



Fattori genetici coinvolti nello sviluppo delle complicanze cardiovascolari del diabete

Alessandro Doria

Research Division, Joslin Diabetes Center, and Department of Medicine, Harvard Medical School, Boston, MA

INTRODUZIONE

Gran parte dell'aumento in morbilità e mortalità associato con il diabete, in particolar modo con il tipo 2, è dovuta alle complicanze macrovascolari di questa malattia. Rispetto ai soggetti con normale tolleranza glucidica, i pazienti diabetici presentano un rischio di morte cardiovascolare che è dalle due alle quattro volte più elevato (1-2). L'impatto del diabete sulla malattia coronarica è così profondo che i pazienti diabetici che non hanno una storia di infarto miocardico hanno lo stesso rischio di sviluppare un evento coronarico acuto dei pazienti non diabetici che hanno avuto un infarto in passato (3). Inoltre, la presenza del diabete peggiora la prognosi delle sindromi coronariche acute essendo associata ad un aumento della frequenza di complicanze post-infarto (4). Una parte di questo aumento del rischio cardiovascolare è dovuta a fattori frequentemente associati con il diabete quali l'insulino-resistenza, l'obesità viscerale, l'ipertensione, l'aumento del colesterolo LDL e la diminuzione del colesterolo HDL (2, 5). Questi tratti metabolici possono precedere di molti anni l'insorgenza del diabete di tipo 2. Una volta che il diabete è insorto, all'azione di questi fattori di rischio si aggiunge l'effetto proaterogeno dell'iperglicemia attraverso la formazione di prodotti di glicazione, l'attivazione della protein kinase C, l'aumentata produzione di superossido, polioli ed esosamina, e ad altri meccanismi non ancora noti (6-8).

Anche se tutti i soggetti diabetici sono a rischio di complicanze cardiovascolari, la suscettibilità agli effetti aterogeni del diabete varia da paziente a paziente, in parte in relazione al background genetico. Il ruolo dei fattori genetici nello sviluppo della malattia coronarica è

noto da molti anni (9). In uno studio svedese pubblicato nel 1993, il 50% dei gemelli monozigoti di pazienti deceduti per cause cardiovascolari era deceduto a sua volta prima dei 70 anni, mentre la mortalità era solo del 10% in soggetti della stessa età non selezionati sulla base della storia cardiovascolare dei loro gemelli (10). Vari studi hanno dimostrato che i fattori genetici sono importanti per la definizione del rischio cardiovascolare anche nella popolazione diabetica. In uno studio di famiglie con diabete di tipo 2, Wagenknecht e collaboratori hanno riscontrato che il 50% della variabilità del contenuto di calcio nei vasi coronarici (un indice di aterosclerosi) è spiegato da fattori fa-

FAD ECM "il Diabete"

Questa rassegna fa parte di un percorso di [formazione a distanza](#) accreditato a livello nazionale e disponibile gratuitamente nell'aula virtuale della SID (www.fad.siditalia.it).

Per partecipare al corso occorre:

1. Leggere la rassegna (disponibile anche on-line)
2. Registrarsi all'aula e iscriversi al corso "il Diabete"
3. Rispondere on-line al quiz di verifica e compilare il questionario di valutazione dell'evento FAD.

Una volta eseguito con successo il test di valutazione e compilato il questionario di valutazione dell'evento, sarà cura della Segreteria ECM della SID far pervenire l'attestato ECM del corso ai diretti interessati nei tempi e nelle modalità stabiliti dalla regolamentazione vigente.

Per ulteriori informazioni: www.fad.siditalia.it

miliari (11). Valori simili di ereditarietà (41%) sono stati ottenuti da studi dello spessore dell'intima carotidea come indice di aterosclerosi subclinica (12). Le stime sono simili se vengono considerate nell'analisi covariate come i livelli di HDL, peso corporeo, e ipertensione. L'ereditarietà del rischio cardiovascolare tra i soggetti diabetici non è quindi dovuta all'aggregazione familiare di fattori di rischio cardiovascolare tradizionali ma ad altri fattori genetici non ancora noti.

L'identificazione delle varianti genetiche che modulano tale suscettibilità potrebbe avere importanti risvolti. In primo luogo, la conoscenza di queste varianti potrebbe fornire ragguagli sui meccanismi attraverso i quali l'iperglicemia favorisce la formazione e la progressione della placca aterosclerotica. A loro volta, queste nuove conoscenze potrebbero suggerire nuovi targets per lo sviluppo di farmaci per la prevenzione ed il trattamento della malattia coronarica che siano efficaci in modo specifico nella popolazione diabetica. In secondo luogo, queste varianti potrebbero essere usate per costruire algoritmi che permettano l'identificazione precoce di individui a rischio cardiovascolare particolarmente elevato, in modo da sottoporli a misure preventive particolarmente aggressive. Infine, queste conoscenze potrebbero permettere la suddivisione dei pazienti diabetici in sottogruppi con diversa sensibilità genetica alle varie terapie disponibili in modo da attuare dei programmi di medicina personalizzata.

STUDI DI GENI CANDIDATI

Come nel caso di altre malattie multifattoriali, l'approccio iniziale per identificare questi geni è stato quello di studiare geni candidati scelti sulla base della loro funzione e di ciò che è noto sull'eziopatogenesi della malattia aterosclerotica. Alcuni dei geni candidati che sono stati studiati in tal modo sono riportati nella tabella 1. Questi studi sono stati spesso caratterizzati da una numerosità limitata e frequentemente le associazioni riscontrate in uno studio non sono state confermate da studi seguenti. Ciononostante, questo approccio ha generato alcuni risultati interessanti, come per esempio quelli riguardanti il gene per l'adiponectina – una citochina prodotta dal tessuto adiposo avente un'azione insulino-sensibilizzante (13). L'adiponectina ha anche un'azione anti-aterogena diretta sulla parete vasale ostacolante l'adesione di monociti all'endotelio, la proliferazione delle cellule muscolari lisce, e la formazione di foam cells (14). In una metanalisi di quattro studi diversi di pazienti diabetici, un polimorfismo in un introne del gene per questa "adipochina" (rs1501299) è risultato essere associato con un aumento di due volte del rischio di malattia coronarica (15). Tale effetto sul rischio cardiovascolare sembra essere mediato da una diminuzione dei livelli circolanti di adiponectina nei portatori dell'allele a rischio del polimorfismo rs1501299 o di altre varianti in "linkage disequilibrium" con questo (16). Anche i geni codi-

ficanti per i recettori dell'adiponectina potrebbero rivestire un ruolo importante come indicato dall'associazione riscontrata in soggetti diabetici americani ed italiani tra malattia coronarica ed alcuni polimorfismi nel gene ADIPOR1 (uno dei tre recettori dell'adiponectina identificato finora) (17). Queste varianti genetiche sono anche associate con un'espressione più bassa di ADIPOR1 (17). L'ipotesi è quindi che l'effetto genetico sul rischio cardiovascolare sia dovuto ad una diminuzione dell'azione anti-aterogena dell'adiponectina nei portatori degli alleli a rischio. Risultati interessanti sono stati ottenuti anche per tre varianti aventi un effetto negativo sulla trasmissione del segnale insulinico: ENPP1 K121Q, IRS1 G972R, eTRIB3 Q84R (18-20). Per la prima di queste varianti, la quale potenzia l'effetto inibitorio sul segnale insulinico della fosfodiesterasi ENPP1, è stata riscontrata un'associazione con un rischio maggiore di eventi cardiovascolari e con un'età più giovane alla loro insorgenza, soprattutto in presenza di obesità (18). Considerate insieme, queste tre sostituzioni amminoacidiche conferiscono un aumento del 18% del rischio cardiovascolare nonché una diminuzione della sensibilità insulinica sia a livello endoteliale che sistemico (21). Nel complesso, questi risultati confermano la ben nota associazione tra insulino-resistenza e malattia coronarica e suggeriscono dei possibili "targets" per lo sviluppo di nuovi agenti farmacologici che possano spezzare questo legame.

STUDI GENOME-WIDE

Gli studi di geni candidati sono utili, ma, riguardando geni di cui già si sospetta un ruolo nello sviluppo ed evoluzione della placca aterosclerotica, sono diretti ad ottenere conferme piuttosto che a fornire nuove informazioni sui meccanismi del processo aterosclerotico. Negli ultimi 6-7 anni è stato però possibile superare questo paradigma ed estendere lo studio a gran parte dei geni del genoma umano senza doversi necessariamente basare sulle conoscenze disponibili al momento dello studio. Due fattori hanno reso possibile questo nuovo approccio. Il primo è la disponibilità di dati sul linkage disequilibrium (il fenomeno per cui due polimorfismi nella stessa regione del genoma tendono ad essere correlati) lungo tutto il genoma umano. Sulla base di questi dati, generati dal progetto HapMap e più recentemente dal progetto 1000 Genomes, è stato possibile scegliere dei sets di polimorfismi che servano da marcatori di tutti gli altri polimorfismi del genoma umano. Il secondo fattore è stato lo sviluppo di metodi basati su microarray permettenti la tipizzazione di centinaia di migliaia, o addirittura di milioni di questi polimorfismi in un unico assay. La combinazione di questi due fattori ha portato ai cosiddetti "genome-wide association studies" o GWAS, attraverso i quali è possibile studiare la presenza di associazioni tra varianti genetiche

Tabella 1 ◆ Geni candidati implicati nella predisposizione genetica alla malattia coronarica in soggetti diabetici

GENE CANDIDATO	SIMBOLO	POLIMORFISMO
Adipochine e loro recettori		
Adiponectina	ADIPOQ	+45 T/G, +276 G/T
Recettore adiponectina	ADIPOR1	rs4950894, rs7539542
Resistina	RETN	IVS2+181
Visfatina	NAMPT	-948 C>A
Recettore leptina	LEPR	rs3790432, rs1805096
Infiammazione		
Ciclossigenasi 2	COX2	rs689466, rs2066826, rs20417
Epossido idrolasi	EPHX2	R287Q
Linfotossina-alfa	LTA	+252 A/G
CD40	CD40	rs1535045, rs3765459
TNF- α	TNF	-308 G/A
A20	TNFAIP3	rs5029930, rs610604
Lipidi, ipertensione e altri fattori di rischi cardiovascolare		
ApoE	APOE	e2/e3/ ϵ 4
Lipoprotein lipasi	LPL	rs285
Paraossonasi	PON1	Q192R
Sintetasi dell'ossido nitrico	NOS3	E298D, -786 T/C
ACE	ACE	I/D
Recettore angiotensina	AGTR1	+1166 A/C
Aptoglobina	HP	Fenotipo 1/2
Metabolismo del glucosio		
Aldoso reductasi	AK1R1B1	-106 C/T, (CA) microsatellite
Recettori per "advanced glycation end-products"	RAGE	-374 T/A
Insulino-resistenza		
PC1	ENPP1	K121Q
Omologo di Tribbles 3	TRB3	Q84R
Substrato del recettore inulinico 1	IRS1	G972R
CD36 (Recettore trombospondina e trasportatore acidi grassi)	CD36	rs1984112, rs1761667, rs1049673
Protein tirosin fosfatasi N1	PTPN1	SNP multipli in un blocco LD
Proteina disaccoppiante 2	UCP2	-866 G/A
Proteina legante gli acidi grassi 2	FABP2	A54T

e malattie umane, o qualsiasi altra variabile biologica, lungo l'intero genoma, senza dover formulare ipotesi a priori.

Va tenuto presente che l'approccio GWAS non è senza problemi. Dal momento che in ciascuno studio vengono condotti centinaia di migliaia di tests di associazione, è possibile che alcune varianti raggiungano il livello convenzionale di significatività statistica ($p < 0,05$) per puro caso. È quindi necessario usare un livello di significatività molto più rigoroso (come per esempio $p < 5 \times 10^{-8}$, assumendo che vengano testati un milione di polimorfismi). Questo significa che, per mante-

nere la necessaria potenza statistica, è necessario che la numerosità dei campioni di casi e controlli inclusi nello studio sia molto elevata, cosa che a sua volta determina una notevole complessità organizzativa e la necessità di considerare insieme vari studi attraverso delle metanalisi.

STUDI GWAS NELLA POPOLAZIONE GENERALE

Tramite l'approccio GWAS sono stati identificati finora più di 40 loci genetici robustamente associati con la malattia coronarica nella popolazione generale (Tab. 2) (22-24). Analizzando questi risultati, si possono notare alcune caratteristiche in comune con i loci identificati nel caso di altre malattie multifattoriali. La prima è che gran parte delle varianti genetiche associate con la malattia coronarica determinano un aumento piuttosto modesto del rischio cardiovascolare, nell'ordine del 10-20%. Il secondo aspetto è che gran parte di queste varianti sono localizzate in zone non codificanti del genoma, il che suggerisce che il loro effetto sul rischio cardiovascolare sia mediato da alterazioni dell'espressione genica invece che da alterazioni della sequenza aminoacidica. Il terzo aspetto è che i geni che sono situati in vicinanza di queste varianti, e che si suppone siano influenzati da esse, spesso non hanno funzioni biologiche facilmente riconducibili ai processi tradizionalmente implicati nella patogenesi dell'aterosclerosi. Tra le eccezioni a questo assioma troviamo il gene LDLR, codificante il recettore per le LDL, il gene PCSK9, il quale codifica per una serin proteasi che è coinvolta nella modulazione dell'espressione del recettore delle LDL che risulta mutata in forme mendeliane di ipercolesterolemia, ed il cluster di geni SLC22A-LPAL2-LPA, che include la sequenza codificante la lipoproteina Lp(a) altamente aterogena. In tutti i GWAS portati a termine finora, l'associazione più forte con la malattia coronarica è stato osservata in una regione del cromosoma 9p21. La forza di tale associazione, corrispondente ad un aumento del rischio cardiovascolare del 20-30% per ciascun allele a rischio di cui si è portatori, non diminuisce dopo aggiustamento per altri fattori di rischio cardiovascolare. Non sembra quindi che questo effetto genetico sia mediato da pathways aterogeni già note. L'associazione con la malattia coronarica interessa vari polimorfismi localizzati in una regione che si estende per 60 Kb. A causa del forte linkage disequilibrium in questa regione, non è possibile dedurre dai soli dati di associazione quale di questi polimorfismi sia quello che influenza il rischio cardiovascolare. Qualunque sia la variante responsabile, è verosimile che il suo effetto sia dovuto ad alterazioni dell'espressione genica visto che nessuna delle varianti associate con CAD è localizzata in regioni codificanti (25). La regione di 60 Kb dove è localizzato il segnale di associazione include l'estremità 3' del gene CDKN2B-AS (noto anche come ANRIL), il quale è espresso in molti tipi cellulari coinvolti nel processo aterosclerotico (26-27). Il gene CDKN2B-AS è trascritto in due mRNA: uno più lungo che include gli esoni all'estremità 3' contenuti nella regione associata con la malattia coronarica ed un mRNA più corto che manca di questi esoni. Sulla base di dati sperimentali, è stato proposto che il rapporto tra questi due mRNA sia alterato nei portatori dell'allele 9p21 a rischio e che tale alterazione abbia un effetto sull'espressione di geni adiacenti attraverso meccanismi di "RNA interference" e "chromatin remodeling". Particolare

attenzione viene data agli effetti potenziali su CDKN2A and CDKN2B, due geni che si trovano a breve distanza ed in parte si sovrappongono a CDKN2B-AS. Questi due geni codificano degli inibitori delle chinasi ciclino-dipendenti (CDK), i quali sono coinvolti nel controllo della proliferazione cellulare, dell'invecchiamento, e dell'apoptosi e sono espressi a livelli elevati sia nelle cellule vascolari che in quelle infiammatorie (28-30). A sostegno dell'ipotesi di un ruolo di questi geni, è stata dimostrata una correlazione, anche se solo marginalmente significativa, tra i livelli di mRNA di CDKN2B e quelli dell'mRNA "lungo" di CDKN2B-AS (31). È quindi possibile che la variante 9p21 a rischio predisponga alla malattia coronarica attraverso una diminuzione dell'espressione della forma lunga di CDKN2B, che a sua volta provoca una diminuzione dell'espressione di CDKN2B e della produzione di inibitori di CDK, la quale promuove un fenotipo proliferativo in cellule coinvolte nel processo aterosclerotico quali ad esempio le cellule muscolari lisce.

Il locus 9p21 influenza il rischio cardiovascolare anche in presenza di diabete. Anzi, dati provenienti dal Joslin Heart Study sembrano suggerire che questo locus abbia un effetto più marcato nei pazienti con diabete di tipo 2 che nella popolazione generale (32). In questo studio, sono stati comparati casi aventi diabete di tipo 2 e stenosi coronarica significativa documentata angiograficamente con controlli anch'essi aventi diabete di tipo 2 ma con storia cardiovascolare negativa e test da sforzo normale nonostante una durata di diabete superiore ai 5 anni. Il rischio di stenosi coronarica è risultato essere aumentato del 45% nei soggetti eterozigoti al locus 9p21 e del 140% nei soggetti omozigoti. Il riscontro di un effetto significativamente più marcato di quello riscontrato nella popolazione generale suggerisce la presenza di un'interazione tra variante genetica e iperglicemia. Questa ipotesi trova conferma nel fatto che gli omozigoti per la variante 9p21 che erano in cattivo controllo metabolico (cioè nel terzile più alto di HbA1c) presentavano un aumento del 400% nel rischio di stenosi coronarica in contrasto con un aumento di meno del 50% nei soggetti che avevano sol uno di questi due fattori di rischio, cioè omozigoti in buon controllo metabolico o non-omozigoti in cattivo controllo metabolico (Fig. 1). Tale interazione tra genotipo e controllo metabolico raggiungeva la significatività statistica ed era presente anche in uno studio prospettico di 475 pazienti con diabete di tipo 2 della Joslin Clinic. Dopo 10 anni di follow-up, gli omozigoti in cattivo controllo metabolico presentavano una mortalità cardiovascolare del 36% in confronto ad una mortalità del 15-20% in tutti gli altri soggetti (Fig. 2) (32).

Questi risultati hanno varie implicazioni. Da un punto di vista epidemiologico, possono spiegare le difficoltà incontrate nel dimostrare un effetto del controllo metabolico sulle complicanze cardiovascolari (4, 8, 33-36). Se veramente il cattivo controllo glicemico ha un impac-

Tabella 2 ◆ Associazioni genetiche con la malattia coronarica identificate nella popolazione generale mediante l'approccio GWAS

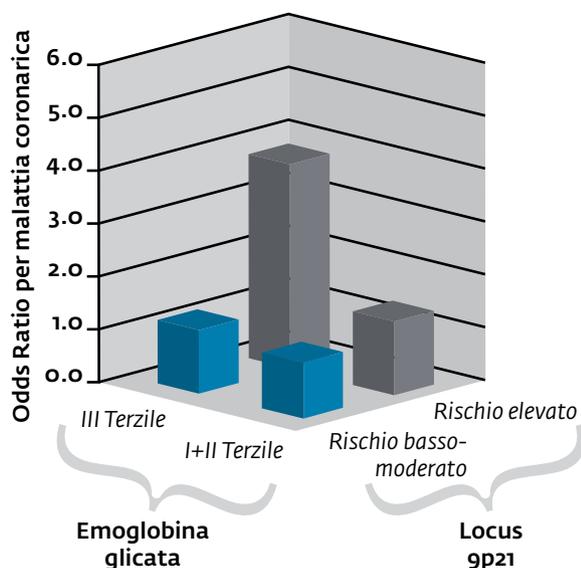
CROMOSOMA	POSIZIONE	GENE	POLIMORFISMO	FREQUENZA ALLELE A RISCHIO	ODDS RATIO
1	56962821	PPAP2B	rs17114036	0.91	1.11
1	109821511	SORT1	rs602633	0.77	1.12
1	154422067	IL6R	rs4845625	0.47	1.05
1	222823529	MIA3	rs17465637	0.74	1.14
2	21286057	APOB	rs515135	0.83	1.08
2	44073881	ABCG5-ABCG8	rs6544713	0.30	1.06
2	85809989	VAMP5-VAMP8-GGCX	rs1561198	0.45	1.05
2	145801461	ZEB2-AC074093.1	rs2252641	0.46	1.05
2	203745885	WDR12	rs6725887	0.11	1.12
3	138122122	MRAS	rs9818870	0.14	1.07
4	156635309	GUCY1A3	rs7692387	0.81	1.07
5	131667353	SLC22A4-SLC22A5	rs273909	0.14	1.08
6	12901441	PHACTR1	rs9369640	0.65	1.09
6	35034800	ANKS1A	rs17609940	0.75	1.07
6	39174922	KCNK5	rs10947789	0.76	1.06
6	134214525	TCF21	rs12190287	0.59	1.07
6	160863532	SLC22A3-LPAL2-LPA	rs2048327	0.35	1.06
6	161143608	PLG	rs4252120	0.73	1.06
7	107244545	7q22	rs10953541	0.75	1.08
7	129663496	ZC3HC1	rs11556924	0.65	1.09
8	19813180	LPL	rs264	0.86	1.07
8	126490972	TRIB1	rs2954029	0.55	1.05
9	22125503	CDKN2BAS1	rs1333049	0.47	1.23
9	136154168	ABO	rs579459	0.21	1.07
10	30335122	KIAA1462	rs2505083	0.42	1.06
10	44753867	CXCL12	rs501120	0.83	1.07
10	104719096	CYP17A1-CNNM2-NT5C2	rs12413409	0.89	1.12
11	103660567	PDGFD	rs974819	0.29	1.07
11	116648917	ZNF259, APOA5-A4-C3-A1	rs964184	0.13	1.13
12	111884608	SH2B3	rs3184504	0.40	1.07
13	28973621	FLT1	rs9319428	0.32	1.06
13	110960712	COL4A1-COL4A2	rs4773144	0.42	1.07
14	100133942	HHIPL1	rs2895811	0.43	1.06
15	79089111	ADAMTS7	rs3825807	0.57	1.08
15	91416550	FURIN-FES	rs17514846	0.44	1.06
17	2117945	SMG6	rs2281727	0.36	1.05
17	17543722	RAI1-PEMT-RASD1	rs12936587	0.59	1.06
19	11163601	LDLR	rs1122608	0.76	1.10
19	45395619	ApoE-ApoC1	rs2075650	0.14	1.11
21	35599128	gene desert (KCNE2)	rs9982601	0.13	1.13

Dati compilati dalle voci bibliografiche 23 e 24. Il segnale di associazione più forte è evidenziato in grassetto

to significativo sul rischio cardiovascolare solo nel 30% dei soggetti (cioè in coloro che sono omozigoti per la variante 9p21), l'associazione tra cattivo controllo metabolico e complicanze cardiovasco-

lari non può essere che modesta, o addirittura assente, in studi che considerano l'intera popolazione di soggetti diabetici. Da un punto di vista clinico, questi dati indicano che il genotipo 9p21 potrebbe

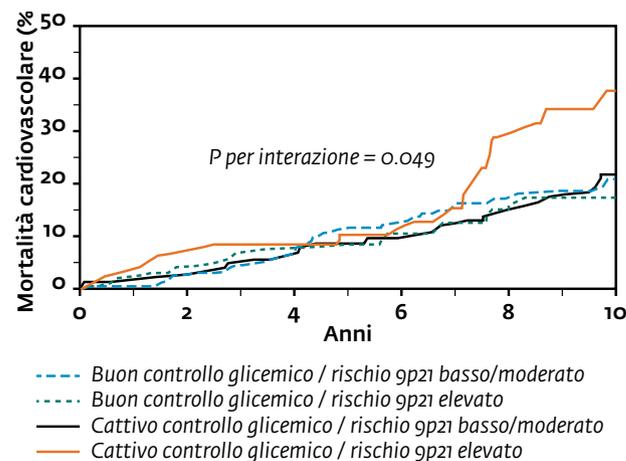
Figura 1 ◆ Sinergismo tra cattivo controllo glicemico e locus 9p21 nel determinare il rischio di malattia coronarica tra i soggetti diabetici



essere impiegato per identificare pazienti particolarmente sensibili al controllo metabolico e sottolineano l'importanza di effettuare clinici trials che testino questa ipotesi. Da un punto di vista eziopatogenetico, suggeriscono che le pathways aterogene sulle quali agiscono il locus 9p21 e l'iperglicemia si intersecano a qualche livello. In questo senso, l'identificazione del gene sul quale agisce la variante 9p21 potrebbe far luce sui meccanismi molecolari, ancora dibattuti, attraverso i quali l'eccesso di glucosio promuove l'aterosclerosi (4, 8, 33). Come è stato discusso in precedenza, la variante 9p21 sembra agire attraverso i geni CDKN2A e CDKN2B, i quali codificano tre inibitori delle chinasi ciclino dipendenti (p16^{INK4a}, ARF, e p15^{INK4b}) coinvolti nel controllo della proliferazione e dell'invecchiamento cellulare (28-30). Tali funzioni, potenzialmente rilevanti per il processo ateroclerotico, sono influenzate anche dall'eccesso di glucosio e da altre caratteristiche metaboliche associate con il diabete quali l'insulino-resistenza (37). Lo studio dei meccanismi di interazione tra locus 9p21 e iperglicemia potrebbe quindi portare all'identificazione di nodi cruciali in queste pathways da usare come targets per lo sviluppo di nuovi trattamenti preventivi specificamente indirizzati ai pazienti diabetici.

STUDI GWAS NELLA POPOLAZIONE DIABETICA

Figura 2 ◆ Effetto combinato del locus 9p21 e del cattivo controllo glicemico su mortalità cardiovascolare



I dati sono tratti dalla voce bibliografica 32 e si riferiscono ad una coorte di 475 pazienti della Joslin Clinic seguiti nel tempo

Il fatto che i livelli glicemici modulino gli effetti del locus 9p21 solleva l'ipotesi che possano esistere altri geni la cui interazione con l'iperglicemia o altri aspetti del diabete sia così forte da far sì che il loro effetto sia visibile solo nei soggetti diabetici. Sulla base di questa ipotesi è stato effettuato di recente uno studio GWAS della malattia coronarica limitato a soggetti con diabete di tipo 2. Sono stati inclusi nello studio, organizzato in tre stadi, 1517 casi cardiovascolari e 2671 controlli aventi tutti diabete di tipo 2 e appartenenti a cinque studi diversi: Il Nurse Health Study (NHS), lo Health Professional Follow-up Study (HPFS), il Joslin Heart Study (JHS), Il Gargano Heart Study (GHS), ed un gruppo di casi e controlli reclutati a Catanzaro. Lo studio ha analizzato due milioni e mezzo di polimorfismi distribuiti lungo il genoma. Uno di questi, localizzato nella regione 1q25, è risultato essere associato con la malattia coronarica in ciascuno dei tre stadi dello studio e raggiungeva la significatività nell'analisi combinata dei tre stadi anche tenendo in considerazione la molteplicità di tests statistici effettuati (Fig. 3) (38). Questo risultato è rimarchevole per due motivi. Il primo è che la forza dell'associazione di questo locus con la malattia coronarica, corrispondente ad un odds ratio di 1.36, è simile a quella del più forte effetto genetico identificato sinora nella popolazione generale (cioè il locus 9p21). Il secondo è che questo effetto genetico sembra essere specifico per il diabete dal momento che non è stata riscontrata alcuna associazione tra il locus 1q25 e malattia coronarica nei soggetti senza diabete dell'NHS e HPFS (odds ratio=0.99). La specificità di questo effetto per il diabete è anche indicata dal fatto che il locus 1q25 è associato con la malattia coronarica anche nella popolazione generale con una forza (OR=1.06) simile a quella che ci

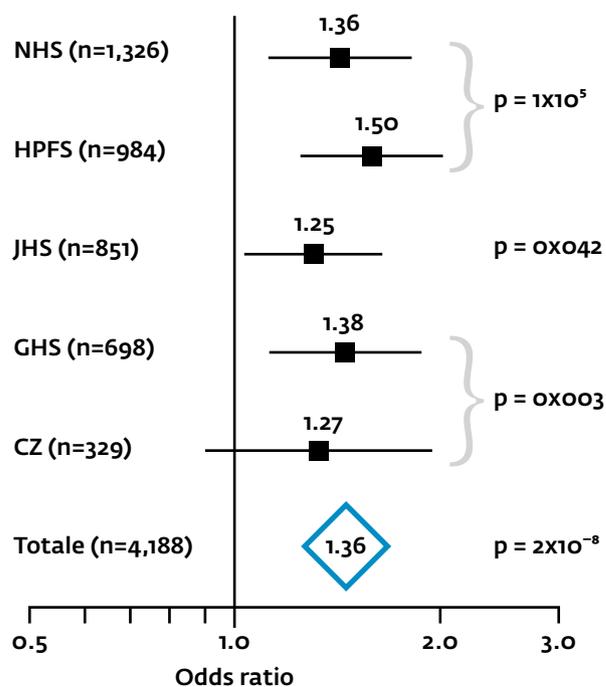
si aspetterebbe se l'effetto genetico fosse presente unicamente nel 10-15% della popolazione affetto da diabete (38).

Il polimorfismo associato con la malattia coronarica è localizzato tra il gene ZNF648, sul lato centromerico, ed il gene GLUL, sul lato telomerico. Dal momento che non sono state identificate varianti amminoacidiche in linkage disequilibrium con questa variante, è verosimile che la sua associazione con la malattia coronarica sia dovuta ad un effetto sulla regolazione genica, come è spesso il caso per i geni associati con malattie multifattoriali. A sostegno di questa ipotesi, l'allele a rischio è associato con una diminuzione dell'espressione endoteliale di GLUL (il gene più vicino al polimorfismo in direzione telomerica). Non sono state invece riscontrate associazioni con l'espressione del gene ZNF648 o di altri geni adiacenti. Il gene GLUL codifica una ligasi (nota come glutammina sintetasi) catalizzante la conversione dell'acido glutammico in glutammina (Fig. 4) (39). In un campione di 100 soggetti del Joslin Heart Study, non venivano riscontrate associazioni significative tra il locus 1q25 e livelli plasmatici di acido glutammico o di glutammina. Tuttavia, rispetto ai soggetti omozigoti per l'allele protettivo, gli omozigoti per l'allele a rischio presentavano una diminuzione del 15% nel rapporto tra livelli plasmatici di acido piroglutammico e acido glutammico (38). Una diminuzione di tale rapporto era anche presente nei soggetti con malattia coronarica rispetto ai controlli con normale test da sforzo. Se l'associazione tra locus 1q25 e malattia coronarica veniva aggiustata per il rapporto piroglutammato/glutammato, la forza di tale associazione diminuiva del 50%. L'effetto del locus 1q25 sulla malattia coronarica sembra quindi essere mediato almeno in parte dal suo effetto sul rapporto piroglutammato/glutammato.

L'acido piroglutammico è l'immediato precursore del glutammato nel ciclo del γ -glutamile, la cui funzione è di produrre glutazione, il quale a sua volta è il più importante anti-ossidante dell'organismo umano (Fig. 4). È possibile quindi ipotizzare che la diminuzione dell'attività enzimatica causata del locus 1q25 porti ad una alterazione dell'attività di questa via metabolica e ad una diminuzione della sintesi di glutazione. Dal momento che il diabete è anch'esso associato con una diminuzione della concentrazione di glutazione (40), è possibile che la combinazione dei due effetti, quello del locus 1q25 e quello del diabete, diminuisca la disponibilità di questo anti-ossidante al di sotto di un certo livello critico, rendendo i portatori diabetici dell'allele a rischio più vulnerabili allo stress ossidativo e, conseguentemente, allo sviluppo di aterosclerosi. Studi sono in corso per verificare questa così come altre ipotesi basate sui vari ruoli metabolici di glutammato e glutammina.

CONCLUSIONI E DIREZIONI FUTURE

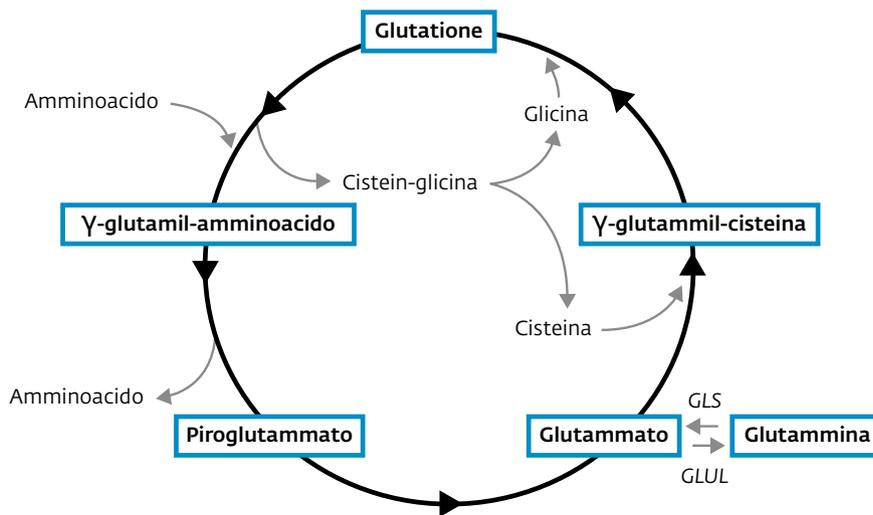
Figura 3 ◆ Associazione del locus 1q25 con il rischio di malattia coronarica in pazienti con diabete di tipo 2



I dati sono tratti dalla voce bibliografica 38. NHS: Nurses' Health Study; HPFS: Health Professional Follow-up Study; JHS: Joslin Heart Study; GHS: Gargano Heart Study; CZ: Catanzaro Study

Gli ultimi vent'anni hanno visto un aumento esponenziale nelle ricerche sui fattori genetici coinvolti nella malattia coronarica e nelle complicanze cardiovascolari del diabete. Questo sforzo ha portato all'identificazione di vari geni aventi un effetto nella popolazione generale e/o nella popolazione diabetica, contribuendo a formulare delle nuove ipotesi sui meccanismi che collegano il diabete allo sviluppo di aterosclerosi. L'identificazione di questi geni offre anche la possibilità di sviluppare algoritmi predittivi personalizzati, anche se i geni identificati finora non sembrano aggiungere molto alla predizione del rischio cardiovascolare fornita ai fattori di rischio tradizionali. Anche se il progresso in questo campo è stato notevole, rimane ancora molto da fare. In primo luogo, l'approccio GWAS non è stato sfruttato fino in fondo. Mentre sono stati effettuati molti studi GWAS nella popolazione generale, solo uno di questi, quello che ha portato all'identificazione della variante in posizione 1q25, è stato condotto specificamente nei soggetti diabetici. È verosimile che altri fattori genetici, aventi effetti più modesti ma non meno interessanti dal punto di vista meccanicistico, possano essere identificati mediante studi più ampi nella popolazione diabetica. In secondo luogo, in tutti gli studi effettuati finora, sia nella popolazione generale che in quella diabetica, è stato assunto che la regolazione della predispo-

Figura 4 ◆ Rappresentazione schematica del ciclo del gamma-glutamile



GLUL= Glutammina sintetasi; GLS=Glutaminasi

sizione alle complicanze cardiovascolari sia dovuta a polimorfismi relativamente frequenti nella popolazione (cioè con frequenza >5%). Anche se ci sono basi teoriche a sostegno di questa ipotesi (41), non è possibile escludere che varianti meno frequenti, o addirittura rare, svolgano un ruolo ugualmente importante, così come è stato notato per altri caratteri complessi (42). Va notato a questo riguardo che la tecnologia per la sequenziatura del DNA ha fatto passi da gigante negli ultimi anni ed è ora possibile sequenziare ad un costo ragionevole tutte le sequenze codificanti (cioè l'intero esoma) o addirittura l'intero genoma di singoli pazienti. L'applicazione di queste nuove tecnologie allo studio del ruolo di varianti meno frequenti o rare, sostenuta da un aumento della numerosità dei sets di casi e controlli disponibili per questi studi, potrebbe rivoluzionare questo campo di ricerca. Infine, vi sono interi aspetti della genetica che rimangono a tutt'oggi inesplorati per quanto riguarda la malattia coronarica, come per esempio il ruolo dei microRNA o delle modifiche epigenetiche che sono coinvolte nella modulazione dell'espressione genica da parte dell'ambiente e che potrebbero spiegare il fenomeno della "memoria metabolica", cioè della persistenza nel tempo degli effetti negativi dell'iperglicemia. È possibile prevedere che l'espansione degli studi di genetica in queste nuove direzioni porterà ad una più completa definizione dei meccanismi molecolari che legano il diabete all'aterosclerosi, in modo che questi possano essere tradotti in nuovi strumenti diagnostici e terapeutici atti a diminuire l'impatto negativo di questa malattia nella popolazione.

BIBLIOGRAFIA

1. Krolewski AS, Warram JH. Epidemiology of late complications of diabetes: A basis for the development and evaluation of preventive program. In: Kahn CR, Weir GC, King GL, Jacobson AM, Moses AC, Smith RJ, editors. *Joslin's Diabetes Mellitus*. New York: Lippincott, Williams & Wilkins, 2005.
2. Warram JH, Kopczynski J, Janka HU, Krolewski AS. Epidemiology of non-insulin-dependent diabetes mellitus and its macrovascular complications. A basis for the development of cost-effective programs. *Endocrinol Metab Clin North Am* 26(1): 165-188, 1997.
3. Haffner SM, Lehto S, Ronnema T, Pyorala K, Laakso M. Mortality from coronary heart disease in subjects with type 2 diabetes and in nondiabetic subjects with and without prior myocardial infarction. *N Engl J Med* 339(4): 229-234, 1998.
4. Beckman JA, Creager MA, Libby P. Diabetes and atherosclerosis: epidemiology, pathophysiology, and management. *JAMA* 287(19): 2570-2581, 2002.
5. Reaven GM. Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes* 37(12): 1595-1607, 1988.
6. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 414(6865): 813-820, 2001.
7. Nishikawa T, Edelstein D, Du XL, Yamagishi S, Matsumura T, Kaneda Y et al. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature* 404(6779): 787-790, 2000.
8. Rask-Madsen C, King GL. Proatherosclerotic mechanisms involving protein kinase C in diabetes and insulin resistance. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25(3): 487-496, 2005.

9. Shea S, Ottman R, Gabrieli C, Stein Z, Nichols A. Family history as an independent risk factor for coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 4(4): 793-801, 1984.
10. Marenberg ME, Risch N, Berkman LF, Floderus B, De Faire U. Genetic susceptibility to death from coronary heart disease in a study of twins. *N Engl J Med* 330(15): 1041-1046, 1994.
11. Wagenknecht LE, Bowden DW, Carr JJ, Langefeld CD, Freedman BI, Rich SS. Familial aggregation of coronary artery calcium in families with type 2 diabetes. *Diabetes* 50(4): 861-866, 2001.
12. Lange LA, Bowden DW, Langefeld CD, Wagenknecht LE, Carr JJ, Rich SS et al. Heritability of carotid artery intima-medial thickness in type 2 diabetes. *Stroke* 33(7): 1876-1881, 2002.
13. Scherer PE, Williams S, Fogliano M, Baldini G, Lodish HF. A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. *J Biol Chem* 270(45): 26746-26749, 1995.
14. Kadowaki T, Yamauchi T. Adiponectin and adiponectin receptors. *Endocr Rev* 26(3): 439-451, 2005.
15. Qi L, Doria A, Manson JE, Meigs JB, Hunter D, Mantzoros CS et al. Adiponectin genetic variability, plasma adiponectin, and cardiovascular risk in patients with type 2 diabetes. *Diabetes* 55(5): 1512-1516, 2006.
16. Menzaghi C, Trischitta V, Doria A. Genetic influences of adiponectin on insulin resistance, type 2 diabetes, and cardiovascular disease. *Diabetes* 56(5): 1198-1209, 2007.
17. Soccio T, Zhang YY, Bacci S, Mlynarski W, Placha G, Raggio G et al. Common haplotypes at the adiponectin receptor 1 (ADIPOR1) locus are associated with increased risk of coronary artery disease in type 2 diabetes. *Diabetes* 55(10): 2763-2770, 2006.
18. Bacci S, Rizza S, Prudente S, Spoto B, Powers C, Facciorusso A et al. The ENPP1 Q121 variant predicts major cardiovascular events in high-risk individuals: evidence for interaction with obesity in diabetic patients. *Diabetes* 60(3): 1000-1007, 2011.
19. Prudente S, Hribal ML, Flex E, Turchi F, Morini E, De Cosmo S et al. The functional Q84R polymorphism of mammalian Tribbles homolog TRB3 is associated with insulin resistance and related cardiovascular risk in Caucasians from Italy. *Diabetes* 54(9): 2807-2811, 2005.
20. Sharma R, Prudente S, Andreozzi F, Powers C, Mannino G, Bacci S et al. The type 2 diabetes and insulin-resistance locus near IRS1 is a determinant of HDL cholesterol and triglycerides levels among diabetic subjects. *Atherosclerosis* 216(1): 157-160, 2011.
21. Bacci S, Prudente S, Copetti M, Spoto B, Rizza S, Baratta R et al. Joint effect of insulin signaling genes on cardiovascular events and on whole body and endothelial insulin resistance. *Atherosclerosis* 226(1): 140-145, 2013.
22. Schunkert H, Konig IR, Kathiresan S, Reilly MP, Assimes TL, Holm H et al. Large-scale association analysis identifies 13 new susceptibility loci for coronary artery disease. *Nat Genet* 43(4): 333-338, 2011.
23. Coronary Artery Disease (C4D) Genetics Consortium. A genome-wide association study in Europeans and South Asians identifies five new loci for coronary artery disease. *Nat Genet* 43(4): 339-344, 2011.
24. Deloukas P, Kanoni S, Willenborg C, Farrall M, Assimes TL, Thompson JR et al. Large-scale association analysis identifies new risk loci for coronary artery disease. *Nat Genet* 45(1): 25-33, 2013.
25. McPherson R, Pertsemlidis A, Kavaslar N, Stewart A, Roberts R, Cox DR et al. A common allele on chromosome 9 associated with coronary heart disease. *Science* 316(5830): 1488-1491, 2007.
26. Broadbent HM, Peden JF, Lorkowski S, Goel A, Ongen H, Green F et al. Susceptibility to coronary artery disease and diabetes is encoded by distinct, tightly linked SNPs in the ANRIL locus on chromosome 9p. *Hum Mol Genet* 17(6): 806-814, 2008.
27. Jarinova O, Stewart AF, Roberts R, Wells G, Lau P, Naing T et al. Functional analysis of the chromosome 9p21.3 coronary artery disease risk locus. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 29(10), 2009: 1671-1677.
28. Kamb A, Gruis NA, Weaver-Feldhaus J, Liu Q, Harshman K, Tavtigian SV et al. A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types. *Science* 264(5157): 436-440, 1994.
29. Pomerantz J, Schreiber-Agus N, Liegeois NJ, Silverman A, Alland L, Chin L et al. The Ink4a tumor suppressor gene product, p19Arf, interacts with MDM2 and neutralizes MDM2's inhibition of p53. *Cell* 92(6): 713-723, 1998.
30. Hannon GJ, Beach D. p15INK4B is a potential effector of TGF-beta-induced cell cycle arrest. *Nature* 371(6494): 257-261, 1994.
31. Jarinova O, Stewart AF, Roberts R, Wells G, Lau P, Naing T et al. Functional Analysis of the Chromosome 9p21.3 Coronary Artery Disease Risk Locus. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009.
32. Doria A, Wojcik J, Xu R, Gervino EV, Hauser TH, Johnstone MT et al. Interaction between poor glycemic control and 9p21 locus on risk of coronary artery disease in type 2 diabetes. *JAMA* 300(20): 2389-2397, 2008.
33. Libby P, Plutzky J. Diabetic macrovascular disease: the glucose paradox? *Circulation* 106(22): 2760-2763, 2002.
34. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. *Lancet* 352(9131): 837-853, 1998.
35. Haffner SM. Epidemiological studies on the effects of hyperglycemia and improvement of glycemic control on macrovascular events in type 2 diabetes. *Diabetes Care* 22 Suppl 3: C54-C56, 1999.

36. Wild SH, Dunn CJ, McKeigue PM, Comte S. Glycemic control and cardiovascular disease in type 2 diabetes: a review. *Diabetes Metab Res Rev* 15(3): 197-204, 1999.
37. Zheng XL, Yuan SG, Peng DQ. Phenotype-specific inhibition of the vascular smooth muscle cell cycle by high glucose treatment. *Diabetologia* 50(4): 881-890, 2007.
38. Qi L, Qi Q, Prudente S, Mendonca C, Andreozzi F, di PN et al. Association between a genetic variant related to glutamic acid metabolism and coronary heart disease in individuals with type 2 diabetes. *JAMA* 310(8): 821-828, 2013.
39. Krebs HA. Metabolism of amino-acids: The synthesis of glutamine from glutamic acid and ammonia, and the enzymic hydrolysis of glutamine in animal tissues. *Biochem J* 29(8): 1951-1969, 1935.
40. Yoshida K, Hirokawa J, Tagami S, Kawakami Y, Urata Y, Kondo T. Weakened cellular scavenging activity against oxidative stress in diabetes mellitus: regulation of glutathione synthesis and efflux. *Diabetologia* 38(2): 201-210, 1995.
41. Bodmer W, Bonilla C. Common and rare variants in multifactorial susceptibility to common diseases. *Nat Genet* 40(6): 695-701, 2008.
42. Fearnhead NS, Wilding JL, Winney B, Tonks S, Bartlett S, Bicknell DC et al. Multiple rare variants in different genes account for multifactorial inherited susceptibility to colorectal adenomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(45): 15992-15997, 2004.

