



SAPIENZA
UNIVERSITÀ DI ROMA

**Dipartimento di Medicina Sperimentale
Sezione di Fisiopatologia Medica ed Endocrinologia**

**Aspetti genetici del Diabete di tipo 2:
ruolo della vitamina D e della sua
regolazione genica**

24 Settembre 2016

Roma, Villa Malta

Laura Bertocchini

UN PO' DI STORIA DELLA GENETICA DEL DIABETE...

Il Diabete di tipo 2 (DT2) è stato indicato come “*geneticist’s nightmare*”
(Neel J.V.,1976)

Numerosi studi hanno evidenziato la **natura poligenica e multifattoriale del DT2**, dimostrando la presenza di molti geni implicati nel diabete.

Il DT2 rappresenta il 90% dei casi di diabete e, benchè sia oggetto di studio da molti anni, i meccanismi genetici alla base sono complessi e ancora poco chiari.



Negli anni '80 un gruppo di studio aveva suggerito che il DT2 fosse una **malattia autosomica dominante**, causata da un singolo gene a penetranza variabile e legata alla presenza di obesità e dell'età avanzata.
(Zimmet, 1982)

Gli studi di associazione sull'intero genoma (GWAS), che hanno portato a progressi rivoluzionari nello studio del DT2, **hanno confermato pienamente la natura poligenica del diabete.**










EVOLUZIONE DEGLI STUDI DI GWAS

- Identificazione di **oltre 10 nuovi geni** associati al DT2 in individui Europei
(Saxena, 2007; Qi, 2010; Scott, 2007; Zeggini, 2007)
- Identificazione di altri **5 geni di rischio per il DT2**
(Bouatia-Naji , 2009; Dupuis, 2010; Prokopenko, 2009, Saxena, 2007)
- Nel 2010 una meta analisi che coinvolgeva più di 50.000 partecipanti ha portato alla scoperta di altri **12 geni di suscettibilità per il DT2** nei soggetti europei
(Voight et al., 2010)
- Studi di GWAS e meta analisi in altri gruppi etnici...
(Cho , 2012; Hanson, 2014; Kooner, 2011; Li, 2013; Ma, 2013; Palmer, 2012; Saxena, 2013; Shu, 2010; Tabassum, 2013; Tsai, 2010; Unoki, 2008; Yamauchi, 2010; Yasuda, 2008)



Insulin secretion / beta cell or islet function				Unknown				Insulin resistance			
<i>HNF4A</i>	CE	<i>KCNQ1</i>	EA	<i>ADAMTS9</i>	CE	<i>RND/RBM43</i>	AA	<i>ANK1</i>	CE	<i>IRS1</i>	CE
<i>TCF7L2</i>	CE	<i>MAEA</i>	EA	<i>AP3S2</i>	SA	<i>SGCG</i>	SA	<i>BCAR1</i>	CE	<i>PPARG</i>	CE
<i>GCK</i>	CE	<i>PAX4</i>	EA	<i>CHCHD2P9</i>	CE	<i>SPRY2</i>	EA	<i>CCND2</i>	CE	<i>FTO</i>	CE
<i>HNF1B</i>	CE	<i>SLC30A8</i>	CE	<i>DNER</i>	SA	<i>SRR</i>	EA	<i>CILP2</i>	CE	<i>GRB14</i>	SA
<i>KCNJ11</i>	CE	<i>THADA</i>	CE	<i>FITM2/R3HDML</i>	EA	<i>ST6GAL1</i>	SA	<i>KLHDC5</i>	CE	<i>HMGA2</i>	CE
<i>WFS1</i>	CE	<i>UBE2E2</i>	EA	<i>GCC1</i>	EA	<i>TLE4</i>	CE	<i>TLE1</i>	CE	<i>KLF14</i>	CE
<i>ARAP1</i>	CE	<i>VPS26A</i>	SA	<i>GRK5</i>	EA	<i>TMEM163</i>	SA	<i>ZMIZ1</i>	CE	<i>PEPD</i>	EA
<i>BCL11A</i>	CE	<i>ZBED3</i>	CE	<i>HMG20A</i>	SA	<i>TP53INP1</i>	CE	<i>COBL1</i>	CE	<i>RBMS1</i>	CE
<i>C2CD4A / C2CD4B</i>	EA	<i>ZFAND3</i>	EA	<i>JAZF1</i>	CE	<i>TSPAN8 / LGR5</i>	CE	<i>MACF1</i>	CE	<i>ARL15</i>	TA
<i>CDC123 / CAMK1D</i>	CE	<i>GPSM1</i>	EA	<i>KCNK16</i>	EA	<i>ZFAND6</i>	CE			<i>LEP</i>	EA
<i>CDKAL1</i>	CE	<i>LPP</i>	TA	<i>LAMA1</i>	CE	<i>FAF1</i>	TA			<i>SLC16A11</i>	M
<i>CDKN2A/B</i>	CE	<i>SSR1 / RREB1</i>	TA	<i>MOB2</i>	CE	<i>HLA-B</i>	AA			<i>GCKR</i>	CE
<i>DUSP9</i>	CE	<i>ADCY5</i>	CE	<i>NOTCH2</i>	CE	<i>IGF2</i>	AA			<i>ANKRD55</i>	CE
<i>GLIS3</i>	EA	<i>DGKB</i>	CE	<i>PRC1</i>	CE	<i>MPHOSPH9</i>	TA			<i>MC4R</i>	CE
<i>HHEX / IDE</i>	CE	<i>MTNR1B</i>	CE	<i>PSMD6</i>	EA	<i>POU5F1 / TCF19</i>	TA			<i>TBC1D4</i>	G
<i>HNF1A</i>	CE	<i>PROX1</i>	CE	<i>PTPRD</i>	EA	<i>SLC16A13</i>	EA				
<i>IGF2BP2</i>	CE	<i>GIPR</i>	CE	<i>RASGRP1</i>	EA	<i>TMEM154</i>	TA				

T2D susceptibility genes primarily found through:

-  Linkage studies
-  Candidate genes studies
-  GWAS and GWAS meta-analyses
-  GWAS and GWAS meta-analyses of both imputed and genotyped SNPs
-  GWAS and GWAS meta-analyses for T2D-related quantitative traits
-  GWAS based on Metabochip custom beadchips
-  WES



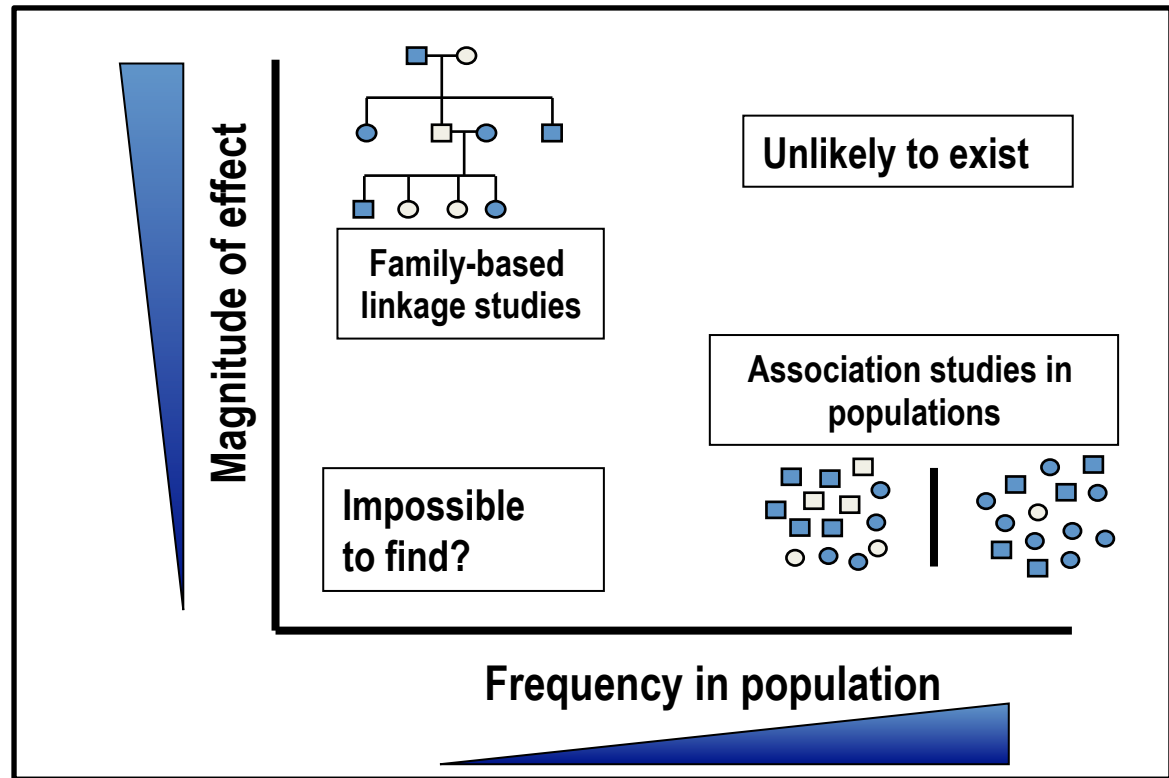


Si tratta di una malattia complessa **poligenica e multifattoriale determinata dalla combinazione di più fattori genetici predisponenti e di fattori ambientali che interagiscono tra di loro** causando alterazione della secrezione insulinica beta-cellulare e resistenza insulinica nei tessuti periferici.

Nessun gene ha un ruolo così forte da essere in grado di causare da solo il DT2.



Le varianti genetiche identificate mediante studi di GWAS spiegano una piccola percentuale (10%) dell'ereditabilità del DT2. Gran parte della speculazione sulla **“Missing Heritability”** è focalizzata sul possibile contributo delle varianti a bassa frequenza ($0.5\% < \text{MAF} < 5\%$) e delle varianti rare ($\text{MAF} < 0,5\%$).



Quando MAF scende al di sotto dello 0,5%, l'individuazione di associazioni diventa molto improbabile eccetto che nei casi di dimensioni dell'effetto molto grandi, come nelle condizioni monogeniche.





VITAMINA D e DT2

L'ipovitaminosi D, si associa ad una **aumentata prevalenza ed incidenza di sindrome metabolica e di Diabete di Tipo 2 (DT2)**.

(Palomer X et al. "Role of vitamin D in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus." Diabetes Obes Metab 2008;

Lui E. et al. "Predicted 25-hydroxyvitamin D score and incident type 2 diabetes in the Framingham Offspring Study". Am J Clin Nutr 2010)

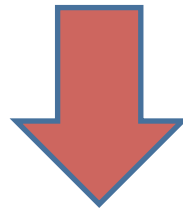
Inoltre, sia mediante studi trasversali che caso-controllo nella popolazione generale, è stata dimostrata una **forte associazione tra bassi livelli di vitamina D e aumento del rischio cardiovascolare**.

(Holick MF, 2007; Mattila C, 2007; Melamed ML, 2008; Michos ED, 2008)

Nonostante ciò, il rapporto tra livelli di vitamina D ed eventi cardiovascolari nei pazienti con DT2 è inesplorato, dal momento che tutti gli studi sono stati condotti nella popolazione generale.



Il mio studio si è svolto nell'ambito del progetto
SUMMER (Sapienza University Mortality and Morbidity Event Rate)
nel diabete



studio prospettico osservazionale multicentrico di 5 anni che ha lo scopo di identificare nuove molecole in grado di predire il rischio cardiovascolare nei pazienti affetti da DT2 e di contribuire a definirne i meccanismi
(previsione reclutamento 5000 soggetti)

- Obiettivo primario: valutazione mortalità generale
- Obiettivo secondario: valutazione della mortalità cardio-vascolare con particolare riferimento all'incidenza di infarto del miocardio, ictus cerebrale e insufficienza renale terminale



Metodi

Per lo studio Summer sono stati reclutati fino ad ora oltre 3300 pazienti con DT2.

Di ogni paziente sono stati registrati gli indici antropometrici e lo stile di vita mediante questionari validati, è stata raccolta la storia personale e familiare, sono stati effettuati prelievi di sangue per valutare i principali esami ematochimici.

I dati che presento oggi rappresentano i risultati ottenuti da 1230 aliquote di DNA genomico sui quali abbiamo effettuato la genotipizzazione per i 4 polimorfismi selezionati e il dosaggio dei livelli sierici di vitamina D.

La genotipizzazione degli SNPs è stata eseguita utilizzando i saggi TaqMan (Applied Biosystems) in un volume totale di 12 μ l utilizzando lo strumento Eco™ Real-Time PCR System dell'Illumina.



Al fine di individuare un nesso causale, l'approccio di

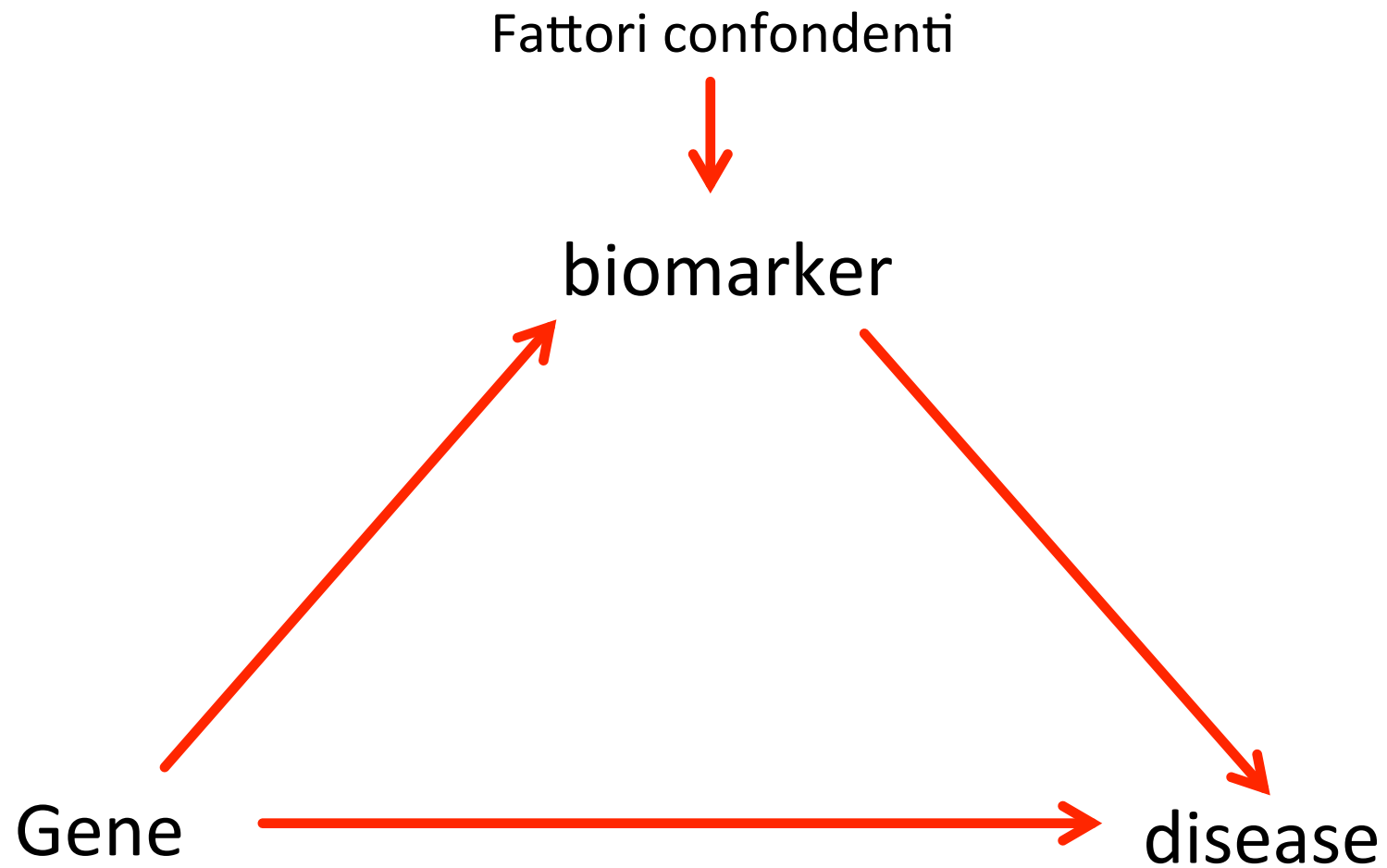
" Randomizzazione mendeliana "

permette di capire i meccanismi che causano la malattia.

Ovvero, se un *polimorfismo genetico (SNP)* che è associato con un *biomarcatore (livelli di vitamina D)*, è anche associato con la *morte cardiovascolare e/o da tutte le cause*, allora l'evidenza è in favore di una relazione causale tra *il biomarcatore (livelli di vitamina D geneticamente determinati)* e il rischio di *mortalità e morbilità cardiovascolare in tali pazienti*

(Thanassoulis G, 2013).





Associazione tra polimorfismi in geni coinvolti nel metabolismo della vitamina D e DT2 e complicanze ad esso correlate.

In tutti i soggetti sono stati analizzati SNPs nei geni **GC** (noto anche come vitamin D binding protein, DBP), **CYP2R1** (25-hydroxylase), **VDR** (Vitamin D Receptor), e **DHCR7** (encoding 7-dehydrocholesterol reductase), che sono stati trovati associati con livelli di vitamina D in studi di GWAS e studi di associazione genetica.

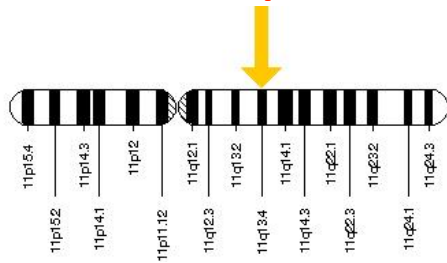


CARATTERISTICHE DELLA POPOLAZIONE

	N. 1239
Sesso (M/F)	740/499
Età (anni)	66.7 ± 10
Peso (kg)	83.3 ± 17.6
BMI (kg/m ²)	30.1 ± 5.6
HbA1c (%)	7.3 ± 1.5
T2D (anni)	11.7 ± 9.1
COL TOT (mg/dL)	172.6 ± 38.6
HDL (mg/dL)	46.3 ± 12.7
LDL (mg/dL)	97.4 ± 32.8
TG (mg/dL)	147.1 ± 106
PAS (mmHg)	135.9 ± 15.2
PAD (mmHg)	79.3 ± 8.7
Vitamina D (ng/ml)	24.5 ± 10

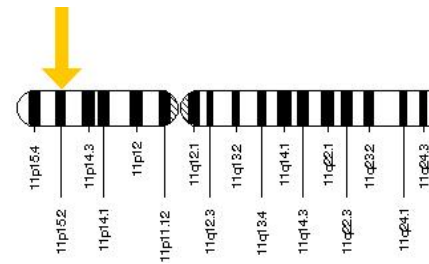


DHCR7 : 11q13.4



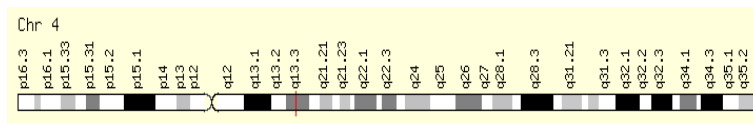
The *DHCR7* gene provides instructions for making an enzyme called 7-dehydrocholesterol reductase. Specifically, 7-dehydrocholesterol reductase converts a molecule called 7-dehydrocholesterol to cholesterol.

CYP2R1: 11p15.2



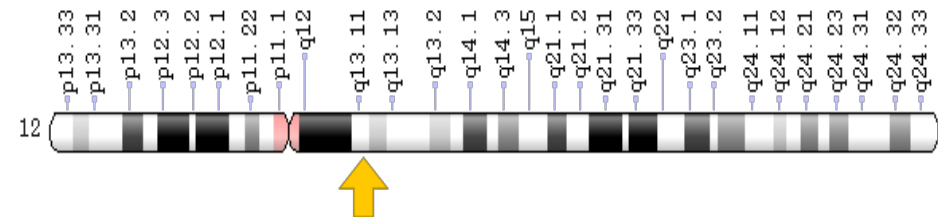
This gene encodes a member of the cytochrome P450 superfamily of enzymes. This enzyme is a microsomal vitamin D hydroxylase that converts vitamin D into the active ligand for the vitamin D receptor.

GC: 4q12.13



The protein encoded by this gene belongs to the albumin gene family. It binds to vitamin D and its plasma metabolites and transports them to target tissues.

VDR: 12q13.11



The *VDR* gene provides instructions for making a protein called vitamin D receptor (VDR), which allows the body to respond appropriately to vitamin D. VDR attaches (binds) to the active form of vitamin D, known

DHCR7 rs12785878 T>G

Nei soggetti affetti da DT2 l'allele G ha una frequenza del 30%, uguale a quella riscontrata nei soggetti non diabetici

La presenza del genotipo omozigote (GG) si associa a livelli di vitamina D inferiori e ad una più giovane età rispetto ai soggetti con genotipo TT e GT

	Genotype			p-values
	TT (n = 616)	GT (n = 499)	GG (n = 127)	
Vitamina D (ng/ml)	25.6 ± 11	24.7 ± 11	22 ± 10.8	0.008
Età (anni)	67.7 ± 9.6	66.1 ± 10.3	64.5 ± 11.2	0.004



DHCR7 rs12785878 T>G

All'analisi di regressione lineare multivariata abbiamo osservato che **il polimorfismo rs12785878 associa con più bassi livelli di Vitamina D indipendentemente dall'emoglobina glicata, dall'età e dal sesso.**

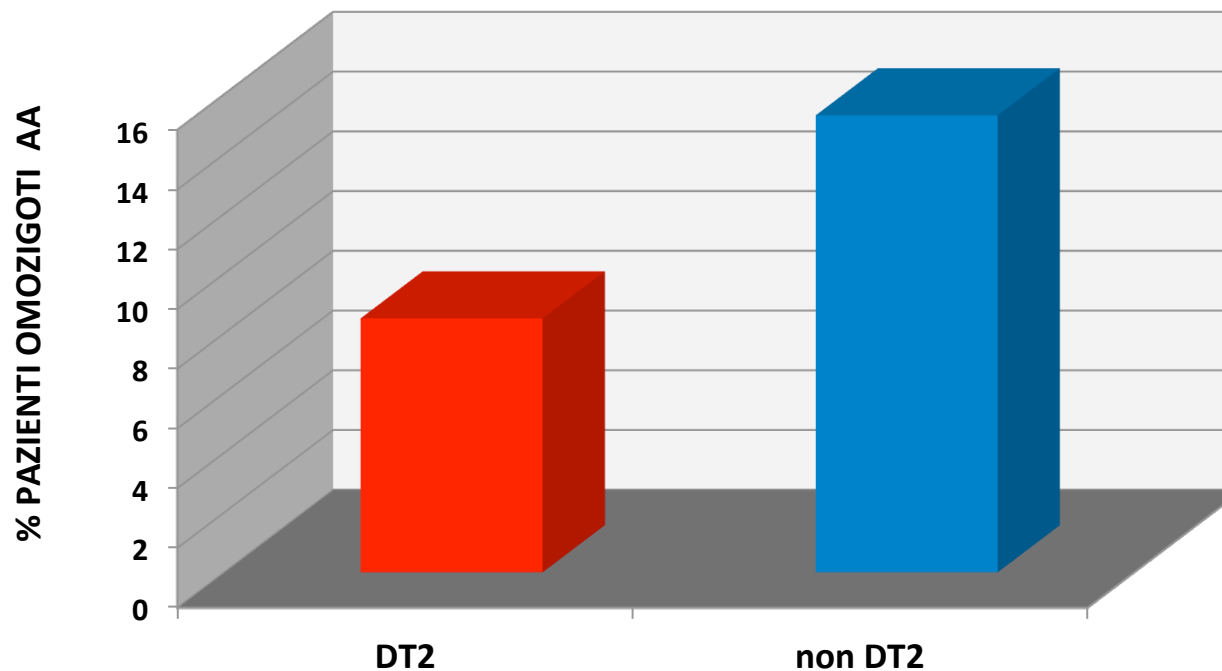
	Coefficiente di regressione standard	t-value	p-value
Età	0.003	0.089	0.929
Sesso	0.035	1.093	0.275
HbA1c	-0.177	-5.477	<0.001
rs12785878	-0.080	-2.471	0.014



CYP2R1 rs10741657 G>A

Nei soggetti affetti da DT2 l'allele A ha una frequenza del 29%, mentre nei soggetti non diabetici è significativamente maggiore (38%, $p < 0.001$)

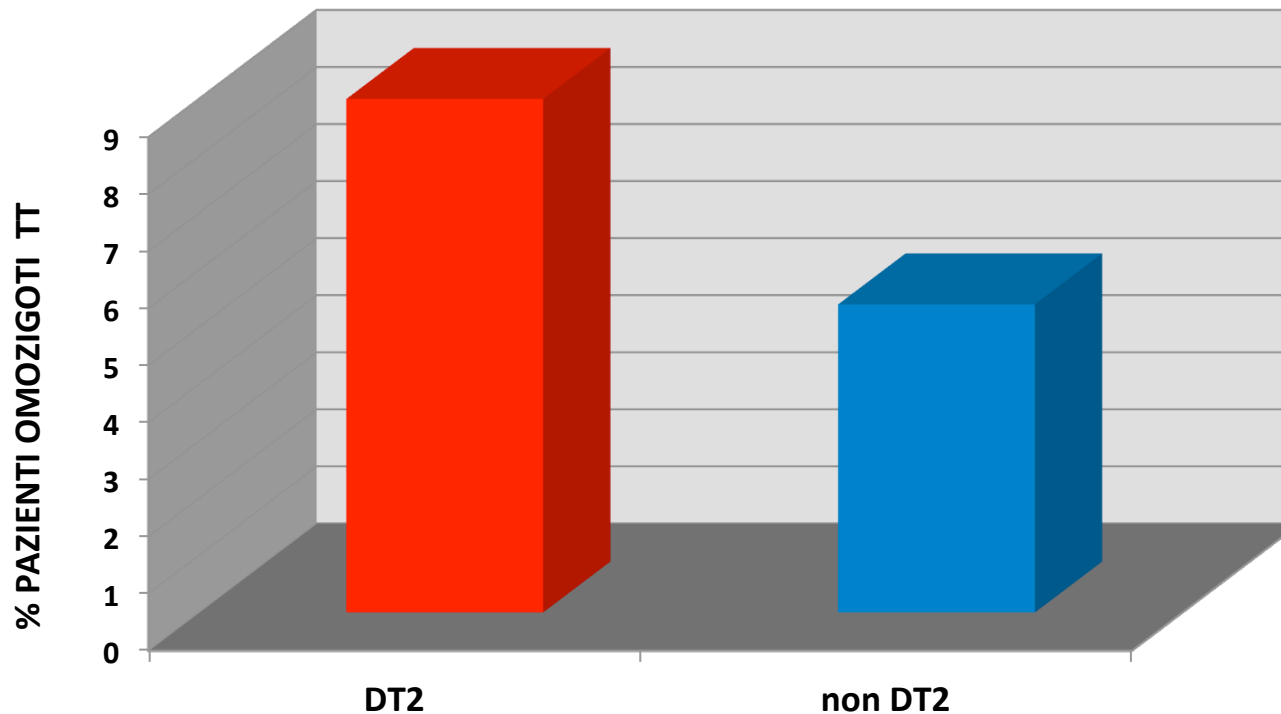
Nei pazienti affetti da DT2 la prevalenza del genotipo omozigote (AA) è significativamente minore rispetto ai soggetti non diabetici (8.5% vs 15.3%, $p < 0.001$)



GC rs4588 G>T

Nei soggetti affetti da DT2 l'allele T ha una frequenza del 28%, mentre nei soggetti non diabetici è minore (24.8%, $p = 0.057$)

Nei pazienti affetti da DT2 la prevalenza del genotipo omozigote (TT) è significativamente maggiore rispetto ai soggetti non diabetici (9% vs 5.4%, $p = 0.043$)



GC rs4588 G>T

I soggetti con **genotipo omozigote TT** presentano **livelli di vitamina D significativamente inferiori** rispetto ai soggetti GG e GT

	Genotipo			P-value
	GG (n = 641)	GT (n = 477)	TT (n = 104)	
Vitamina D (ng/ml)	25.9 ±12	23.6 ± 9.6	22 ± 9.6	< 0.001



GC rs4588 G>T

All'analisi di regressione lineare multivariata abbiamo osservato che **il polimorfismo rs4588 si associa con più bassi livelli di Vitamina D** indipendentemente dall'emoglobina glicata, dall'età e dal sesso.

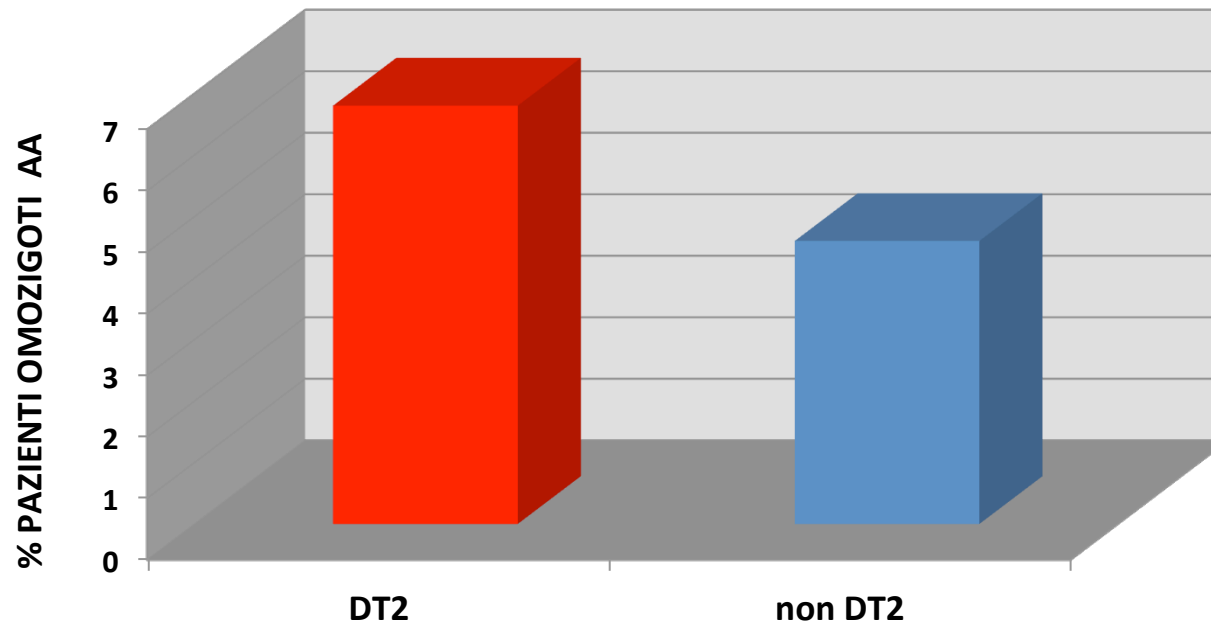
	Coefficiente di regressione standard	t-value	p-value
Età	0.012	0.366	0.714
Sesso	0.038	1.211	0.226
HbA1c	-0.180	-5.710	<0.001
rs4588	-0.080	-2.471	<0.001



VDR rs11568820 G>A

Nei soggetti affetti da DT2 l'allele A ha una frequenza del 25.6%,
paragonabile a quella dei soggetti non diabetici (24.4%, $p = 0.265$)

Nei pazienti affetti da DT2 la prevalenza del genotipo omozigote (AA) è
significativamente maggiore rispetto ai soggetti non diabetici
(6.8% vs 4.6%, $p = 0.037$)



Il genotipo AA si associa alla presenza di DT2 con OR = 1.5
(C.I. = [1.01-2.24], $\chi^2 = 4$, $p < 0.05$)

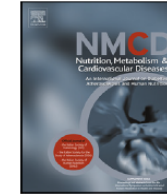
Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases (2016) 26, 407–413



Available online at www.sciencedirect.com

Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases

journal homepage: www.elsevier.com/locate/nmcd



The vitamin D receptor (VDR) gene rs11568820 variant is associated with type 2 diabetes and impaired insulin secretion in Italian adult subjects, and associates with increased cardio-metabolic risk in children



F. Sentinelli ^a, L. Bertocchini ^a, I. Barchetta ^c, D. Capoccia ^a, M. Incani ^b, M.G. Pani ^b, S. Loche ^d, F. Angelico ^c, M. Arca ^c, S. Morini ^e, E. Manconi ^b, A. Lenzi ^a, E. Cossu ^b, F. Leonetti ^a, M.G. Baroni ^{a,b,*}, M.G. Cavallo ^c

^aDepartment of Experimental Medicine, Sapienza University of Rome, Italy

^bEndocrinology and Diabetes, Department of Medical Sciences, University of Cagliari, Cagliari, Italy

^cInternal Medicine Unit, Department of Internal Medicine and Medical Specialties, Sapienza University of Rome, Italy

^dPediatric Endocrine Unit, Regional Hospital for Microcitemia, Cagliari, Italy

^eHuman Anatomy, (CIR), University Campus Bio-Medico, Rome, Italy

Received 9 October 2015; received in revised form 30 December 2015; accepted 1 February 2016

Available online 19 February 2016

I portatori del genotipo AA del gene VDR hanno una maggiore suscettibilità per il diabete di tipo 2 (OR = 1.43) e alterata secrezione insulinica.



Associazione tra il polimorfismo rs11568820 G> A del gene VDR e indici di secrezione insulinica

	Genotipo		P values
	GG+GA n=1302	AA n=74	
HOMA- β	340.4 \pm 298.6	270.3 \pm 229.8	0.041
CIR30	1.3 \pm 1.1	0.95 \pm 0.93	0.022
DI	3.31 \pm 3.57	2.32 \pm 2.50	0.014

- HOMA- β , homeostatic model assessment for beta-cell function;
- CIR30, corrected insulin response at 30 minutes;
- DI, disposition index (CIR30 x ISI)



Genetic risk score (GRS)

Infine abbiamo calcolato un **Genetic Risk Score (GRS)** sulla base dei 4 SNPs studiati per valutare l'associazione dello score con i **livelli di Vitamina D.**

Il GRS è stato calcolato mediante la **somma degli alleli di rischio per ognuno dei 4 polimorfismi in ciascun individuo;**

in particolare i genotipi per ogni SNP sono stati valutati secondo un modello additivo:

0: omozigoti per l'allele non di rischio

1: eterozigoti

2: omozigoti per l'allele di rischio



n alleli di rischio	n individui (%)
0	76 (7.7)
1	234 (23.7)
2	280 (28.4)
3	220 (22.3)
4	124 (12.6)
5	41 (4.2)
6	8 (0.8)
7	3 (0.3)

Nella nostra popolazione abbiamo ottenuto un **range da 0 a 7**.

Poiché le categorie agli estremi (0, 5, 6 e 7) erano costituite da una percentuale di individui molto bassa, abbiamo suddiviso le 8 categorie in **quartili** e abbiamo valutato **l'associazione dei quartili con i livelli di Vitamina D**.

QUARTILI DI GRS

$$1 = 0+1$$

$$2 = 2$$

$$3 = 3$$

$$4 = 4+5+6+7$$



Quartili	n individui	Vitamina D	p-value
1	302	25,4 ± 10	
2	276	25,7±12	
3	213	24,8±12	
4	175	22,6±10	0.012

QUARTILI DI GRS

1= 0+1

2=2

3=3

4= 4+5+6+7

Abbiamo osservato un'associazione con la Vitamina D, che diminuisce significativamente dal 1° al 4° quartile.

OR = 1.03 (C.I. = [1.01-1.04], $p < 0.05$)

DHCR7 rs12785878 T>G

	GG	p-value
Vitamina D	22 ± 10.8	0.008

GC rs4588 G>T

	TT	p-value
Vitamina D	22 ± 9.6	< 0.001



GRS pesato per i geni DHCR7 e GC

Quartili	n individui	Vitamina D	p-value
1	257	27 ± 13	
2	207	24,2±10	
3	230	24,5±10	
4	290	23,8±9	0.048

OR di rischio di ipovitaminosi D calcolato secondo il cut-off di 30 ng/ml.
Il GRS è stato ottenuto moltiplicando l'OR per ogni allele di rischio di ciascun gene.

Abbiamo osservato un'associazione con la Vitamina D, che diminuisce significativamente dal 1° al 4° quartile.



Conclusioni

- ❖ Associazione di 2 geni (DHCR7 e GC) con i livelli di vitamina D
- ❖ Associazione di 2 geni (GC e VDR) con DT2
- ❖ Il GRS conferma l'associazione delle varianti genetiche con i livelli di vitamina D



Progetti futuri

- ❖ Continuare la genotipizzazione dei 4 polimorfismi selezionati nei pazienti diabetici che verranno reclutati per lo studio Summer (5.000 pazienti), e misurazione dei livelli di vitamina D
- ❖ Grazie ai dati che verranno registrati durante il follow-up del Summer avremo gli elementi necessari per testare l'associazione tra i polimorfismi studiati, i livelli di vitamina D e gli eventi cardiovascolari, secondo l'approccio di "Randomizzazione Mendeliana"

