 and NF-kappaB transcription factors (TF) of promoter elements have been associated with gene expression modification (Cooke 2003). Such lesions have the capacity to interfere with normal gene regulation through direct interactions with promoter elements, or indirectly by establishing new TF binding sites (Mitchel and Ghosh, 2007).

Formation of DNA damage is a crucial event in carcinogenesis. Irreparable DNA lesions have the potential to cause mispairing during DNA replication, thereby, giving rise to somatic mutations. Critical mutations in cancer related genes, i.e. oncogenes and tumor suppressor genes, are key contributors to the carcinogenic process and tumor progression. Theoretically, the colocalization(s) of persistent DNA lesion(s) and somatic mutation(s) in cancer related genes could be used for causality inference (Besaratina 2009).

Numerous studies have identified p53 somatic mutations in BC, i.e. exon 5 at codons 146 (G→A) and 159 (C→T); exon 7 at codons 237 (G→T) and 238 (G→T) (Gasco 2002). A meta-analysis has revealed that approximately 20% of all cases have mutant p53. P53 mutations have been also associated with more aggressive disease and worse overall survival.

Somatic mutation in phosphatidylinositol 3-kinase (PIK3CA), a gene coding for a group of lipid kinases that regulate signaling pathways involved in cell proliferation, adhesion, survival, and motility, have been reported in BC (Wu 2005). 20.6% of primary breast tumors have been found with PIK3CA mutations, located on elical domain, e.g. exon 9 (C→G and G→A), and on kinase domain, e.g. exon 20 (A→G and A→G) (Wu 2005). Candidate oxidative DNA lesions for somatic mutations include 8-oxoG for G→T, 5-hydroxyC for C→T, 5-oxoA for A→G, 5,6-dihydroxyT for T→G, M₁dG for G→A and G→C (Cooke 2003; VandervVeen 2003).

In collaboration with the University of Florence, we have recently started to evaluate the distribution and levels of a large panel of oxidative DNA lesions, e.g. 8-oxoG, 5-hydroxyC, 8-oxoA and 5,6-dihydroT, induced from increased concentrations of a ROS generating xantine/xantine oxidase (X/XO) system on the untranscribed strand of DNA binding domain of p53. The treatment of MDA-MB23 cell lines with increased concentrations of X/XO system at different time induced a statistical significant increment of oxidative DNA damage in the exon 5 and 7 of p53 in respect to untreated cells by Ligation

Mediated PCR (LM-PCR) ($p < 0.05$). A specific and reproducible pattern of hot DNA damaged spots was found (Figures 1 and 2). Some hot spots were localized in correspondence of p53 mutational hot spots, e.g. codons 144, 146, 152, codons 156-159 (a known CpG island), for exon 5 and codons 237 and 238 for exon 7 (<http://www-p53.iarc.fr/>).

First year

Task 1. Population study and sampling (1-12 months). This task will consist in the recruitment of three groups of BC cases defined by histological tumor grade, e.g. G1, G2 and G3, and a group of controls among women undergoing breast investigation for diagnostic purpose at the Unit of Senology. Ethical clearance for this study will be obtained from the institutional ethic committee. All voluntaries will signed an informed consent after being informed of the purpose of the study. After informed consent, breast middle core (BMC) biopsies will be collected, snap-frozen in liquid nitrogen and stored at -80° for subsequent analysis. Before BMC sampling, a standardized questionnaire will be used to collect demographic and other relevant life-style information (see above). Clinical parameters, including histological tumour grade (G), estrogen/progesterone receptor status, pathological diameter (pT) and radiological diameter of benign and tumour breast lesions will be available. Histopathological diagnosis of the tissue will be performed in the laboratory of the Unit of Senology (Prof. S. Bianchi).

Sample size calculation. Sample size calculation has been performed using the malondialdehyde-dG (M_1dG) adduct data available from a pilot BC study (Peluso 2011). In the present project, we propose to collect about 200 MBC biopsies for M_1dG analysis, (about 100 samples per year). Considering three groups defined by tumor grade, e.g. G1, G2, G3, and the group of controls and fixing $\alpha = 0,05$ (two-sided) and $SD = 5$ to reach a statistical power $\geq 80\%$ and observe a different significant mean we will have: a) If the mean of DNA lesions of the four different groups (controls, G1, G2, G3) are respectively 2, 4, 6, 8, the statistical power will be of 92% with 20 samples per groups (80 samples in total); b) If the mean of DNA lesions of the four different groups (controls, G1, G2, G3) are respectively 2, 4, 5, 6, the statistical power will be of 84% with 35 samples per groups (140 samples in total); c) If the mean of DNA lesions of the four different groups (controls, G1, G2, G3) are respectively 2, 3, 4, 5, the statistical power will be of 84% with 60 samples per groups (240 samples in total). Since no data are available for DNA damage analysis at sequence level, we propose to start the analysis in a reduced group of subjects, e.g. 30 sample per groups. At the end of the first year the statistical power of the study will be measured.

Assessment of lifestyle factors.

- 1) The study subjects will completed an person interviewer-administered core questionnaire that included information regarding age, place of residence, education, height, weight and history of weight change, reproductive history, parity, breastfeeding, age at menarche, oral contraception, hormone replacement therapy, marital status, tamoxifen use and alcohol consumption. They will also completed an interviewer-administered semiquantitative food frequency questionnaire (FFQ) over the telephone.
- 2) To assess weight history, participants will be asked about their current weight and their weight when they were 20, 30, and 40 years old. They will be also asked to give their highest weight (excluding pregnancies) as well as their age at their highest weight.
- 3) To assess smoking habit, the subjects will be asked if they ever smoked, and if they were currently smoking, their age at smoking initiation, age at smoking cessation, and average cigarettes consumption per day. A pack-year index will be computed by multiplying the total number of years smoked by average consumption (in packs per day) over the smoking period.
- 4) Menopausal status will be classified as either premenopause, natural postmenopause, surgical post menopause, or unknown, based on self-report of menstrual history. Age at menopause will be the age at last natural menstrual cycle followed by one year of amenorrhea. For stratified analyses, categories of premenopausal and postmenopausal that included both natural and surgical menopausal groups will be used. Women with unknown menopausal status will be excluded from the stratified analyses.

DNA extraction. This task will consist in preparation and purification of DNA samples. DNA will be then isolated and purified using a method that requires digestion with ribonuclease A, ribonuclease T1

and proteinase K, extraction with saturated phenol, phenol/chloroform/isoamyl alcohol, chloroform/isoamyl alcohol and ethanol precipitation. DNA will be gently dissolved in sterile distilled water and its concentration and purity determined using a Beckman DU 800 spectrophotometer. Coded DNA will be stored at -80°C until laboratory analysis.

Task 2. Analysis of M₁dG adduct on BMC biopsies in the BC case-control study (3-26 months).

This task will consist in the analyses of the level of M₁dG adduct in the BMC biopsies DNA of BC cases and controls collected from the Unit of Senology by ³²P-postlabeling assay.

³²P-postlabeling assay. DNA (1-2 µg) will be digested by micrococcal nuclease and spleen phosphodiesterase. After nuclease P1 treatment, M₁dG adduct will be labelled with [γ -³²P]-ATP. The analysis of M₁dG adduct will be performed by multidirectional chromatography. Detection and quantification of M₁dG adduct and normal nucleotides will be performed as previously described (Peluso 2011). M₁dG adduct levels will be expressed such as relative adduct labelling (RAL)=pixel in adducted nucleotides/pixel in total nucleotides. M₁dG adduct values will be corrected across experiments based on the recovery of the internal standard.

Task 3. Analysis of a panel of oxidative DNA lesions exon 5-8 of p53 and on exon 9 and 20 of phosphatidylinositol 3-kinase (PIK3CA) in MDA-MB23 cell lines treated with a ROS generating xantine/xantine oxidase (X/XO) system (1-3 months).

The main aims of this task will consist in the analyses of oxidative lesions, including 7,8-dihydrox-8-oxoguanine (8-oxoG), 7,8-dihydro-8-oxoadenine (8-oxoA), 5-hydroxy-cytosine (5-hydroxyC), 5,6-dihydroxy-5,6-dihydrothymidine (5,6-dihydroT) at base level of the untranscribed strand of DNA binding domain of p53 and elical and kinase domains of PIK3CA, a BC related gene involved in 20% of BC, in MDA-MB23 cell lines treated at increasing dose of X/XO system by LM-PCR. After *in vitro* characterization of oxidative DNA lesions induced from X/XO system in p53 and PIK3CA the analysis of this biomarker will be applied to the case-control study. The choice of biomarker, in term of targeted exon will be influenced from the pattern and the level of DNA lesions measured in the *in vitro* experiments.

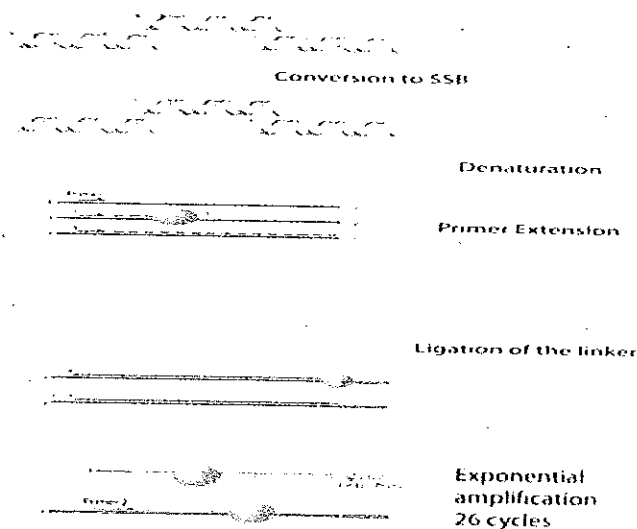
LM-PCR assay. Several methods have been developed for determining the sequence specificity of DNA damaging agents in single-copy genes in mammalian cells. The LM-PCR is a versatile DNA lesions footprinting technique, which enables sensitive and specific detection of DNA damage, at the level of nucleotide resolution, in genomic DNA (Besaratnia 2009). LM-PCR is a polymerase stop based assay, which take advantage of the fact that DNA polymerase cannot synthesize past certain type of lesions, i.e. single strand breaks (SSB).

- 1) The first step of the technique is the conversion of oxidative DNA lesions to SSB characterized by a 5'-phosphate terminus that will be obtained by incubation of DNA (1-2 µg) with Mut M (Formamidopyrimidine DNA glycosylase) and Nth protein. Mut M is a BER DNA repair enzyme that recognizes many modified bases including 7,8-dihydrox-8-oxoguanine, 8-oxoadenine and 5-hydroxy-cytosine. Nth protein is effective for 5,6-dihydroxy-5,6-dihydrothymidine and 5-hydroxy-cytosine (Figure 4).
- 2) The second step is an asymmetric PCR with a specific primer for the untranscribed strand, to produce DNA fragment with an unknown blunt end.
- 3) The third step is an overnight ligation of an asymmetrical double-strand DNA linker (β linker from Komura and Riggs) to the unknown blunt-ended DNA fragment by incubation with T4 ligase, providing a common sequence on the 5' end of all fragments.
- 4) The fourth step is a linear and exponential PCR amplification of DNA fragments using a specific nested oligonucleotide labelled with infrared fluorochrome in the presence of the linker primer.
- 5) The sixth step consists in the size fractionation of the PCR products on a sequencing polyacrylamide gel with Infra red direct detection by Licor. The sequence of the gene under examination will be sequenced on the same gel by coupled amplification and sequencing (CAS). Image Quant software will be used to measure precisely the intensity of each bands. In each experiment, an area corresponding to the experimental condition that could not generate a band

(either experimental condition without DNA polymerase or without DNA) will be delimited and defined as 'background'. This background will be subtracted from all the measured bands. The band intensity value (minus the background) will express the level of oxidative DNA damage. Values will be corrected across experiments based on the recovery of internal standard.

Figure 4. General ligation mediated-PCR procedure.

Task 4. Analysis of a panel of oxidative DNA lesions on a selected exon of p53 and one of PIK3CA on BMC biopsies in BC case-control study (4-12 months). This task will consist and in the measurement of panel of oxidative DNA lesions, e.g. 8-oxoG, 8-oxoA, 5-hydroxyC, and 5,6-dihydroT, at nucleotide level of the untranscribed strand of DNA binding domain of p53 in the BMC DNA of BC cases and controls collected from the Unit of Senology by LM-PCR.



Task 5. Analysis of gene expression modulation induced by X/XO system in stably transfected MDA-MB23 cell lines containing promoter regions of 11 BC genes by luciferase reporter vector system (4-12 months). Evidence is accumulating that oxidative lesions, i.e. 8-OxodG in the consensus binding sequence of relevant AP-1, SP1 and NF-kappaB transcription factors (TF) of promoter elements, can modulate gene expression. Thus, stably transfected cells containing promoter regions of BC genes and driving a luciferase reporter gene (SwitchGear Genomic, <http://switchgeargenomics.com/>) will be treated with X/XO system to evaluate the capability of ROS to modify gene expression. The analysis will be performed in 11 BC related genes TP53, RASSF1A, HOXA5, TWIST1, CCND2, p16, BRCA1, RAR β , ER α , PGR, CDH1 (Dworkin 2009).

Second year

Task 1. Population study and sampling (1-12 months; see above).

Task 2. Analysis of M₁dG adduct on BMC biopsies in the BC case-control study (1-12 months; see above).

Task 3. Analysis of a panel of oxidative DNA lesions on a selected exon of p53 and a one of PIK3CA on BMC biopsies in BC case-control study (1-12 months; see above).

Task 4. Identification of transcription factor (TF) binding sequences of inducible X/XO genes by

Genomatrix and primer synthesis (1-3 months). The consensus binding sequence of AP-1, SP1 and NF-kappaB TF in promoter elements of inducible X/XO genes will be identified by Genomatrix, Matinspector <http://www.genomatix.de/en/produkte/genomatix-software-suite.html#1>. Appropriate primers will be designed to study a panel of oxidative DNA lesions in TF binding sequences.

Task 5. Analysis of a panel oxidative DNA lesions in the consensus binding sequence of AP-1, SP1 and NF-kappaB transcription factors in promoter elements of inducible X/XO genes in MDA-B23 cell lines (4-12 months). It will be analysed a panel of oxidative DNA lesions in the consensus binding sequence of AP-1, SP1 and NF-kappaB transcription factors (TF) in promoter elements of inducible X/XO system by LM-PCR. Such lesions have been associated with gene expression modification (Zhang 2008); they could have the capacity to interfere with normal gene regulation through direct interactions with promoter elements, or indirectly by establishing new TF binding sites.

Task 6. Analysis of a panel of oxidative of DNA lesions in the consensus binding sequence of AP-1, SP1 and NF-kappaB TF in promoter elements of X/XO inducible CB genes (at least 5 genes) in BMC biopsies (6-12 months). This task will consist in the analysis of a panel of oxidative DNA lesions in the consensus binding sequence of AP-1, SP1 and NF-kappaB TF in promoter elements of X/XO inducible genes in the case-control study by LM-PCR.

Task 7. Analysis of gene expression modification induced X/XO treatment by site direct mutagenesis assay in stably transfected MDA-MB23 cell lines (6-12 months). The aim of this task will be to evaluate whether the inclusion of modified base in correspondence of highly damaged sites in the consensus binding sequence of AP-1, SP1 and NF-kappaB transcription factors (TF) in promoter elements of BC related genes impair the promoter activity of those genes. This will be done by site-specific mutagenesis (Agilent) followed by luciferase reporter vector system analysis (SwitchGear Genomic) for those MDA-MB23 cell lines transfected with promoter regions found to be responsive to X/XO system treatment. We will first modified the sequence of promoter regions of our BC related genes using specific primers containing a modified base/s at the same site of highly damaged base. Then, MDA-MB23 cell lines will transfected with the modified promoter regions and treated with the X/XO system treatment; luciferase activity will be measured in the lysate by luminometer.

Task 8. Analysis of oxidative DNA lesions on exons 5-7 of p53 and on exon 9 and 20 of phosphatidylinositol 3-kinase (PIK3CA) in MDA-MB23 cells exposed to X/XO system in presence of antioxidants (1-12 months). We will *in vitro* evaluate whether relevant natural compounds (antioxidants) can modulate the formation of oxidative DNA damage hot spot in cancer related genes under study by LM-PCR.

Third year

Task 1. Analysis of M₁dG adduct on BMC biopsies in the BC case-control study (1-6 months; see above).

Task 2. Analysis of a panel of oxidative DNA lesions on a selected exon of p53 and one of PIK3CA on BMC biopsies in BC case-control study (1-6 months; see above).

Task 3. Analysis of a panel oxidative DNA lesions in the consensus binding sequence of AP-1, SP1 and NF-kappaB transcription factors in promoter elements of inducible X/XO genes in MDA-B23 cell lines (1-3 months; see above).

Task 4. Analysis of a panel of oxidative of DNA lesions in the consensus binding sequence of AP-1, SP1 and NF-kappaB TF in promoter elements of X/XO inducible CB genes in BMC biopsies (1-6 months; see above).

Task 5. Analysis of gene expression modification induced X/XO treatment by site direct mutagenesis assay in stably transfected MDA-MB23 cell lines (1-4 months; see above).

Task 6. Analysis of oxidative DNA lesions on exons 5-7 of p53 and on exon 9 and 20 of phosphatidylinositol 3-kinase (PIK3CA) in MDA-MB23 cells exposed to X/XO system in presence

of antioxidants (1-6 months).

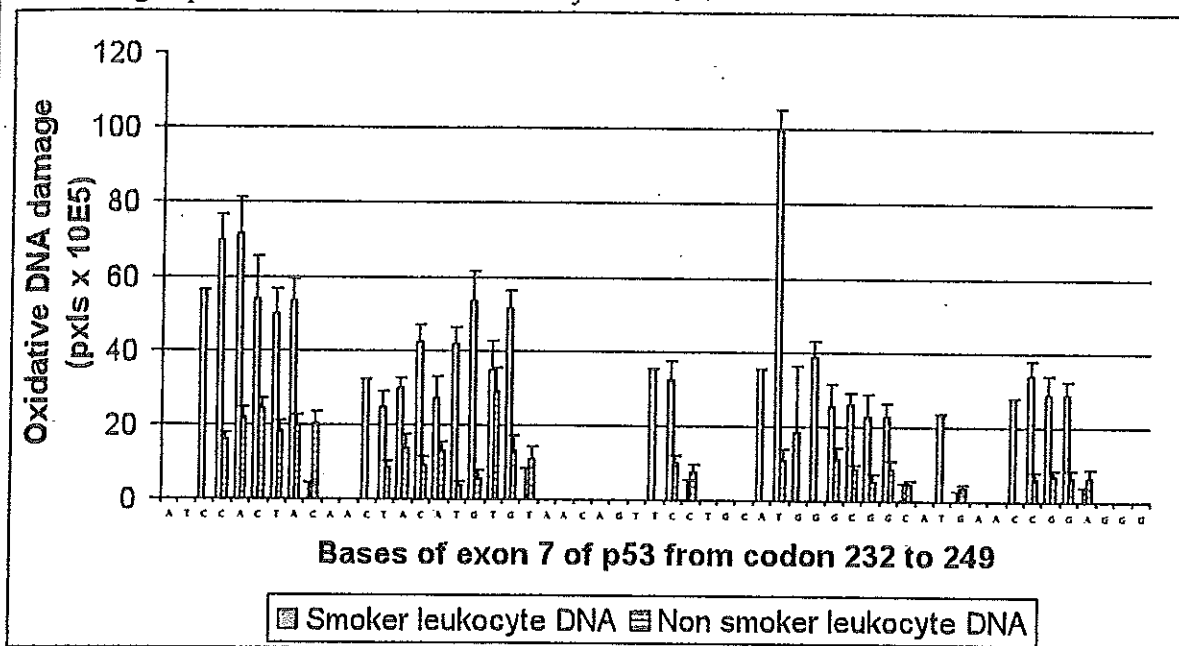
Task 7. Data input, data analysis, results evaluation and scientific reports (27-36 months). A descriptive analysis will be initially performed to explore the relationship between individual variables and different covariates. In the univariate setting, the mean levels of biomarkers across the levels of each variable. The multivariate analysis will be then performed using log-normal regression models including terms for cancer status, age, smoking habit, to estimate the effect of each variable on the outcome adjusting for the concomitant effect of the other variables included in the model. A p-value of < 0.05 (two-tailed) will be considered significant for all of the tests. Parametric and non-parametric tests will be applied to evaluate the statistical significance.

In detail, it will be analysed:

- 1) the association between M₁dG adduct, a biomarker of oxidative reactive oxygen species (ROS) and lipid peroxidation, and BC risk, at different clinical stages, considering the influence of life-style factors;
- 2) the association between a panel of oxidative DNA lesions analysed at nucleotide level of the untranscribed strand of DNA binding domain of p53 and helical and kinase domains of PIK3CA, and BC risk, at different clinical stages, considering the influence of life-style factors;
- 3) the association of ³²P-postlabelling and LM-PCR measurements with cancer status and cancer severity to evaluate whether the analysis of oxidative DNA lesions at sequence level increase the power of the study;
- 4) the association between a panel of oxidative DNA lesions measured at nucleotide level of promoter regions of X/XO inducible BC related genes and BC risk, at different clinical stages, considering the influence of life-style factors;
- 5) the association between X/XO system treatment and increased generation of oxidative DNA lesions in BC related genes;
- 6) the association between X/XO system treatment and gene expression modification in BC related genes;
- 7) the association between highly oxidative damaged TF sites and gene expression modification in BC related genes.

Management. The project could be managed in partnership with the "Inter-Institutional Integrated Department University of Florence/AOUC-Careggi/Meyer (DIPINT)". ISPO delegates DIPINT at the organizational and accounting support, transferring funding share to it. The scientific activity will be guaranteed by ISPO.

Figure 4. Intensity and distribution of oxidative DNA lesions along the exon 7 of the p53 in leukocyte DNA of a group of smokers and non smokers by LM-PCR.



Feasibility

This is a feasible project because it is not dependent on the success of developing new technology, a very high background in molecular epidemiology study, samples collection and storage, M₁dG adduct determination have been reached by ISPO-laboratory. The LMPCR assay proposed for the analysis of oxidative DNA lesions has been validated in in vitro experiments and in humans study (Figure 1-4). The proposal to analyse oxidative lesions in the consensus binding sequence of AP-1, SP1 and NF-kappaB transcription factors in promoter elements associated to gene expression modification is innovative. Furthermore, increasing evidence is accumulating that oxidative DNA lesions can modulate DNA protein interactions and affect promoter function (Cooke 2003; Mitchel and Ghosh, 2007; Zhang 2008). Another strength of this project is that the statistical power combined to the possibility to work on the target tissue of cancer will be sufficient to determinate differences in oxidative DNA lesions by the four groups defined by tumor grade. The samples size should be also sufficient to evaluate association with relevant BC risk associated life-style factors. The collaboration with the University of Florence and the Unit of Biostatistic and the Unit of Senology, ISPO, are consolidated. Finally, women undergoing breast examination for diagnostic purpose will be representative of Tuscany female population. All equipments and facilities necessary to perform the molecular biology analysis described in the present project are available in the laboratories of Dr. Peluso and Prof. Galli.

Perspectives

The analyse of the association between oxidative DNA damage at genomic and base level of BC relevant genes, at different clinical stages, will allow us to find a specific pattern of alterations of BC risk, possibly involved in the induction of mutations and gene expression modification. Our results will be useful to identify lifestyle factors playing a role in BC risk. The identification of antioxidant agents capable to modify the production of oxidative DNA damage could be a base for dietary intervention studies.

12. REFERENCES

- 1) Bissonauth V, Shatenstein B, Fafard E, Maugard C, Robidoux A, Narod S, Ghadirian P. Risk of breast cancer among French-Canadian women, noncarriers of more frequent BRCA1/2 mutations and consumption of total energy, coffee, and alcohol. *Breast J.* 2009;15 S1:S63-71.
- 2) Peluso M, Munnia A, Risso GG, Catarzi S, Piro S, Ceppi M, Giese RW, Brancato B. Breast fine-needle aspiration malondialdehyde deoxyguanosine adduct in breast cancer. *Free Radic. Res.* 2011.
- 3) Bartsch H, Nair J, Owen RW. Dietary polyunsaturated fatty acids and cancers of the breast and colorectum: emerging evidence for their role as risk modifiers. *Carcinogenesis.* 1999;20:2209-18.
- 4) Loft S, Møller P, Cooke MS, Rozalski R, Olinski R. Antioxidant vitamins and cancer risk: is oxidative damage to DNA a relevant biomarker? *Eur J Nutr.* 2008;47 S2:19-28
- 5) Dziaman T, Huzarski T, Gackowski D, Rozalski R, Siomek A, Szpila A, Guz J, Lubinski J, Olinski R. Elevated level of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine in leukocytes of BRCA1 mutation carriers compared to healthy controls. *Int J Cancer.* 2009;125:2209-13.
- 6) Gasco M, Shami S, Crook T. The p53 pathway in breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2002;4:70-6.
- 7) Dworkin AM, Huang TH, Toland AE. Epigenetic alterations in the breast: Implications for breast cancer detection, prognosis and treatment. *Semin Cancer Biol.* 2009;19:165-71.
- 8) Besaratinia A., Pfeifer GP. DNA-lesion mapping in mammalian cells. *Methods* 2009;48:35-9.
- 9) Cooke MS, Evans MD, Dizdaroglu M, Lunec J. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *FASEB J.* 2003;17:1195-214.
- 10) Zhang R, Niu Y, Du H, Cao X, Shi D, Hao Q, Zhou Y. A stable and sensitive testing system for potential carcinogens based on DNA damage-induced gene expression in human HepG2 cell. *Toxicol In Vitro.* 2009 Feb;23(1):158-65.
- 11) David Mitchell D, Ghosh R. In: *Oxidative Damage to Nucleic Acids*, Edited by Mark D Evans and Marcus S Cookes. Landes Bioscience and Springer Biosciences, 2007, 91-99.
- 12) Wu G, Xing M, Mambo E, Huang X, Liu J, Guo Z, Chatterjee A, Goldenberg D, Gollin SM, Sukumar S, Trink B, Sidransky D. Somatic mutation and gain of copy number of PIK3CA in human breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2005;7:R609-16.
- 13) VandervVeen LA, Hasmin MF, Shyr Y, Maimett LJ. Induction of frameshift and base pair substitution mutations by the major DNA adduct of the endogenous carcinogen malondialdehyde. *Proc Natl Acad Sci* 2003;100:14247-14252

13. PERSONEL INVOLVED IN THE RESEARCH PROJECT - P.L.'s UNIT AND ADDITIONAL UNITS (IF ANY)

FIRST AND LAST NAME	Position	Project Role	Dedicated Time (%)
M. Peluso	Biologist (ISPO)	Coordinator, study design, data analysis, data evaluation, scientific reports	70%
S. Piro	Biologist (ISPO)	M,dG analysis	70%
TBD	Biologist (ISPO)	M,dG analysis, data input and support to statistital analysis	100%
TBD	Biologist (ISPO)	LMPCR support	100%
A. Munnia	Technical assistant (ISPO)	LMPCR	70%
B. Brancato	Director (ISPO)	Study design, samples collection, data evaluation, scientific reports	20%
G. G. Risso	MD (ISPO)	Samples collection	20%
S. Catarzi	MD (ISPO)	Samples collection	20%
D. Morreone	MD (ISPO)	Samples collection	20%
S. Bianchi	MD (ISPO)	Histology	20%
A. Biggeri	Director (ISPO)	Data analysis, data evaluation, scientific reports	20%
A.Galli	MD (University of Florence)	Coordinator additional research unit, study design, data evaluation, scientific reports	20%
E.Ceni	Biologist (University of Florence)	In vitro experiments	20%
T.Mello	Biologist (University of Florence)	In vitro experiments, data evaluation, scientific reports	20%
TBD	Biologist (University of Florence)	In vitro experiments	100%

14. CURRICULUM VITAE (Principal Investigator) (Max 4000 Characters)

Marco Peluso

Responsible of Cancer Risk Factor Branch
Unit of Analytical Cytology and Biomolecular
ISPO-Cancer Prevention and Research Institute
Via Cosimo il Vecchio 2
50139 Florence
Italy

Phone. + 39(0)5532697867

e-mail pelusomarco@gmail.com

Biosketch

Marco Peluso is the Molecular Biologist Responsible of the Cancer Risk Factor Branch, Analytical Cytology and Biomolecular Unit, at ISPO-Cancer Prevention and Research Institute, Florence, Italy. He has been working in the fields of experimental oncology and molecular epidemiology for more than two decades. His current research examines the relationships between risk factors for cancer and the molecular mechanisms by which they exert their action (Molecular Epidemiology). His investigation has provided evidence of the detrimental effects due to environmental and occupational carcinogen exposures and has contributed to identify polymorphisms associated with increased cancer risk. He conducts research to elucidate the relationship between DNA damage, epigenetic mechanisms and cancer. In particular, he is interested to analyze the levels of oxidative DNA lesions at sequence levels of cancer related genes, such as p53 and K-ras. The mutations of interest are point mutations in DNA binding domain and promoter regions. In this manner, he will be capable to evaluate the association between DNA lesions, in both mutational hot spots than sites associates to gene expression modification (transcription factor binding sites), and cancer risk. His research provides the possibility to evaluate whether unrepaired oxidative DNA lesions at sequence level can influence the expression of cancer related genes. Unrepaired oxidative DNA lesions at sequence level may play a relevant role in epigenetic processes that lead to aberrant cell growth and differentiation, events frequently observed in cancer. Such research is conducted in the context of cross sectional and site-specific case-control studies. The picture emerging from his research in this field is that early modifications of DNA express both external exposure than genetic susceptibility; unrepaired DNA damage events can be associated to increased cancer risk. He has experience on collecting and managing biological samples stored in biological bank at -80°C or in liquid nitrogen, including blood, biopsy samples and frozen tissues obtained at surgery from participants in research investigations. He is an external reviewer of international funding agencies and scientific journals.

Employments

- '02-11: Biologist Leader, Cancer Risk Factor Branch, Analytical Cytology and Biomolecular Unit, ISPO, Florence, Italy.
- '03: Visiting Scientist, Department of Biology, Cancer Center, Duarte, California.
- '97-01: Researcher, Team Leader, DNA Adduct Laboratory, Experimental Oncology Unit, NCI, Genoa, Italy.
- '90-97: Researcher, Team Leader, DNA Adduct Laboratory, Unit of Environmental and Occupational Epidemiology, NCI, Genoa, Italy
- '89-90: Visiting Scientist, Unit of Carcinogenic Mechanisms and Host Factors, IARC, Lyon, France.
- '88: Research Fellow, Unit of Carcinogenic Mechanisms and Host Factors, IARC, Lyon, France.
- '85-88: Research Fellow, Experimental Oncology Unit, NCI, Genoa, Italy.

Education and training

- '09: Course in Clinical Trial, ISPO, Florence, Italy.
- '09: International Trial on DNA damage, Cancer Research Institute, London, UK.

- '08: Clinical Biochemistry Degree, Thesis.
- '04-08: Specialization in Clinical Biochemistry, School of Pharmacology, University of Camerino, Italy.
- '07: Course on Genetic Epidemiology, IARC, Lyon, France.
- '03: Post-doc training on DNA lesion analysis at base levels of cancer genes, Cancer Center, Duarte, CA.
- '98-99: Course on Genotyping analysis, IARC, Lyon, France.
- '98: International Trial on DNA damage, Cancer Research Institute, London, UK and IARC, Lyon, France.
- '94: Course on Genetic Epidemiology, NCI, Genoa, Italy.
- '86: National certificate to practice Biology, University of Genoa, Italy.
- '85-88: Post-doc training in Experimental Oncology, Experimental Oncology Unit, NCI, Genoa, Italy
- '85: Science Biology Degree, Thesis.
- '80-85: School of Science, University of Genoa, Italy.
- 80: Liceo Classico Giuseppe Mazzini, Diploma.

Affiliations

- 99-2011 American Association of Cancer Research (AACR) and
- 99-2011 AACR Molecular Epidemiology Group.

15. SELF EVALUATION FORM (Principal Investigator)

Total Papers and Reviews with IF (from January 2005 or last available)	26
Total IF (from January 2005 or last available)	98,773
Average IF	4

Total Papers First/Last Author with IF (from January 2005 or last available)	9
Total IF (from January 2005 or last available)	33,032
Average IF	3,7

15.1 LIST OF PAPERS WITH IF (FROM JANUARY 2005) OF THE PRINCIPAL INVESTIGATOR

- 1) Peluso M, Munnia A, Risso GG, Catarzi S, Piro S, Ceppi M, Giese RW, Brancato B. Breast fine-needle aspiration malondialdehyde deoxyguanosine adduct in breast cancer. *Free Radic. Res.* 2011;IF: 2,215.
- 2) Rusconi F, Catelan D, Accetta G, Peluso M, Pistelli R, Barbone F, Di Felice E, Munnia A, Murgia P, Paladini L, Serci A, Biggeri A. Asthma symptoms, lung function, and markers of oxidative stress and inflammation in children exposed to oil refinery pollution. *J Asthma.* 2011; 48 (1): 84-90.IF: 1,372.
- 3) Peluso M, Munnia A, Piro S, Armillis A, Ceppi M, Matullo G, Puntoni R. Smoking, DNA adducts and number of risk DNA repair alleles in lung cancer cases, in subjects with benign lung diseases and in controls. *Journal of Nucleis Acids.* 2010:386798.
- 4) Ricceri F, Godschalk R, Peluso M, Phillips DH, Agudo A, Georgiadis P, Loft S, Tjonneland A, Raaschou-Nielsen O, Palli D, Perera F, Vermeulen R, Taioli E, Sram RJ, Rosa F, Allione A, Matullo G, Vineis P. Bulky DNA adducts in white blood cells: a pooled analysis of 3600 subjects. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention.* 2010; 19(12): 3174-81.IF: 4,31.
- 5) Izzotti A, Pulliero A, Puntoni R, Peluso M, Filiberti R, Munnia A, Assennato G, Ferri G, Merlo DF. Duration of exposure to environmental carcinogens affects DNA adduct level in human lymphocytes. *Biomarkers,* 2010; 15(7): 575-82.IF: 1,608.
- 6) Bono, R, Romanazzi, V, Munnia, A, Piro, S, Allione, A, Ricceri, F, Guarrera, S, Pignata, C, Matullo, G, Wang, P, Giese, R, Peluso, M, Malondialdehyde-deoxyguanosine adduct formation in workers of pathology wards. The role of air formaldehyde exposure. *Chemical Research in Toxicology,* 2010. 16;23:1342-1348.IF: 3,74.
- 7) Ragin C, Minor A, Agudo A, Farmer P, Garte S, Gonzales C, Kalina I, Matullo G, Popov T, Palli D, Peluso M, Ricceri F, Sram R, Vineis P, Taioli E. Pooled analysis of studies on DNA adducts and dietary vitamins. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research,* 2010;705:77-82. IF: 7,097.
- 8) Gungör N, Knaapen AM, Munnia A, Peluso M, M, Haenen GR, Chiu RK,Godschalk RW,van Schooten FJ Genotoxic effects of neutrophils and hypochlorous acid. *Mutagenesis,* 2010, 25:149-154. IF: 3,541.
- 9) Rundle A, Richie J, Steindorf K, Peluso M, Overvad K, Raaschou-Nielsen, O, Clavel-Chapelon F, Linseisen JP, Boeing, H, Trichopoulou A, Palli D, Krogh, V, Tumino R, Panico S, Bueno-De-Mesquita, HB, Peeters PH, Lund E, Gonzalez, CA, Martinez C, Dorronsoro M, Barricarte, A, Tormo MJ, Quiros J, Agudo A, Berglund, G, Jarvholm B, Bingham S, Key, TJ, Gormally E, Saracci R, Kaaks R, Riboli, E, Vineis P. Physical activity and lung cancer among non-smokers: a pilot molecular epidemiological study within EPIC. *Biomarkers,* 2010, 15:20-30. IF: 1,608.
- 10) Peluso M, Srivatanakul P, Munnia, A, Jedpiyawongse A, Ceppi M, Sangrajrang S, Piro S, Boffetta P. Malondialdehyde-Deoxyguanosine Adducts among Workers of a Thai Industrial Estate and Nearby Residents. *Environmental Health Perspective,* 2010, 118:55-59. IF: 6,191.
- 11) Gungor N, Pennings JL, Knaapen AM, Chiu, RK, Peluso M, Godschalk RW, van Schooten FJ. Transcriptional profiling of the acute pulmonary inflammatory response induced by LPS: role of neutrophils. *Respiratory Research,* 2010, 11:24. IF: 3,127.
- 12) Agudo A, Peluso M, Sala N, Capellá, G, Munnia A, Piro S, Marín F, Ibáñez R, Amiano P, Tormo MJ, Ardanaz, E, Barricarte A, Chirlaque MD, Dorronsoro, M, Larrañaga N, Martínez C, Navarro, C, Quirós JR, Sánchez MJ, González CA. Aromatic DNA adducts and polymorphisms in metabolic genes in healthy adults: findings from the EPIC-Spain cohort. *Carcinogenesis,* 2009, 30:968-976. IF: 4,795.
- 13) van Helden YG, Keijer J, Heil SG, Picó C, Palou A, Oliver P, Munnia A, Briedé JJ, Peluso M, Franssen-van Hal NL, van Schooten FJ,Godschalk RW Beta-carotene affects oxidative stress-related DNA damage in lung epithelial cells and in ferret lung. *Carcinogenesis,* 2009 30:2070-2076. IF: 4,795.

- 14) Ibáñez R, Peluso M, Munnia A, Piro S, González CA, Amiano P, Tormo MJ, Ardanaz E, Barricarte A, Berenguer A, Chirlaque MD, Dorronsoro M, Jakszyn P, Larrañaga N, Martínez C, Navarro C, Quirós JR, Sánchez MJ, Agudo A. Aromatic DNA adducts in relation to dietary and other lifestyle factors in Spanish adults. *European Food Research and Technology*. 2009, 229:549-559. IF: 1,37.
- 15) Peluso M, Srivatanakul P, Munnia A, Jedpiyawongse A, Meunier, A, Sangrajrang S, Piro S, Ceppi M, Boffetta P. DNA adduct formation among workers in a Thai industrial estate and nearby residents. *Science of Total Environment*, 2008, 389:283-288. IF: 2,905.
- 16) Lumberras B, Garte S, Overvad K, Tjønneland A, Clavel-Chapelon F, Linseisen JP, Boeing H, Trichopoulou, A, Palli D, Peluso M, Krogh V, Tumino R, Panico S, Bueno-De-Mesquita, HB, Peeters PH, Lund E, Martínez C, Dorronsoro M, Barricarte A, Chirlaque, MD, Quiros JR, Berglund G, Hallmans, G, Day NE, Key TJ, Saracci R, Kaaks, R, Malaveille C, Ferrari P, Boffetta P, Norat, T, Riboli E, Gonzalez CA, Vineis P. Meat intake and bladder cancer in a prospective study: a role for heterocyclic aromatic amines? *Cancer Causes Control*, 2008, 19:649-656. IF: 3,199.
- 17) Palli, D., Saieva, C., Munnia, A., Peluso, M., Grechi, D., Zanna, I., Caini, S., Recarli, A., Sera, F., Masala, M. DNA adducts and PM10 exposure in traffic-exposed workers and urban residents from the EPIC-Florence City study. *Science of Total Environment*, 2008, 15; 403:105-12. IF: 2,905.
- 18) Veglia F, Loft S, Matullo G, Peluso M, Munnia A, Perera F, Phillips DH, Tang D, Autrup H, Raaschou-Nielsen O, Tjønneland A, Vineis P; for the Genair-EPIC investigators. DNA adducts and cancer risk in prospective studies: a pooled analysis and a meta-analysis. *Carcinogenesis*. 2008, 29:932-936. IF: 4,795.
- 19) Peluso M, Airoidi L, Munnia A, Colombi A, Veglia F, Autrup H, Dunning A, Garte S, Gormally E, Malaveille C, Matullo G, Overvad K, Raaschou-Nielsen O, Clavel-Chapelon F, Linseisen J, Boeing H, Trichopoulou A, Palli D, Krogh V, Tumino R, Panico S, Bueno-De-Mesquita BH, Peeters PH, Kumle M, Agudo A, Martínez C, Dorronsoro M, Barricarte A, Tormo MJ, Quiros JR, Berglund G, Jarvholm B, Day NE, Key TJ, Saracci R, Kaaks R, Riboli E, Bingham S, Vineis P. Bulky DNA adducts, 4-aminobiphenyl-haemoglobin adducts and diet in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) prospective study. *British Journal Nutrition*, 2008, 14:1-7. IF: 3,446.
- 20) Munnia, F. Saletta, A. Allione, S. Piro, M. Confortini, G. Matullo, M. Peluso. 32P-DNA postlabelling method improvements for aromatic compound related molecular epidemiology studies. *Mutagenesis*, 2007, 22:381-385. IF: 3,541.
- 21) Manuguerra, M., Matullo, G., Veglia, F., Autrup, H., Dunning, A.M., Garte, S., Gormally, E., Malaveille, C., Guarrera, S., Polidoro, S., Saletta, F., Peluso, M., Airoidi, L., Overvad, K., Raaschou-Nielsen, O., Clavel-Chapelon, F., Linseisen, J., Boeing, H., Trichopoulos, D., Kalandidi, A., Palli, D., Krogh, V., Tumino, R., Panico, S., Bueno-De-Mesquita, H.B., Peeters, P.H., Lund, E., Pera, G., Martínez, C., Amiano, P., Barricarte, A., Tormo, M.J., Quiros, J.R., Berglund, G., Janzon, L., Jarvholm, B., Day, N.E., Allen, N.E., Saracci, R., Kaaks, R., Ferrari, P., Riboli, E., Vineis, P. Multi-factor dimensionality reduction applied to a large prospective investigation on gene-gene and gene-environment interactions. *Carcinogenesis*, 2007, 28:414-422. IF: 4,795.
- 22) Vineis P, Veglia F, Garte S, Malaveille C, Matullo G, Dunning A, M. Peluso, Airoidi L, Overvad K, Raaschou-Nielsen O, Clavel-Chapelon F, Linseisen JP, Kaaks R, Boeing H, Trichopoulou A, Palli D, Crosignani P, Tumino R, Panico S, Bueno-De-Mesquita HB, Peeters PH, Lund E, Gonzalez CA, Martínez C, Dorronsoro M, Barricarte A, Navarro C, Quiros JR, Berglund G, Jarvholm B, Day NE, Key TJ, Saracci R, Riboli E, Autrup H. Genetic susceptibility according to three metabolic pathways in cancers of the lung and bladder and in myeloid leukemias in non-smokers. *Annals on Oncology*, 2007, 18:1230-1242. IF: 5,647.
- 23) Munnia, A., Bonassi, S., Verna, A., Quaglia, R., Pelucco, D., Ceppi, M., Neri, M., Taioli, E., Garte, S., Peluso, M. Bronchial malondialdehyde DNA adducts, tobacco smoking and lung cancer. *Free Radical Biology and Medicine*, 2006, 41:1499-1505. IF: 6,081.

- 24) Talaska G, Al-Zoughool M, Malaveille C, Fiorini L, Schumann B, Vietas J, Peluso M, Munnia A, Bianchini M, Allegro G, Matullo G, Sacerdote C, Vineis P. Randomized controlled trial: effects of diet on DNA damage in heavy smokers. *Mutagenesis*, 21:179-183, 2006. IF: 3,541.
- 25) Gormally E, Vineis P, Matullo G, Veglia F, Caboux E, Le Roux E, Peluso M, Garte S, Guarrera S, Munnia A, Airolidi L, Autrup H, Malaveille C, Dunning A, Overvad K, Tjonneland A, Lund E, Clavel-Chapelon F, Boeing H, Trichopoulou A, Palli D, Krogh V, Tumino R, Panico S, Bueno-de-Mesquita HB, Peeters PH, Pera G, Martinez C, Dorronsoro M, Barricarte A, Navarro C, Quiros JR, Hallmans G, Day NE, Key TJ, Saracci R, Kaaks R, Riboli E, Hainaut P. TP53 and KRAS2 mutations in plasma DNA of healthy subjects and subsequent cancer occurrence: a prospective study. *Cancer Research*, 2006, 66:6871-6876. IF: 7,543.
- 26) Vineis, P., Hoek, G., Krzyzanowski, M., Vigna-Taglianti, F., Veglia, F., Airolidi, L., Autrup, H., Dunning, A., Garte, S., Hainaut, P., Malaveille, C., Matullo, G., Overvad, K., Raaschou-Nielsen, O., Clavel-Chapelon, F., Linseisen, J., Boeing, H., Trichopoulou, A., Palli, D., Peluso, M., Krogh, V., Tumino, R., Panico, S., Bueno-De-Mesquita, H. B., Peeters, P. H., Lund E. E., Gonzalez, C. A., Martinez, C., Dorronsoro, M., Barricarte, A., Cirera, L., Quiros, J. R. Berglund, G., Forsberg, B., Day, N. E., Key, T. J., Saracci, R., Kaaks, R., Riboli, E. Air pollution and risk of lung cancer in a prospective study in Europe. *International Journal of Cancer*, 2006, 119:169-174. IF: 4,722.
- 27) Matullo, G., Dunning, A., Guarrera, S., Baynes, C., Polidoro, S., Garte, S., Autrup, H., Malaveille, C., Peluso, M., Airolidi, L., Veglia, F., Gormally, E., Hoek, G., M. Krzyzanowski, M., Overvad, K., Raaschou-Nielsen, O., Clavel-Chapelon, F., Linseisen, J., Boeing, H., Trichopoulou, A., Palli, D., Krogh, V., Tumino, R., Panico, S., Bueno-De-Mesquita, H.B., Peeters, P.H., Lund, E., Pera, G., Martinez, C., Dorronsoro, M., Barricarte, A., Tormo, M.J., Quiros, J.R., Day, N.E., Key, T.J., Saracci, R., Kaaks, R., Riboli, E., Vineis, P. DNA repair polymorphisms and cancer risk in non smokers in a cohort study. *Carcinogenesis*, 2006, 27:997-1007. IF: 4,795.
- 28) Airolidi L, Vineis P, Colombi A, Olgiati L, Dell'Osta C, Fanelli R, Manzi L, Veglia F, Autrup H, Dunning A, Garte S, Hainaut P, Hoek G, Krzyzanowski M, Malaveille C, Matullo G, Overvad K, Tjonneland A, Clavel-Chapelon F, Linseisen J, Boeing H, Trichopoulou A, Palli D, Peluso M, Krogh V, Tumino R, Panico S, Bueno-De-Mesquita HB, Peeters PH, Lund E, Agudo A, Martinez C, Dorronsoro M, Barricarte A, Chirlaque MD, Quiros JR, Berglund G, Jarvholm B, Hallmans G, Day NE, Allen N, Saracci R, Kaaks R, Riboli E. 4-Aminobiphenyl-hemoglobin adducts and risk of smoking-related disease in never smokers and former smokers in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition prospective study. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 2005, 14:2118-2124. IF: 4,31.
- 29) Peluso, M., Munnia, A., Hoek, G., Krzyzanowski, M., Veglia, F., Airolidi, L., Autrup, H., Dunning, A., Garte, S., Hainaut, P., Malaveille, C., Gormally, E., Matullo, G., Overvad, K., Raaschou-Nielsen, O., Clavel-Chapelon, F., Linseisen, J., Boeing, H., Trichopoulou, A., Trichopoulos, D., Kaladidi, A., Palli, D., Krogh, V., Tumino, R., Panico, S., Bueno-De-Mesquita, H.B., Peeters, P.H., Kumle, M., Gonzalez, C.A., Martinez, C., Dorronsoro, M., Barricarte, A., Tormo, M.J., Quiros, J.R., Berglund, G., Janzon, L., Jarvholm, B., Day, N.E., Key, T.J., Saracci, R., Kaaks, R., Riboli, E., Vineis, P. DNA adducts and lung cancer risk: a prospective study. *Cancer Research*, 2005, 65:1-17. IF: 7,543.
- 30) Peluso, M., Hainaut, P., Airolidi, L., Autrup, H., Dunning, A., Garte, S., Gormally, E., Malaveille, C., Matullo, G., Munnia, A., Riboli, E., Vineis, P., for the EPIC investigators. Methodology of laboratory measurements in prospective studies on gene-environment interactions: the experience of GENAIR. *Mutation Research (Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis)*, 2005, 574:92-104. IF: 3,556.
- 31) Ibáñez, R., Munnia, M., Agudo, A., Berenguer, A., Amiano, P., Tormo, M.J., Barricarte, A., Quiros, J.R., Sánchez, M.J., González, C.A., Peluso, M. Reliability of bulky DNA adducts measurement by the nuclease P1 32P-postlabelling technique. *Biomarkers*, 2005, 10:1-9. IF: 1,608.
- 32) Vineis, P., Airolidi, L., Veglia, F., Olgiati, L., Pastorelli, R., Autrup, H., Dunning, A., Garte, S., Gormally, E., Hainaut, P., Malaveille, C., Matullo, G., Peluso, M., Overvad, K., Tjonneland, A.,

Clavel-Chapelon, F., Boeing, H., Krogh, V., Palli, D., Panico, S., Tumino, R., Bueno-De-Mesquita, H. B., Peeters, P., Berglund, G., Hallmans, G., Saracci, R., Riboli, R. Environmental tobacco smoke and the risk of respiratory cancer and COPD in ex-smokers and never smokers in the EPIC prospective study. *British Medical Journal*, 2005, 330:277-281. IF: 13,66.

15.2 LIST OF PAPERS WITH IF (FROM JANUARY 2005) OF THE SCIENTIFIC COORDINATOR(S) OF
ADDITIONAL RESEARCH UNIT(S)

Prof. A. Galli, University of Florence, Florence

- 1) Ceni E, Mello T, Tarocchi M, Crabb DW, Caldini A, Invernizzi P, Surrenti C, Milani S, Galli A. Antidiabetic thiazolidinediones induce ductal differentiation but not apoptosis in pancreatic cancer cells. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 1122-1130 (IF 2.092)
- 2) Ferruzzi P, Ceni E, Tarocchi M, Grappone C, Milani S, Galli A, Fiorelli G, Mannelli M. Thiazolidinediones inhibit growth and invasiveness of human adrenocortical cancer cell line H295R. *J Clin Endocrinol Metabol* 2005; 90: 1332-1339 (IF 6.202)
- 3) Galli A, Svegliati-Baroni G, Ceni E, Milani S, Ridolfi F, Salzano R, Tarocchi M, Grappone C, Pellegrini G, Benedetti A, Surrenti C, Casini A. Oxidative stress stimulates proliferation and invasiveness of hepatic stellate cells via a MMP2 mediated mechanism. *Hepatology* 2005; 41: 1074-1084. (IF 11.355)
- 4) Capanni M, Surrenti E, Biagini MR, Milani C, Surrenti C, Galli A. Efficacy of peppermint oil in the treatment of irritable bowel syndrome: a randomized, controlled trial. *Arch Sci Med* 2005; 164:119-126 (IF 1.012)
- 5) Bigini MR, Tozzi A, Grippo A, Galli A, Milani S, Amantini A. Muscle fatigue in women with primary biliary cirrhosis: Spectral Analysis of Surface Electromyography. *World J Gastroenterol* 2006; 12 (32): 5186-5190. (IF 2.092)
- 6) Bigini MR, Tozzi A, Marcucci R, Paniccia R, Fedi S, Milani S, Galli A, Ceni E, Capanni M, Manta R, Abbate R, Surrenti C. Hyperhomocysteinemia and hypercoagulability in primary biliary cirrhosis. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 1607-1612 (IF 2.092)
- 7) Ceni E, Crabb DW, Foschi M, Mello T, Tarocchi M, Patussi V, Moraldi L, Moretti R, Milani S, Surrenti C, Galli A. Acetaldehyde Inhibits PPARgamma via H(2)O(2)-Mediated c-Abl Activation in Huma Hepatic Stellate Cells. *Gastroenterology*. 2006 Oct;131(4):1235-52. (IF 12.899)
- 8) Galli A, Mello T, Ceni E, Surrenti E, Surrenti C. The potential of antidiabetic thiazolidinediones for anticancer therapy. *Expert Opin Investig Drugs*. 2006 Sep;15(9):1039-49. (IF 4.218)
- 9) Cellai I, Benvenuti S, Luciani P, Galli A, Ceni E, Simi L, Baglioni S, Muratori M, Ottanelli B, Serio M, Thiele CJ, Peri A. Antineoplastic effects of rosiglitazone and PPARgamma transactivation in neuroblastoma cells. *Br J Cancer*. 2006 Oct 9;95(7):879-88 (IF 4.346)
- 10) Biagini MR, Tozzi A, Milani S, Grippo A, Amantini A, Capanni M, Galli A, Surrenti C. Fatigue in primari biliary cirrhosis: a possibile role of comorbidities. *European J Gastroenterol Hepatol* 2008; 20: 122-126 (IF 1.662)
- 11) Biagini MR, Tozzi A, Bongini E, Capanni M, Galli A, Milani S, Surrenti C. Association of plasma homocysteine with bone mineral density in postmenopausal women with osteoporosis or osteopeniaaffected by primary biliary cirrhosis. *J Clin Gastroenterol* 2007; 41: 635 (IF 2.207)
- 12) Guasti L, Crociani O, Redaelli E, Polvani S, Pillozzi S, Masselli M, Mello T, Galli A, Wymore RS, Wanke E, Arcangeli A. Identification of a post-translational mechanism for the regulation of hERG1 K⁺ channel expression and hERG1 current density in tumor cells. *Mol Cell Biol* 2008; 28: 5043-5060 (IF 6.057)
- 13) Lombardi A, Cantini G, Piscitelli E, Gelmini S, Francalanci M, Mello T, Ceni E, Varano G, Forti G, Rotondi M, Galli A, Serio M, Luconi M. A novel mechanism involving ERK contributes to rosiglitazone inhibition of tumor necrosis factor- α and interferon- γ inflammatory effects in human endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008; 28: 718-724 (IF 7.235)
- 14) Orsini B, Vivas JR, Ottanelli B, Amedei A, Surrenti E, Galli A, Milani S, Pinzani P, Del Prete G, Surrenti C, Baldari CT, D'Elis MM. Human Gastric epithelium produces IL-4 and IL-4 δ 2 isoform only upon *Helicobacter pylori* infection. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2007; 20: 809-818 (IF 2.793)

- 15) Hinz B, Pham SH, Thannickal VJ, Galli A, Bochaton-Piallat, Gabbiani G. The myofibroblast: one function, multiple origins. *Am J Pathol* 2007; 170: 1807-1816 (IF 5.653)
- 16) Mello T, Ceni E, Surrenti C, Galli A. Alcohol induced hepatic fibrosis: role of acetaldehyde. *Mol Aspects Med* 2008; 29: 17-21 (IF 6.492)
- 17) Tozzi A, Biagini MR, Rastellio C, Galli A, Baldi D, Milani S. Mesalazine induced pleuritis in patient with ulcerative colitis. *Inflammatory Bowel Diseases* 2009; 15:158-159 (IF 4.643)
- 18) Pugliese AM, Traini C, Gianfriddo M, Mello T, Galli A, Pedata F. The Adenosine A2 receptor antagonist ZM241385 enhances neuronal survival after oxygen-glucose deprivation in rat CA1 hippocampus slices. *Br J Pharmacol* 2009;157: 818-830 (IF. 5.504)
- 19) Frulloni L, Gabbriellini A, Pezzilli R, Zerbi A, Cavestro GM, Marotta F, Falconi M, Gaia E, Uomo G, Maringhini A, Mutignani M, Maisonneuve P, Di Carlo V, Cavallini G; PanCroInfAISP Study Group. Chronic pancreatitis: report from a multicenter Italian survey (PanCroInfAISP) on 893 patients. *Dig Liver Dis.* 2009 Apr;41(4):311-7. (IF 2.972)
- 20) Invernizzi P, Selmi C, Poli F, Frison S, Floreani A, Alvaro D, Almasio P, Rosina F, Marzioni M, Fabris L, Muratori L, Qi L, Seldin MF, Gershwin ME, Podda M; Italian PBC Genetic Study Group. Human leukocyte antigen polymorphisms in Italian primary biliary cirrhosis: a multicenter study of 664 patients and 1992 healthy controls. *Hepatology.* 2008 Dec;48(6):1906-12 (IF. 11.355)
- 21) Lombardi A, Catini G, Mello T, Francalanci M, Gelmini S, Cosmi L, Santarasci V, Degl'Innocenti S, Luciani P, Deledda C, Annunziato F, Forti G, Galli A, Serio M, Luconi M. Molecular mechanisms underlying the pro-inflammatory synergistic effect of TNF α and IFN γ in human microvascular endothelium. *Eur J Cell Biol* 2009; 88: 731-742 (IF. 3.314)
- 22) Cella I, Petrangolini G, Tortoreto M, Pratesi G, Luciani P, Deledda C, Benvenuti S, Ricordati C, Gelmini S, Ceni E, Galli A, Balzi M, Faraoni P, Serio M, Peri A. In vivo effects of rosiglitazone in a human neuroblastoma xenograft. *Br J Cancer* 2010; 102: 685-692 (IF. 4.346)
- 23) Galli A, Ceni E, Mello T, Polvani S, Tarocchi M, Buccoliero F, Lisi F, Cioni L, Ottanelli B, Foresta V, Mastrobuoni G, Moneti G, Pieraccini G, Surrenti C, Milani S. Thiazolidinediones inhibits hepatic tumor formation in HBV transgenic mice by a PPAR γ independent regulation of nucleophosmin. *Hepatology* 2010; 52; 493-505 (IF. 11.355)
- 24) Cantini G, Lombardi A, Borgogni E, Francalanci M, Ceni E, Degl'Innocenti S, Gelmini S, Poli G, Galli A, Serio M, Forti G, Luconi M. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) is required for modulating endothelial inflammatory response through a nongenomic mechanism. *Eur J Cell Biol* 2010; 89: 645-653 (IF. 3.314)
- 25) Polvani S, Calamante M, Foresta V, Ceni E, Mordini A, Quattrone A, D'Amico M, Luchinat C, Bertini I, Galli A. Acycloguanosyl 5'-thymidyltriphosphate, a new thymidine analogue pro-drug for pancreatic cancer therapy. *Gastroenterology* 2011; 140: 709-720 (IF. 12.899)
- 26) Liu X, Invernizzi P, Lu Y, Kosoy R, Lu Y, Bianchi I, Podda M, Xu C, Xie G, Macciardi F, Selmi C, Lupoli S, Shigeta R, Ransom M, Lleo A, Lee AT, Mason AL, Myers RP, Peltekian KM, Ghent CN, Bernuzzi F, Zuin M, Rosina F, Borghesio E, Floreani A, Lazzari R, Niro G, Andriulli A, Muratori L, Muratori P, Almasio PL, Andreone P, Margotti M, Brunetto M, Coco B, Alvaro D, Bragazzi MC, Marra F, Pisano A, Rigamonti C, Colombo M, Marzioni M, Benedetti A, Fabris L, Strazzabosco M, Portincasa P, Palmieri VO, Tiribelli C, Croce L, Bruno S, Rossi S, Vinci M, Prisco C, Mattalia A, Toniutto P, Picciotto A, Galli A, Ferrari C, Colombo S, Casella G, Morini L, Caporaso N, Colli A, Spinzi G, Montanari R, Gregersen PK, Heathcote EJ, Hirschfield GM, Siminovitch KA, Amos CI, Gershwin ME, Seldin MF. Genome-wide meta-analyses identify three loci associated with primary biliary cirrhosis. *Nat Genet.* 2010 Jul 18. (IF. 27.822)
- 27) Traini C, Pedata F, Cipriani S, Mello T, Galli A, Giovannini MG, Volpini R, Cristalli G, Pugliese AM. P2 receptor antagonists prevent synaptic failure and ERK1/2 activation induced by oxygen and glucose deprivation in rat CA1 hippocampus in vitro. *Biochem Pharmacol* 2011 in press (IF 4.254)

16. FINANCIAL REQUEST

16.1 PRINCIPAL INVESTIGATOR'S UNIT (S)

	Year 1	Year 2	Year 3	Total
A) NON-STAFF PERSONNEL (CONTRACTS, FELLOWSHIPS, ETC). SPECIFY:	9000	38000	29000	76000
B) CONSUMABLES SUPPLIES:	11000	11000	9000	31000
C) SMALL EQUIPMENT(S) SPECIFY:				
D) TRAVEL EXPENSES (MEETINGS, COURSES, ETC.)	1600	2200	2400	6200
E) PUBLICATION COSTS. SPECIFY:		1000	1000	2000
F) OVERHEAD (DI CUI 50% PER L'ENTE RICEVENTE)	2400	5800	4600	12800
TOTAL COSTS	24000	58000	46000	128000
	OK	OK	OK	OK

16.2 JUSTIFICATION OF EACH ITEM BUDGET (except for overhead)

A) NON-STAFF PERSONNEL

A contract of 24 months (18.000 euro/year) for a person dedicated to LMPCR analysis; a contract of 24 months (40.000 euro) for a person dedicated to postlabelling analyses a data input a support to statistical analysis; 2000 per year for BMC biopsy collection

B) CONSUMABLE SUPPLIES

70000 for about 300 32P-postlabelling analysis and for about 1140 LMPCR analysis;

c) Small Equipment(s)

d) Travel Expenses (Meetings, Courses, etc.)

Travel to the Annual Meetings of the American Association for Cancer Research

e) Publication Costs

Colour figure cost

16.3 ADDITIONAL UNIT(S) WITHIN REGIONE TOSCANA

	Year 1	Year 2	Year 3	Total
A) NON-STAFF PERSONNEL (CONTRACTS, FELLOWSHIPS, ETC). SPECIFY:	9000	9000	9000	27000
B) CONSUMABLES SUPPLIES:	8000	8000	8000	24000

C) SMALL EQUIPMENT(S) (MAX 20.000 EUROS). SPECIFY:				
D) TRAVEL EXPENSES (MEETINGS, COURSES, ETC.)	1000	1000	1000	3000
E) PUBLICATION COSTS. SPECIFY:				
F) OVERHEAD.	2000	2000	2000	6000
TOTAL COSTS	20000	20000	20000	60000
	OK	OK	OK	

16.4 ADDITIONAL UNIT(S) - JUSTIFICATION OF EACH ITEM BUDGET (except for overhead)

A) NON-STAFF PERSONNEL

18 month contract for a person dedicated to the experimental in vitro work, i.e. luciferase reporter system, site direct mutagenesis and bacterial work

B) CONSUMABLE SUPPLIES

Luciferase reporter construct, transfection reagents, luminometer optic plates, cell culture, plasmid cloning, site-direct mutagenesis and bacterial work

c) Small Equipment(s)

d) Travel Expenses (Meetings, Courses, etc.)

Participation of National and International Cancer meetings

e) Publication Costs

16.5 TOTAL

TOTAL COSTS	Year 1	Year 2	Year 3	Total
	44000	78000	66000	188000

17. AVAILABLE GRANT(S) CO-FINANCING THE PROPOSAL (Principal Investigator)

Project Title	
Principal Investigator	
Granting Agency	
Amount Granted (Euros)	
Amount Available for Co-Financing (Euros)	

17.1 AVAILABLE GRANT(S) CO-FINANCING THE PROPOSAL (Additional Research Units)

Project Title	
Principal Investigator	
Granting Agency	
Amount Granted (Euros)	
Amount Available for Co-Financing (Euros)	

18. SUGGESTED REVIEWERS (MAX 3).

FIRST AND LAST NAME	ROGER GODSHALK
POSITION	PROF.
INSTITUTION	MAASTRICHT UNIVERSITY
ADDRESS	PO BO 616 6200 MD
CITY	MAASTRICHT, NETHERLAND
PHONE	31433881104
E-MAIL	R.GODSCHALK@GRAT.UNIMAAS.NL

FIRST AND LAST NAME	ROGER GIESE
POSITION	DIRECTOR
INSTITUTION	NORTHEASTERN UNIVERSITY
ADDRESS	122 MIGAR
CITY	BOSTON, MA, USA
PHONE	
E-MAIL	R.GIESE@NEU.EDU

FIRST AND LAST NAME	ANNIE LESZKOWICZ
POSITION	PROF.
INSTITUTION	CNRS
ADDRESS	
CITY	TOULOUSE FRANCE
PHONE	
E-MAIL	ANNIE.LESZKOWICZ@FREE.FR

19. BIO-ETHICAL REQUIREMENTS

Does the proposed research involve:

19.1 HUMAN EXPERIMENTATION

YES XXX

NO

Human experimentation includes involvement of human subjects and other issues with ethical implications.

If YES, include approval from the competent Ethical Committee (as addendum A). If this is not yet available at time of submission, please sign the statement below. ITT will not allocate funds until the Ethical Committee approval has been obtained.

Date 15/03/2011 P.I. Signature M. Peluso

19.2 ANIMAL EXPERIMENTATION

YES

NO XXX

The Committee for animal use in cancer research has evaluated the proposal!

If YES, include approval from the competent Committee (as addendum A). If this is not yet available at time of submission, please sign the statement below. ITT will not allocate funds until the Committee approval has been obtained.

Date 15/03/2011 P.I. Signature M. Peluso

19.3 STATEMENT (fill in only if you have signed YES (n.19.1 and/or 19.2))

I Dr. Marco Peluso..... hereby declare that I will pledge to obtain the approval of the "Ethical Committee" (for Human Experimentation) and /or the approval of the "competent Committee" (for animal experimentation) for the present Proposal (title) Targeting oxidative DNA damage at genomic and sequence level in a breast cancer case-control study before commencing research.

Date 13/03/2011 P.I. Signature M. Peluso

20. DECLARATION AND PRIVACY STATEMENT

I hereby certify that all information submitted in the application form is accurate and complete. I agree that, in accordance with law 196/2003, the processing of my personal data shall be performed for the following purposes:

1. administrative management of the dossiers;
2. evaluation of the value of the research projects with transmission of the data to the Italian and non-Italian referees/evaluators;
3. activities ancillary and/or pursuant to the above;

The communication of personal data for these purposes is not compulsory although refusal to do so, owing to the peculiarity of the relationship between the data and the aim for which it is requested, will render the candidate ineligible for selection/award.

Date 13/03/2011 P.I. Signature M. Peluso

Allegato "A"

16.1 PRINCIPAL INVESTIGATOR'S UNIT (S)

	Year 1	Year 2	Year 3	Total
A) NON-STAFF PERSONNEL (CONTRACTS, FELLOWSHIPS, ETC). SPECIFY:	14.250	19.000	14.250	47.500
B) CONSUMABLES SUPPLIES:	19.363	15.003	17.613	51.979
C) SMALL EQUIPMENT(S) SPECIFY:				
D) TRAVEL EXPENSES (MEETINGS, COURSES, ETC.)	2.750	2.360	4.500	9.610
E) PUBLICATION COSTS. SPECIFY:				
F) OVERHEAD	3.637	3.637	3.637	10.911
TOTAL COSTS	40.000	40.000	40.000	120.000

16.2 JUSTIFICATION OF EACH ITEM BUDGET (except for overhead)

A) NON-STAFF PERSONNEL

A contract for a person dedicated to laboratory analyses: 9 months for the first year, 12 months for the second year and 9 months for the last year

B) CONSUMABLE SUPPLIES

Laboratory analyses

c) Small Equipment(s)

d) Travel Expenses (Meetings, Courses, etc.)

Participation to International and National Cancer meetings

e) Publication Costs



ISTITUTO PER LO STUDIO
E LA PREVENZIONE ONCOLOGICA



Al Direttore Generale ISPO

Firenze, 9/5/13

Oggetto: Relazione progettuale del progetto "Targeting oxidative DNA damage at genomic and sequence level in a breast cancer case-control study and in vitro experiments".

Descrizione Progetto

Il cancro al seno è una delle principali cause di morte per cancro nelle donne nei paesi occidentali. Un'eccessiva generazione di radicali liberi sembra essere coinvolta nello sviluppo e nella progressione di questo tumore. I radicali liberi sono sostanze altamente reattive che possono indurre diverse lesioni ossidative, come 7,8-dihydrox-8-oxoguanine, 5-idrossi-citosina, 8-oxoadenine, 5,6-diidrossi-5,6-dihydrothymidine e malondialdeide-dG. Queste alterazioni ossidative sono importanti nel processo di cancerogenesi perché, se non vengono riparate, possono indurre mutazioni e aberrazioni epigenetiche. Infatti, i livelli di 8-oxodG sono stati associati con un maggior rischio di cancro al seno e con un'ipermetilazione delle isole CpG contenute nella regione promotore di gene specifica.

Nella presente indagine, studieremo il ruolo di alterazioni ossidative situate nella sequenza codificante (esoni) ed in regioni promotore di geni rilevanti per il cancro al seno in donne che si stanno sottoponendo ad accertamenti diagnostici di routine per sospetta neoplasia mammaria. Il nostro approccio sperimentale consisterà in uno studio osservazionale del tipo caso-controllo, dove verrà confrontata la prevalenza di alterazioni ossidative nel DNA genomico ed anche in esoni ed in regioni promotore di geni rilevanti per il cancro in donne affette da cancro al seno rispetto a donne con lesioni benigne della mammella. Le analisi verranno effettuate in parte del materiale prelevato via ago-guidata a fini diagnostici per sospetta lesione maligna. I livelli di alterazioni ossidative saranno associati con marcatori di progressione tumorale.

Per effettuare le analisi di cui sopra verrà richiesto, dopo aver richiesto ed ottenuto il consenso informato, avendo già ricevuto il parere favorevole del Comitato Etico di Careggi, alle donne che si stanno sottoponendo presso l'ISPO ad accertamenti diagnostici di routine per sospetta neoplasia mammaria a partecipare allo studio e ad acconsentire ad fare utilizzare parte del materiale prelevato via ago-guidata per eseguire esami istologici di routine anche per misurare alterazioni ossidative nel DNA genomico, in oncogeni e geni oncosoppressori.

Inizialmente, verrà analizzato un pannello di alterazioni ossidative in esoni di geni rilevanti per il cancro in esperimenti in vitro. Questa parte dello studio prevederà l'identificazione di sequenze di oncogeni e di geni oncosoppressori che vengono modificate dai radicali liberi. I livelli di alterazioni ossidative a livello oncogenomico verranno studiati mediante la tecnica innovativa della Ligation Mediated (LM)-PCR. La tecnica della Ligation Mediated (LM)-PCR è un metodo che permette l'analisi di alterazioni ossidative a livello nucleotidico. Quest'approccio verrà prima utilizzato per lo studio della TP53 e poi per lo studio di altri geni. I risultati ottenuti dagli esperimenti in vitro (Validation Study) verranno quindi traslati nello studio caso-controllo, dove saranno misurati i livelli di alterazioni ossidative in oncogeni ed in geni oncosoppressori di donne affette da cancro al seno rispetto a donne controllo.

Nel corso del progetto, verranno anche esaminati i livelli di alterazioni ossidative nella regione promotore di geni correlati con il cancro al seno mediante esperimenti in vitro. In un secondo tempo, anche questi risultati verranno traslati nello studio caso-controllo per analizzare l'associazione tra alterazioni ossidative nella regione promotore di geni rilevanti per il cancro ed il rischio di cancro al seno.

Infine, studieremo l'influenza di antiossidanti sulle alterazioni ossidative indotte da radicali liberi in esperimenti in vitro per vedere se tali modificazioni siano influenzabili da antiossidanti.

Obiettivi

Il presente studio permetterà di identificare un pannello di alterazioni ossidative situate in esoni ed in regioni promotore di geni rilevanti per il cancro associate con lo sviluppo e la progressione del cancro al seno.

Piano economico finanziario

Per Personale:

Primo anno: € 14.250,00 per un contratto di 9 mesi per un biologo/biotecnologo o equivalente; Secondo anno: €19.000,00 per un contratto di 12 mesi per un biologo/biotecnologo o equivalente; Terzo anno: €14.250,00 per un contratto di 9 mesi per un biologo/biotecnologo o equivalente.

In questo periodo, sotto la supervisione del Responsabile Scientifico del Progetto di Ricerca ITT, il collaboratore biologo/biotecnologo o equivalente 1) sarà di supporto alle analisi di danno ossidativo mediante cromatografia a scambio ionico, mediante tecniche di PCR, mediante la tecnica della "Ligation Mediated PCR", e/o mediante specifici kits di analisi di danno genetico o collegato, e/o mediante

qualsiasi altra tecnologia potrebbe essere necessaria per l'avanzamento e l'approfondimento dei temi progettuali del Progetto di Ricerca ITT, incluso Test di Mutazione Cito-specifica, Tecnica di Transfezione di Plasmidi con Vettore contenente Regione Promotore di gene d'interesse e parte del gene Luciferase, 2) sarà di supporto in trattamento cellulari con Xantina e Xantina Ossidasi o H₂O₂, in trattamento cellulari con X/XO insieme ad antiossidanti, nell'analisi di espressione genica, 3) prenderà parte all'estrazione ed alla purificazione dei campioni biologici, 4) prenderà parte allo studio caso-controllo sul tumore al seno, es. parteciperà alla somministrazione dei questionari a volontari dello studio e all'input dei dati in formato excel in sistemi informatici, 5) prenderà parte a ricerche bibliografiche mediante PubMed e altri motori di ricerca scientifica, 6) prenderà parte alla analisi di sequenza (lower- and upper-strand) di oncogeni, geni soppressori del tumore e geni di interesse specifico su NCBI con particolare attenzione agli esoni ed alla zona promotore con identificazione ad hoc di primers specifici mediante Blast (NCBI), 7) prenderà parte alla stesura di reports (es. Tabelle con referenze bibliografiche), anche riguardati la frequenza di mutazioni utilizzando Cosmic e lo IARC/data set (cataloghi di mutazioni somatiche) od altro sistema necessario, 8) prenderà parte alla preparazione degli ordini di materiale di laboratorio e alla manutenzione periodica, 9) prenderà parte a tutte quelle attività che siano necessarie per l'esecuzione e l'avanzamento del progetto, descritte in dettaglio nel progetto ITT del Dr. Marco Peluso in copia alla Direzione Scientifica. Se necessario per l'esecuzione e l'avanzamento del progetto potranno essere richiesto l'acquisto di piccole strumentazioni.

Per Beni di consumo

Primo anno: €19.363,00; Secondo anno: € 15.003,00; Terzo anno: € 17.613,00 per acquisto di materiale vario, es. per analisi mediante la tecnica della Ligation Mediated (LM)-PCR; per analisi cromatografiche mediante la tecnica del 32P-postalbeiling; per analisi di danno mediante kit specifici; per analisi di espressione; per analisi del costruito gene specifico-reporter Luciferasi, per transfezioni, per test di luminometria; per colture cellulari; per plasmidi; per analisi di mutagenesi sito specifiche; per lavoro con batteri; per analisi con antiossidanti vari; per test reporter in cotrasfezione con SIRT1 o altri fattori di trascrizione; per esperimenti di RNAi per silenziamento methiltransferasi; per esperimenti di epigenetica; per esperimenti con CHIP per validare binding con fattori di trascrizione; per analisi di mutazioni; per estrazione e purificazione DNA; per pipette di varia calibratura; per schermi; per Software di analisi (es. Image Quant); se necessario piccole strumentazioni.

Le seguenti apparecchiature presenti nella U.O. di Citologia Analitica e Biomolecole verranno utilizzate per gli esami inerenti il Progetto di Ricerca ITT: cappa-chimica, centrifughe da banco, bilancia analitica e bilancia di precisione, frigoriferi sotto banco, congelatori a -80°C (piano -1), spettrofotometro, evaporatore rotativo, termociclatori vari (siamo in attesa di un termociclatore in sostituzione di uno che era in dotazione del servizio, ma che si è rotto), apparecchiature per gel di agarosio, apparecchiature per gel di acrilamide, sistema LICOR, sistema millipore per ultrapurificazione H₂O, vasche cromatografiche, sistema typhoon, computers vari per lettura di gels e di cromatogrammi, softwars vari per analizzare gels e cromatogrammi, ed apparecchiature varie in dotazione presso il laboratorio del Prof. Andrea Galli, Università di Firenze, Azienda Careggi.

Per Spese di viaggio (meetings, corsi, conferenze):

Primo anno: € 2.750,00 per partecipazioni a conferenze nazionali ed internazionali; Secondo anno: € 2.360,00 per partecipazioni a conferenze nazionali ed internazionali; Terzo anno: € 4.500,00 per partecipazioni a conferenze nazionali ed internazionali riguardanti tematiche di epidemiologia e biologia molecolare e di epidemiologia del cancro attinenti il progetto e riguardanti danno genetico, mutazioni, espressione genica, epigenetica e tumore al seno, come le Conferenze dell'Associazione Americana per la Ricerca sul Cancro, e le Conferenze della Environmental Mutagenesis and Genomics Society, le Conferenze ECNIS, le Conferenze EMBO, per presentazioni dati, per aggiornamento scientifico e per riunioni di lavoro.

Per Oveheads

Primo anno: € 3.637; Secondo anno: € 3.637; Terzo anno: € 3.637.

Cordiali saluti

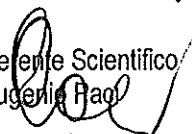
Il Responsabile del Progetto

Dr. Marco Peluso



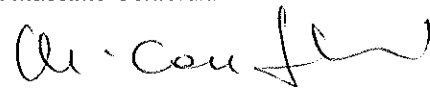
Visto
Il Referente Scientifico

Dr. Eugenia Rao



Responsabile SC Citopatologia, Citologia Analitica
e Biomolecolare

Dr. Massimo Confortini





ISTITUTO PER LO STUDIO
E LA PREVENZIONE ONCOLOGICA



**PIANO ECONOMICO-FINANZIARIO
PROGETTI FINALIZZATI**

Struttura organizzativa proponente: S.C. Citopatologia, Citologia Analitica e Biomolecolare

Responsabile del progetto: Dr. Marco Peluso

Titolo del progetto: Targeting oxidative DNA damage at genomic and sequence level in a breast cancer case-control study and in vitro experiments*

Ente finanziatore: ITT - Regione Toscana

Importo finanziamento: € 120.000,00

Delibera numero:

Codice Autorizzazione: 85/13

Centro di Costo: 698

Data inizio progetto: comunicazione avvio progetto

Data conclusione progetto: tre anni dalla data di comunicazione avvio progetto

Modalità di pagamento: € 40.000,00 dopo comunicazione avvio progetto; € 40.000,00 alla fine del primo anno; € 28.000,00 alla fine del secondo anno; € 12.000,00 alla scadenza del progetto.

	2013/14	2014/2015	2015/2016	Totale	VOCE DI SPESA CORRISPONDENTE EROGATORE ENTE
Beni di consumo:	19.363,00	15.003,00	17.613,00	51.979,00	Consumables supplies
- cancelleria ed altri beni economici (es. stampati, mouse, ...)					
- farmaci					
- presidi (es. guanti, sonde, ...)					
- diagnostici (es. reagenti di laboratorio, test HPV, ...)	19.363,00	15.003,00	17.613,00	51.979,00	
- acquisto libri e riviste (anche su supporto informatico; riviste on line)					
- altro (specificare)					
Beni di tipo strumentale:					
- attrezzature sanitarie					
- attrezzature informatiche e altro non sanitario (es. computer, stampanti, ... importi > 516,00 euro; per importi < 516,00 euro riferirsi a beni di consumo)					
Beni Immateriali:					
- software, opere di ingegno, brevetti					
Servizi:					
- Acquisto prestazioni sanitarie (es. prestazioni di laboratorio)					
- Acquisto prestazioni non sanitarie (es. servizio elabor.dati)					
- Spese per pubblicazioni					
- Spese per organizzazione convegni e congressi (es. cene, coffee break, ...)					
- Spese postali					
- Spese telefoniche					
Trasferimenti/ finanziamenti ad altri enti					
Personale	14.250,00	19.000,00	14.250,00	47.500,00	Non-staff personnel
- collaborazioni, consulenze ed incarichi professionali					
- personale dipendente, tempo determinato					
- personale dipendente, tempo indeterminato					
Rimborsi	2.750,00	2.360,00	4.500,00	9.610,00	Travel expenses
- missioni/rimborsi spese collaborazioni, consulenze ed incarichi professionali					
- missioni/rimborsi spese dipendenti, tempo determinato					
- missioni/rimborso spese tempo indeterminato (incluso PI)					
Altro (specificare)					
Progetti del personale					
Spese generali di gestione (overheads)	3.637,00	3.637,00	3.637,00	10.911,00	Overhead
Totale	40.000,00	40.000,00	40.000,00	120.000,00	

Firma Responsabile del progetto

Firma Resp. Struttura Org.

data: 5/5/13