



SID

Società Italiana
di Diabetologia



Ri-sequenziamento di *loci* associati al Diabete di Tipo 2 da GWAS, mediante il confronto degli estremi di indici dinamici della secrezione insulinica (disposition index)

Diego BAILETTI

Dipartimento di Medicina Sperimentale
Sapienza Università di Roma





SID

Società Italiana
di Diabetologia

XI
EDIZIONE
PARMA
DIABETE

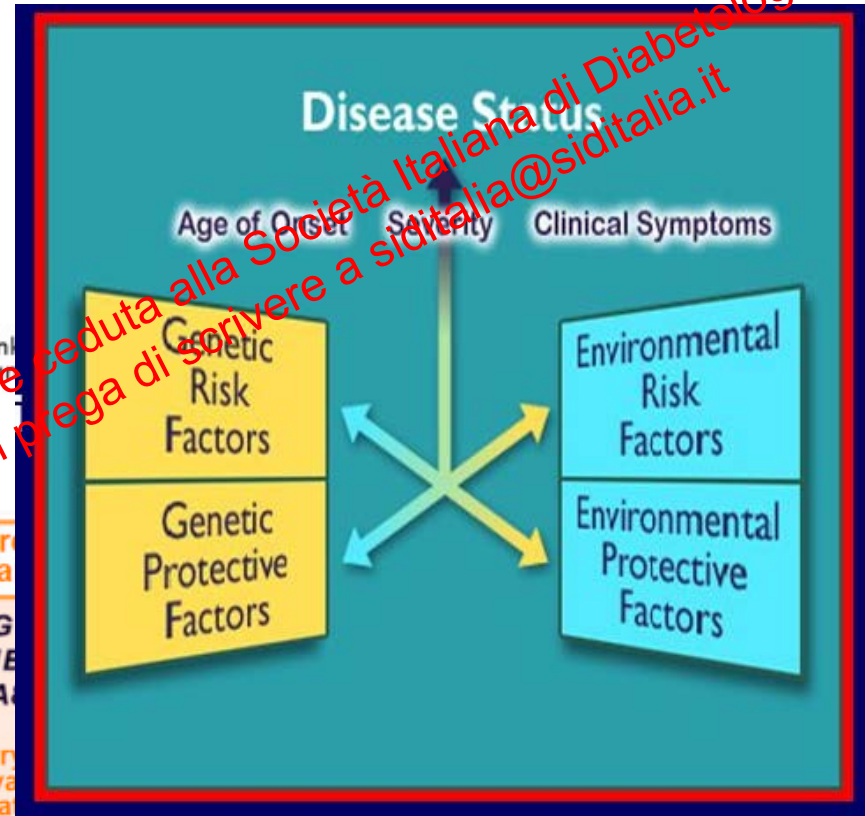
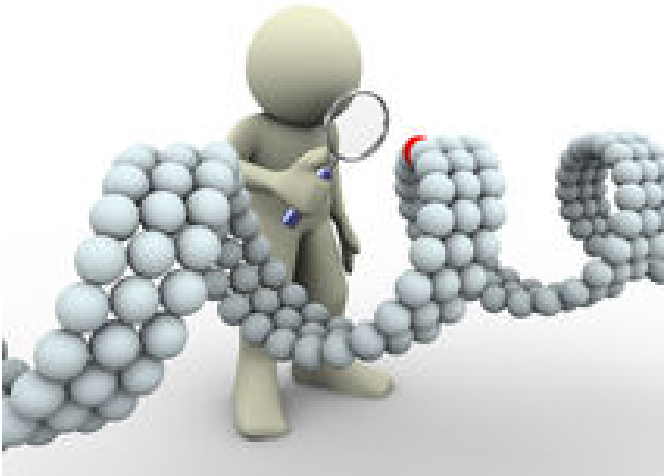
Il dottor Diego Bailetti dichiara
di NON aver ricevuto negli ultimi due anni
finanziamenti da aziende farmaceutiche e/o
diagnostiche

Diapositiva preparata da DIEGO BAILETTI e ceduta alla Società Italiana di Diabetologia.
Per ricevere la versione originale si prega di scrivere a siditalia@siditalia.it

- Diabete di Tipo 2, paradigma della genetica nelle patologie multifattoriali: definizione e spettro
- Approcci Metodologici
 - Famiglie -Linkage
 - Caso / Controllo – Studi di associazione GWAS
- Progetto
 - Razionale, Scopo, Metodi, Risultati e Conclusione

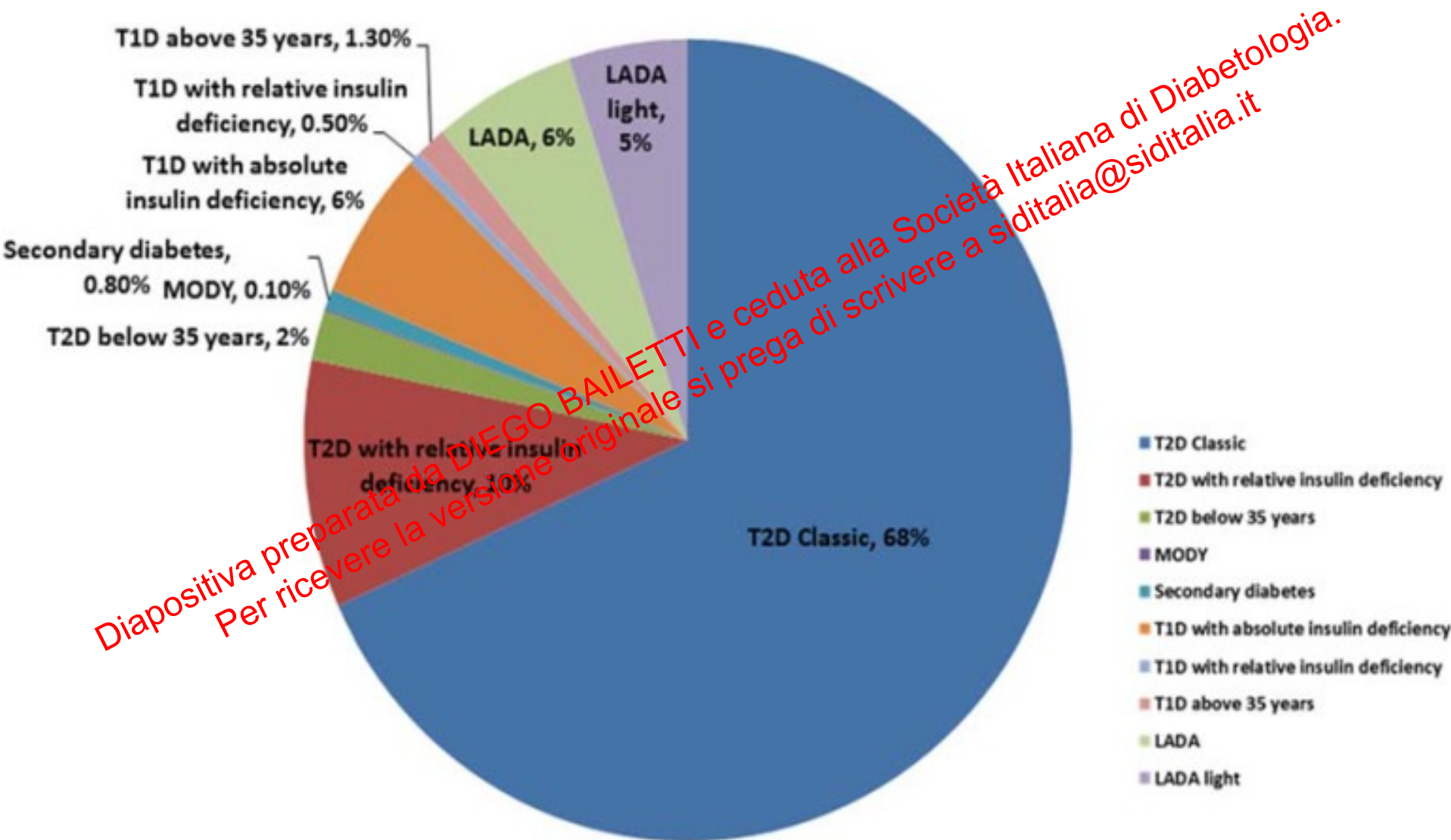
Diapositiva preparata da DIEGO BAILETTI e ceduta alla Società Italiana di Diabetologia.
Per ricevere la versione originale si prega di scrivere a siditalia@siditalia.it

Malattia Multifattoriale

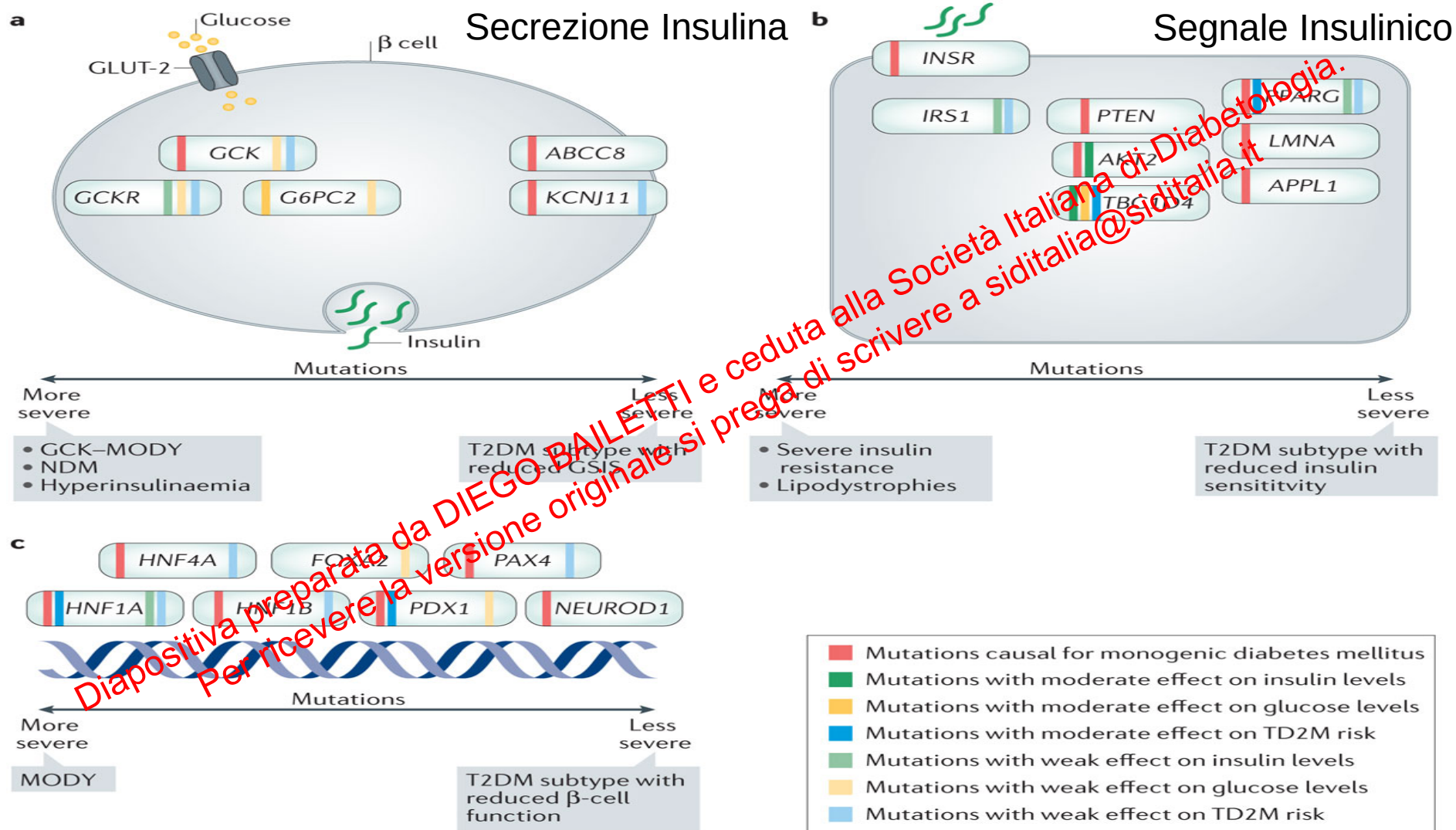


VARIANT FREQUENCY

Diabete Mellito



Spettro Continuo del DM: modello unificato del rischio



Regolazione Trascrizionale b-cell

Flannick, J. et al. (2016) Common and rare forms of diabetes mellitus: towards a continuum of diabetes subtypes
Nat. Rev. Endocrinol.

Ereditarietà del Diabete di Tipo 2

L'ereditarietà stimata per il DT2: 20%-70%

Il rischio di sviluppare DT2 è: 40% con un solo genitore affetto, 70% con entrambi.

Parenti di primo grado hanno 3 volte più probabilità di sviluppare il DT2.

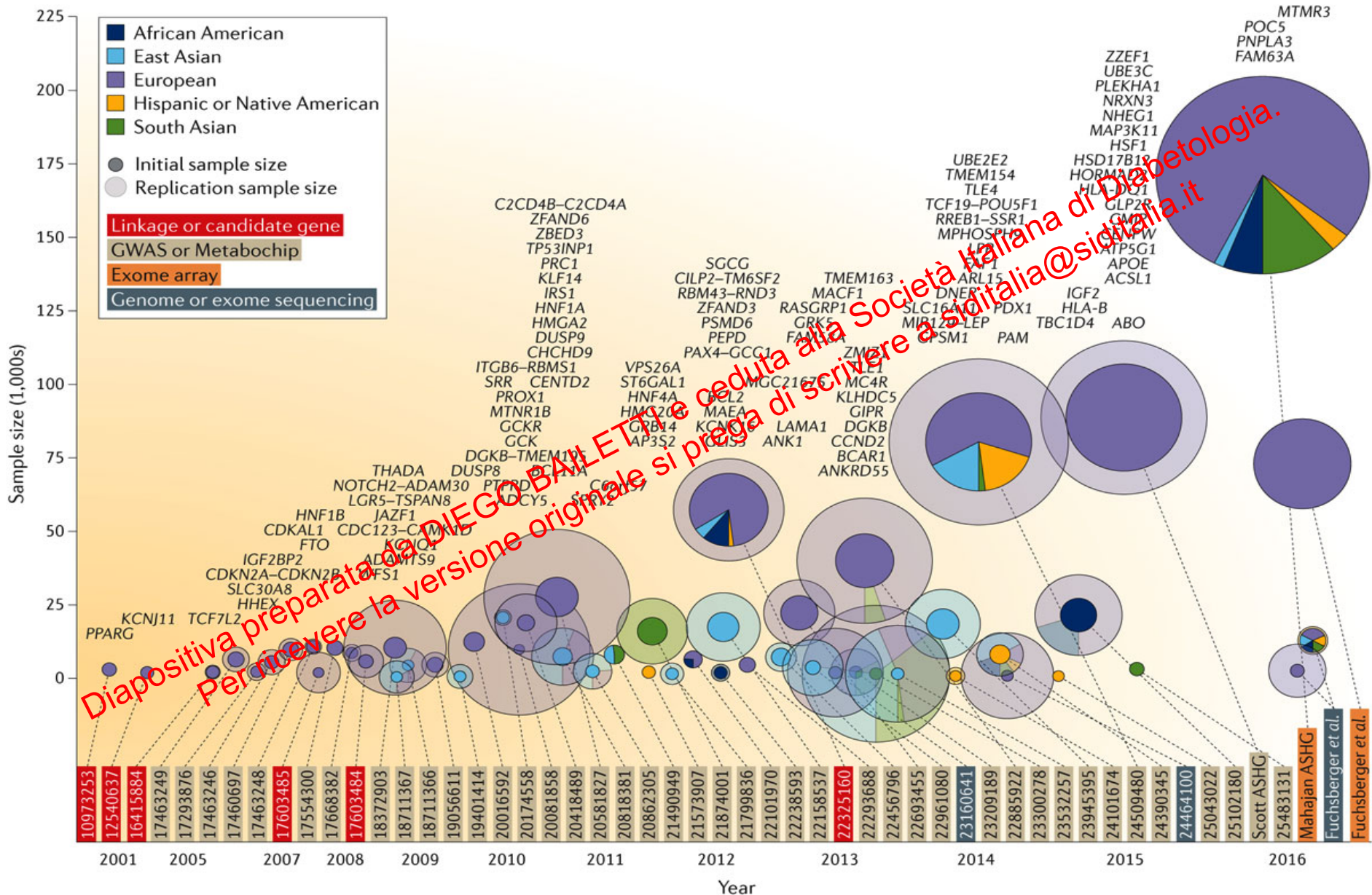
La concordanza nei gemelli monozigoti è 70%, nei dizigoti 20%-30%.

Il rischio aumenta all'abbassarsi dell'età di insorgenza.

Parte dell'ereditarietà osservata potrebbe riflettere l'ereditarietà dei fattori predisponenti (ad es. obesità) o di processi epigenetici;

Fattori neonatali e ambientali condivisi possono modificare l'ereditarietà osservabile.

Avanzamenti nella genetica del DT2



Florez et al. Nature Genetics Reviews 2016

Catalogo studi genetica del DT2

<http://www.type2diabetesgenetics.org>

ACCELERATING MEDICINES PARTNERSHIP (AMP)

Home Variant Finder Data About Policies Resources Contact Collaborate Blog Google Log In



TYPE 2 DIABETES KNOWLEDGE PORTAL

En Español | In English

Providing data and tools to promote understanding and treatment of type 2 diabetes and its complications

Explore data on a gene, variant, or region

examples: SLC30A8 rs13266634 chr9:21,940,000-22,190,000

Variant Finder

filter by p-value, odds ratio, predicted effect on protein, and more

View full genetic association results for a phenotype

learn more about phenotypes in the Portal

About the Portal

The T2D Knowledge Portal enables browsing, searching, and analysis of human genetic information linked to type 2 diabetes and related traits, while protecting the integrity and confidentiality of the underlying data.

22 Datasets, 47 traits

[Browse data here](#)

Citation

Please use the following citation when referring to data accessed via this portal:
T2D-GENES Consortium, GoT2D Consortium, DIAGRAM Consortium.
Year Month Date of access; URL of page you are citing.

What's new

All for one (population) and one for all: Type 2 diabetes (T2D) is a world-wide health problem, but it hits especially hard in... [Read more](#)

[Get email updates](#)



About the project

The Knowledge Portal is being developed by a team of scientists and software engineers at the Broad Institute, the University of Michigan, University of Oxford, and many other collaborators as part of a worldwide scientific consortium with contributors from academia, industry, and non-profit organizations.

We welcome the involvement of interested researchers. Click [here](#) to learn more about contributing data or collaborating with us on analyses, methods, or tool development. Or contact us for more information.

The AMP T2D Consortium is a collaboration among the following organizations, which also provide funding and/or governance:



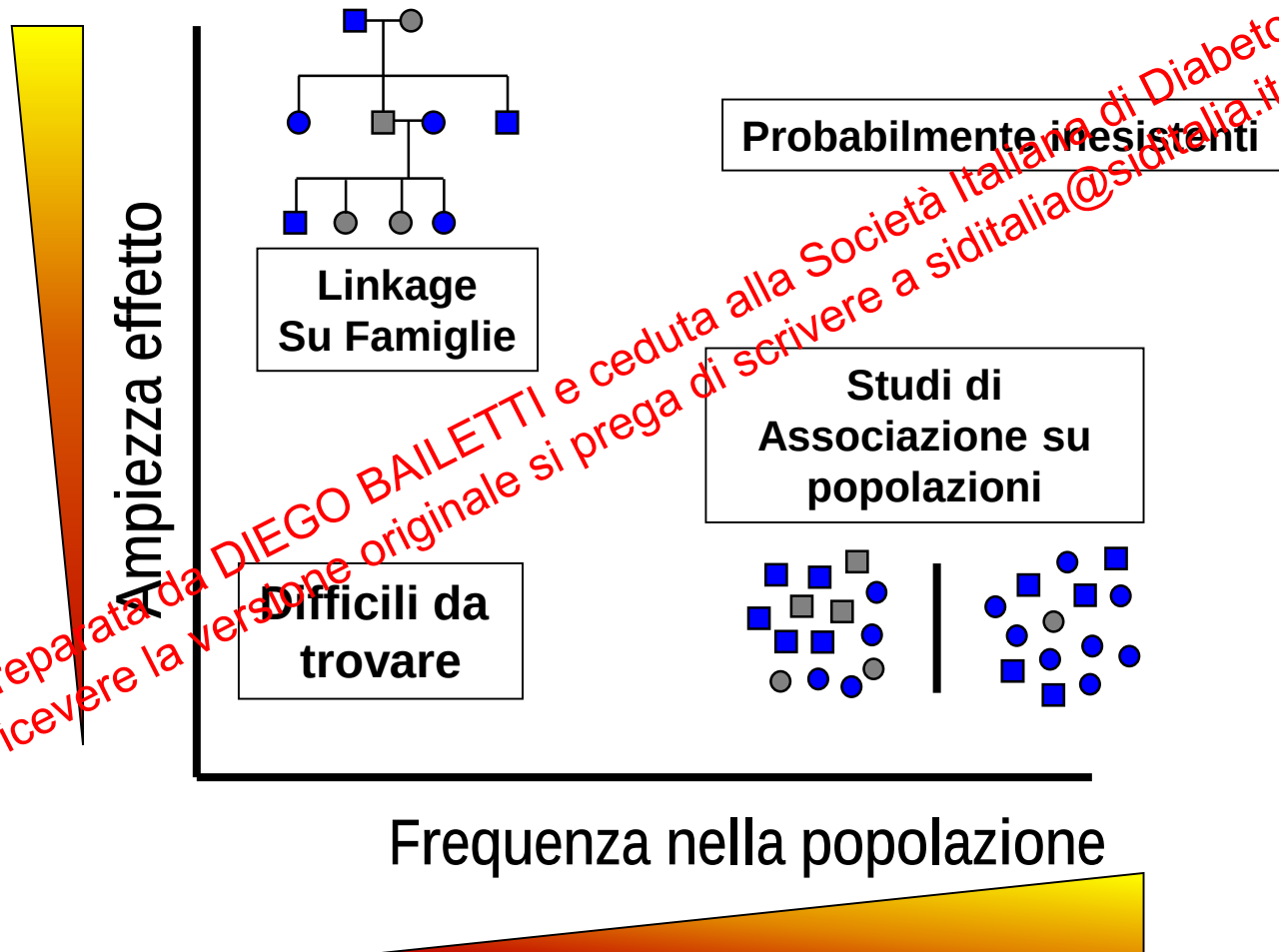
Funding and guidance are also provided by:

FUNDACIÓN
Carlos Slim

[Send feedback](#)

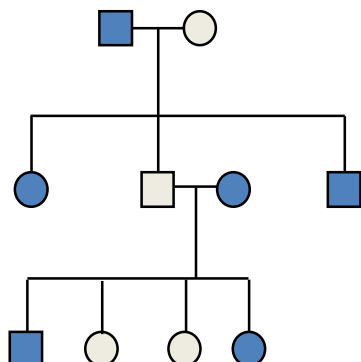
Build on GitHub at [https://github.com/Type2DiabetesGenetics/Type2DiabetesGenetics](#)

Architettura Genetica



Forme Monogeniche di Diabete Mellito

Family-based linkage studies



6q24
EIF2AK3
FOXP3
GATA6
GLIS3
IER3IP1
IL2RA
NEUROG3
NKX2.2
MNX1
PAX6
PTF1A
RFX6
SLC2A2
SLC19A2
WFS1
ZFP57

MT-TE
MT-TK
MT-TL1

NDM

- Age of onset <6 months
- Autosomal dominant or recessive
- β -cell failure

NDM plus organ dysfunction

- Bone
- Blood
- Cardiovascular system
- Central nervous system
- Endocrine system
- Exocrine pancreas
- Eye
- Gastrointestinal system
- Genitalia
- Kidney
- Skin

MODY

- Age of onset 6 months – 35 years
- Autosomal dominant
- β -cell failure

MODY plus organ dysfunction

- Adipose tissue
- Blood
- Cardiovascular system
- Central nervous system
- Exocrine pancreas
- Gastrointestinal system
- Genitalia
- Kidney
- Lung

Mitochondrial diabetes mellitus

- Deafness
- Mitochondrial inheritance

INS

ABCC8

KCNJ11

GCK

NEUROD1

PDX1

APPL1

BLK

HNF1A

HNF4A

KLF11

PAX4

CFTR

HFE

LMNA

PPARG

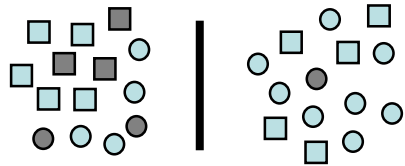
TRMT10A

CEL

HNF1B

Studi di Associazione

Studi di Associazione
su popolazioni



Single nucleotide polymorphism (SNP)

CASES

CONTROLS

Frequency
Comparison

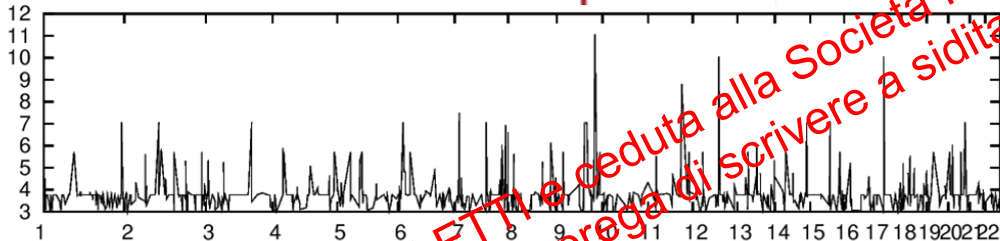
Relative Risk
(Odds Ratio)

Diapositiva preparata da DIEGO BAILETTI e ceduta alla Società Italiana di Diabetologia.
Per ricevere la versione originale si prega di scrivere a siditalia@siditalia.it

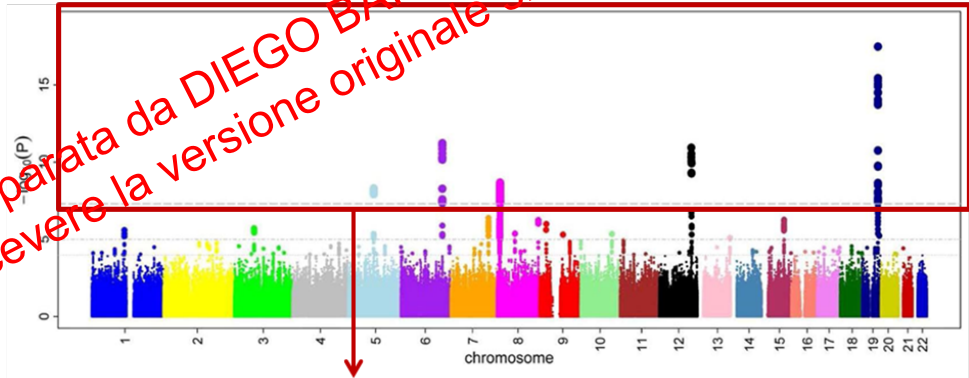
Genome-Wide Association Studies (GWAS)

GWAS: Studi Associazione Caso/Controllo sull'Intero Genoma

Esaminare l'intero Genoma
500,000 SNPs noti



Identificano regioni di interesse (loci) tramite SNPs con $p < 10^{-8}$

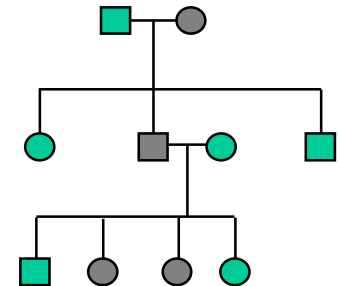


Confronto della frequenza di un polimorfismo tra un gruppo di casi e di controlli

Limiti degli Studi per Gene Candidato

- Selezione basata sulle attuali conoscenze, spesso incomplete.
- Strategia spesso focalizzata sulle regioni codificanti, trascurando le regioni regolatorie.
- Associazioni con varianti negli elementi regolatori posti a distanza dalla regione codificante possono sfuggire.
- I risultati non possono essere contestualizzati in una prospettiva genomica (quanto è importante un certo effetto genetico rispetto agli altri?)

Family-based linkage studies



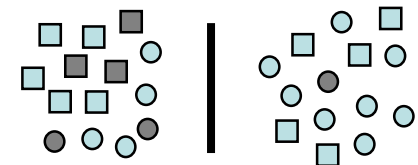
Limiti degli Studi di GWAS

- Focalizzati su **Varianti Comuni** ($>5\%$ MAF) sparse su tutto il genoma: **evidenza *loci* o clusters** genici.

Possibile confondenti: Linkage, Regioni Regolatorie e Clusters.

- Associazione rileva spesso tag-SNPs in linkage con la variante causale piuttosto che la variante causale stessa.
- Sfuggono varianti rare o dall'effetto blando (statistica).
- Genetic Risk Score (GRS) insufficiente.
- Eterogeneità genetica: differenti meccanismi genetici e frequenze alleliche nelle differenti popolazioni
- Errori legati alla metodica (Coverage, QC, potere statistico).
- Incorrettezze nel disegno o nell'analisi:
 - Fenotipi scarsamente definiti o differenze intrinseche tra casi e controlli
 - Errori nella correzione per analisi di sotto-gruppi e comparazioni multiple.
 - Numero di soggetti
 - Mancata replicazione

Studi di Associazione
su popolazioni



Genetica del Diabete

Forme Monogeniche

Neonatal diabetes	MODY / Familial early-onset diabetes	
	<u>ABCC8</u>	<u>MODY-12</u>
	<u>GCK</u>	<u>MODY-2</u>
	<u>INS</u>	<u>MODY-10</u>
	<u>KCNJ11</u>	<u>MODY-13</u>
	<u>NEUROD1</u>	<u>MODY-6</u>
	<u>PDX1*</u>	<u>MODY-4</u>
	<u>WFS1</u>	
	<u>FOXP3</u>	<u>BLK</u> <u>MODY-11</u>
	<u>GATA6</u>	<u>CEL</u> <u>MODY-8</u>
	<u>GATA4</u>	<u>HNF1A</u> <u>MODY-3</u>
	<u>GLIS3</u>	<u>HNF1B</u> <u>MODY-5</u>
	<u>IER3IP1</u>	<u>HNF4A</u> <u>MODY-1</u>
	<u>MNX1</u>	<u>KLF11</u> <u>MODY-7</u>
	<u>NEUROG3</u>	<u>PAX4</u> <u>MODY-9</u>
	<u>NKX2-2**</u>	<u>PCBD1</u>
	<u>PTF1A</u>	<u>TRMT10A</u>
	<u>RFX6</u>	
	<u>SLC2A2</u>	
	<u>SLC19A2</u>	

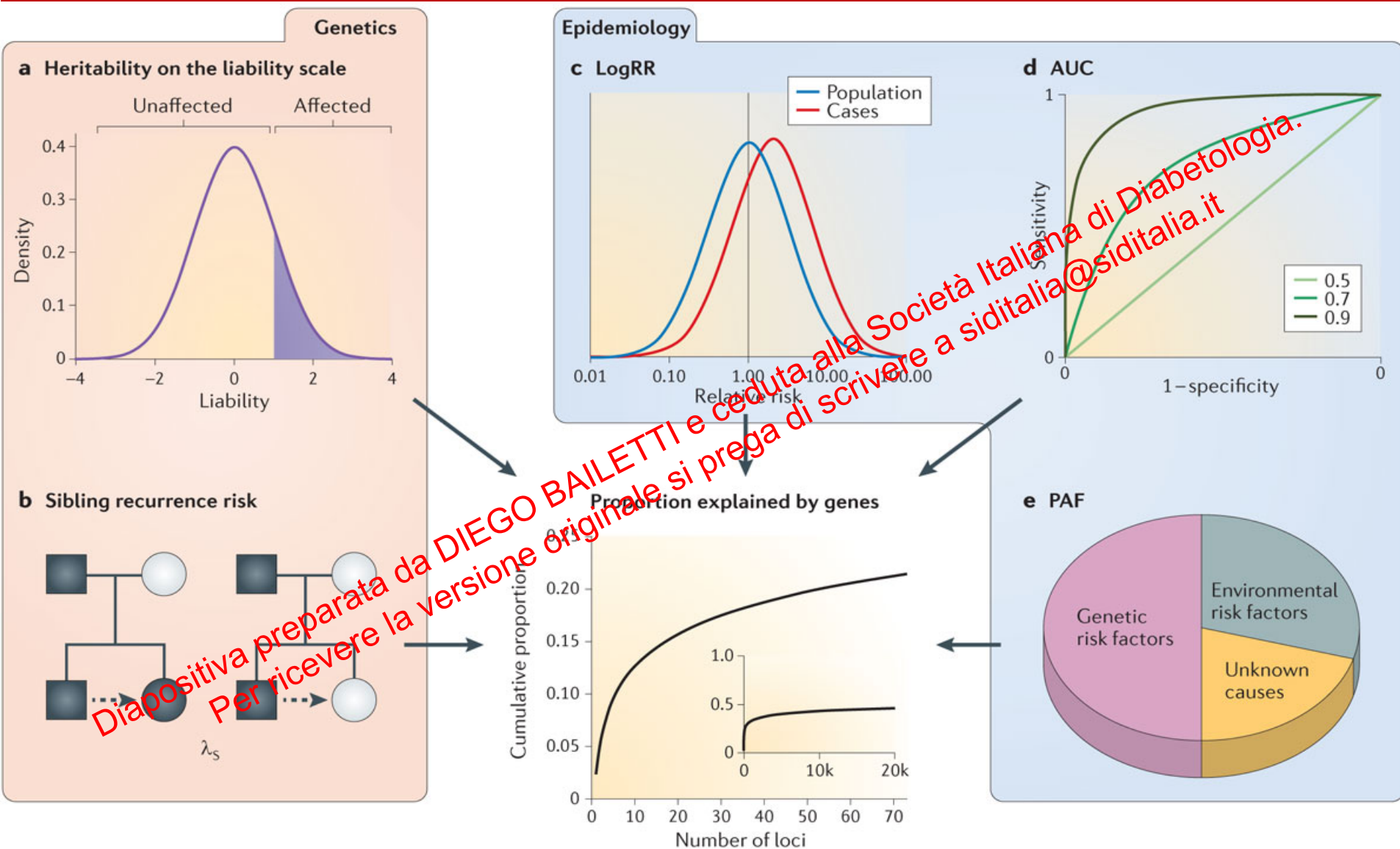
Geni associati a DT2

Insulin secretion / beta cell or islet function				Unknown				Insulin resistance			
<u>HNF4A</u>	CE	<u>KCNQ1</u>	EA	<u>ADAMTS9</u>	CE	<u>RND / RBM43</u>	AA	<u>ANK1</u>	CE	<u>IRS1</u>	CE
<u>TCF7L2</u>	CE	<u>MAEA</u>	EA	<u>AP3S2</u>	SA	<u>SGCG</u>	SA	<u>BCAR1</u>	CE	<u>PPARG</u>	CE
<u>GCK</u>	CE	<u>PAX4</u>	EA	<u>CHCHD2P9</u>	CE	<u>SPRY2</u>	EA	<u>CCND2</u>	CE	<u>FTO</u>	CE
<u>HNF1B</u>	CE	<u>SLC30A8</u>	CE	<u>DNER</u>	SA	<u>SRR</u>	EA	<u>SLC12A2</u>	CE	<u>GRB14</u>	SA
<u>KCNJ11</u>	CE	<u>THADA</u>	CE	<u>FITM2 / R3HDM1</u>	EA	<u>TM6AL1</u>	CE	<u>KLHDC5</u>	CE	<u>HMGA2</u>	CE
<u>WFS1</u>	CE	<u>UBE2E2</u>	EA	<u>GCC1</u>	EA	<u>TLE1</u>	CE	<u>TLE1</u>	CE	<u>KLF14</u>	CE
<u>ARAP1</u>	CE	<u>VPS26A</u>	SA	<u>GRIK5</u>	EA	<u>TMEM163</u>	SA	<u>ZMIZ1</u>	CE	<u>PEPD</u>	EA
<u>BCL11A</u>	CE	<u>ZBED3</u>	CE	<u>HMG20A</u>	SA	<u>TP53INP1</u>	CE	<u>COBLL1</u>	CE	<u>RBMS1</u>	CE
<u>C2CD4A / C2CD4B</u>	EA	<u>ZFAND3</u>	EA	<u>JAZF1</u>	CE	<u>TSPAN8 / LGR5</u>	CE	<u>MACF1</u>	CE	<u>ARL15</u>	TA
<u>CDC123 / CAMK1D</u>	CE	<u>GPSM1</u>	EA	<u>KCNK16</u>	EA	<u>ZFAND6</u>	CE			<u>LEP</u>	EA
<u>CDKAL1</u>	CE	<u>IPF1</u>	TA	<u>LAMA1</u>	CE	<u>FAF1</u>	TA			<u>SLC16A11</u>	M
<u>GCK2AB</u>	CE	<u>SSR1 / RREB1</u>	TA	<u>MOB2</u>	CE	<u>HLA-B</u>	AA			<u>GCKR</u>	CE
<u>DUSP6</u>	CE	<u>ADCY5</u>	CE	<u>NOTCH2</u>	CE	<u>IGF2</u>	AA			<u>ANKRD55</u>	CE
<u>GLIS3</u>	EA	<u>DGKB</u>	CE	<u>PRC1</u>	CE	<u>MPHOSPH9</u>	TA			<u>MC4R</u>	CE
<u>HHEX / IDE</u>	CE	<u>MTNR1B</u>	CE	<u>PSMD6</u>	EA	<u>POU5F1 / TCF19</u>	TA			<u>TBC1D4</u>	G
<u>HNF1A</u>	CE	<u>PROX1</u>	CE	<u>PTPRD</u>	EA	<u>SLC16A13</u>	EA				
<u>IGF2BP2</u>	CE	<u>GIPR</u>	CE	<u>RASGRP1</u>	EA	<u>TMEM154</u>	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

Missing Heritability

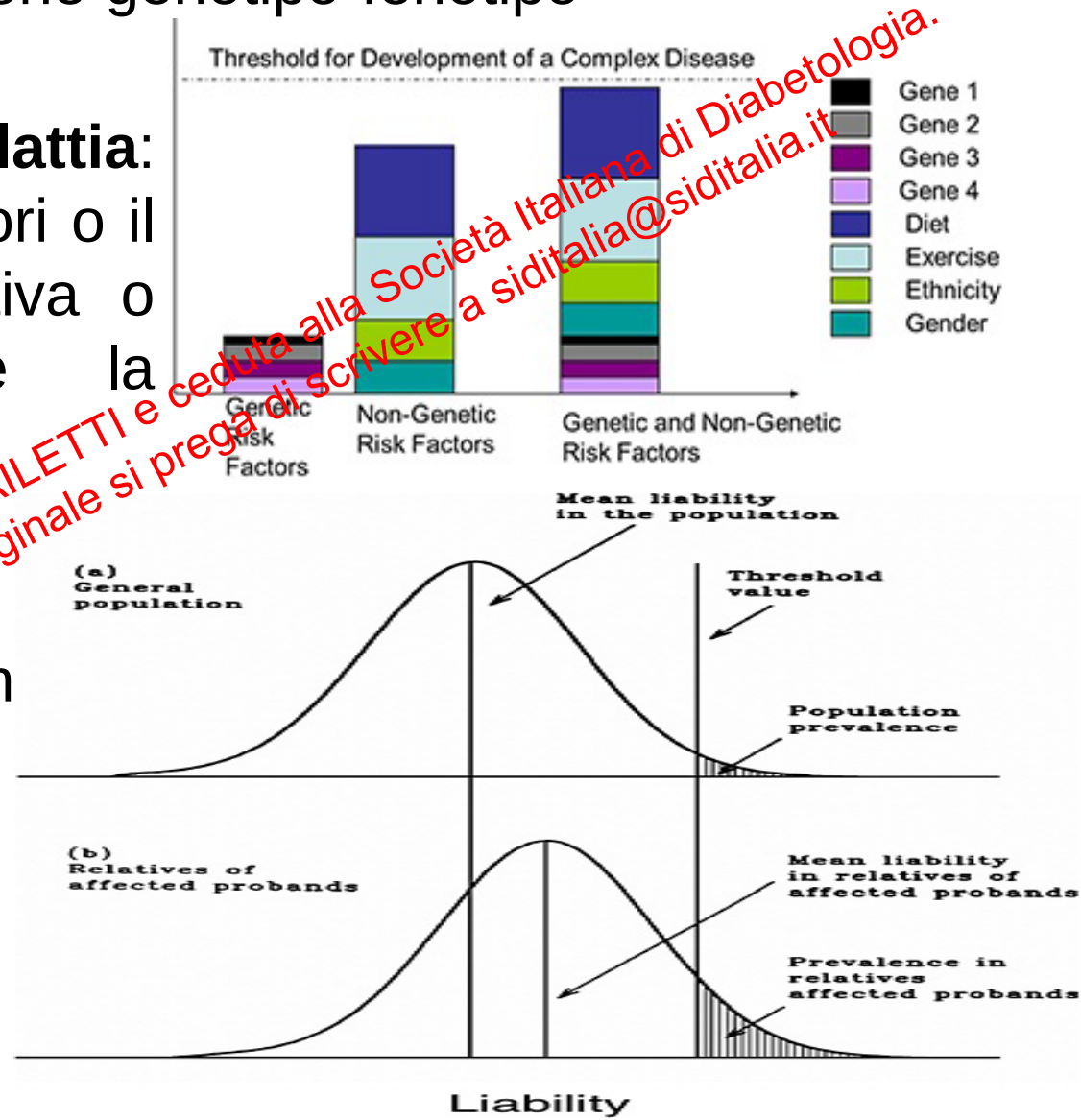


Malattie Multifattoriali

Modello soglia per descrivere l'eredità: Correlazione genotipo-fenotipo

Manifestazione Malattia:
quando il **numero** dei fattori o il
tipo di interazione (additiva o
moltiplicativa) raggiunge la
soglia critica.

Ogni fattore coinvolto ha un
basso effetto fenotipico



Razionale dello Studio

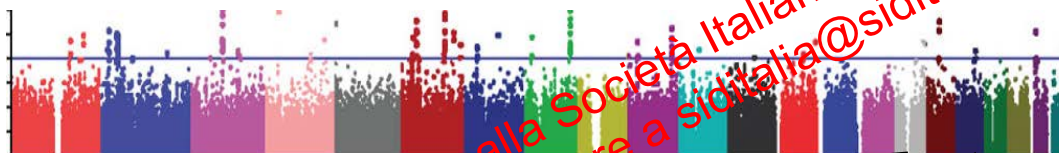
Gli Studi di Associazione Caso-Controllo sull'intero genoma (GWAS) hanno dei limiti

Insulin secretion / beta cell or islet function			
HNF4A	CE	KCNQ1	EA
TCF7L2	CE	MAEA	EA
GCK	CE	PAX4	EA
HNF1B	CE	SLC30A8	CE
KCNJ11	CE	THADA	CE
WFS1	CE	UBE2E2	EA
ARAP1	CE	VPS26A	SA
BCL11A	CE	ZBED3	CE
C2CD4A / C2CD4B	EA	ZFAND3	EA
CDC123 / CAMK1D	CE	GPSM1	EA
CDKAL1	CE	LPP	TA
CDKN2A/B	CE	SSR1 / RREB1	TA
DUSP9	CE	ADCY5	CE
GLIS3	EA	DGKB	CE
HHEX / IDE	CE	MTNR1B	CE
HNF1A	CE	PROX1	CE
IGF2BP2	CE	GIPR	CE

Manhattan Plot

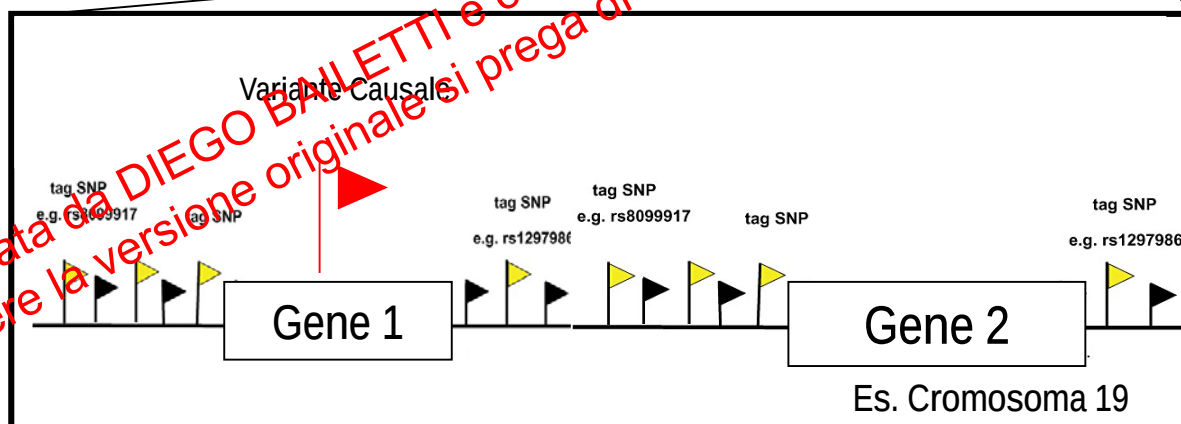
GWAS chip with sample (tag) SNP

GWAS chip with sample (tag) SNP



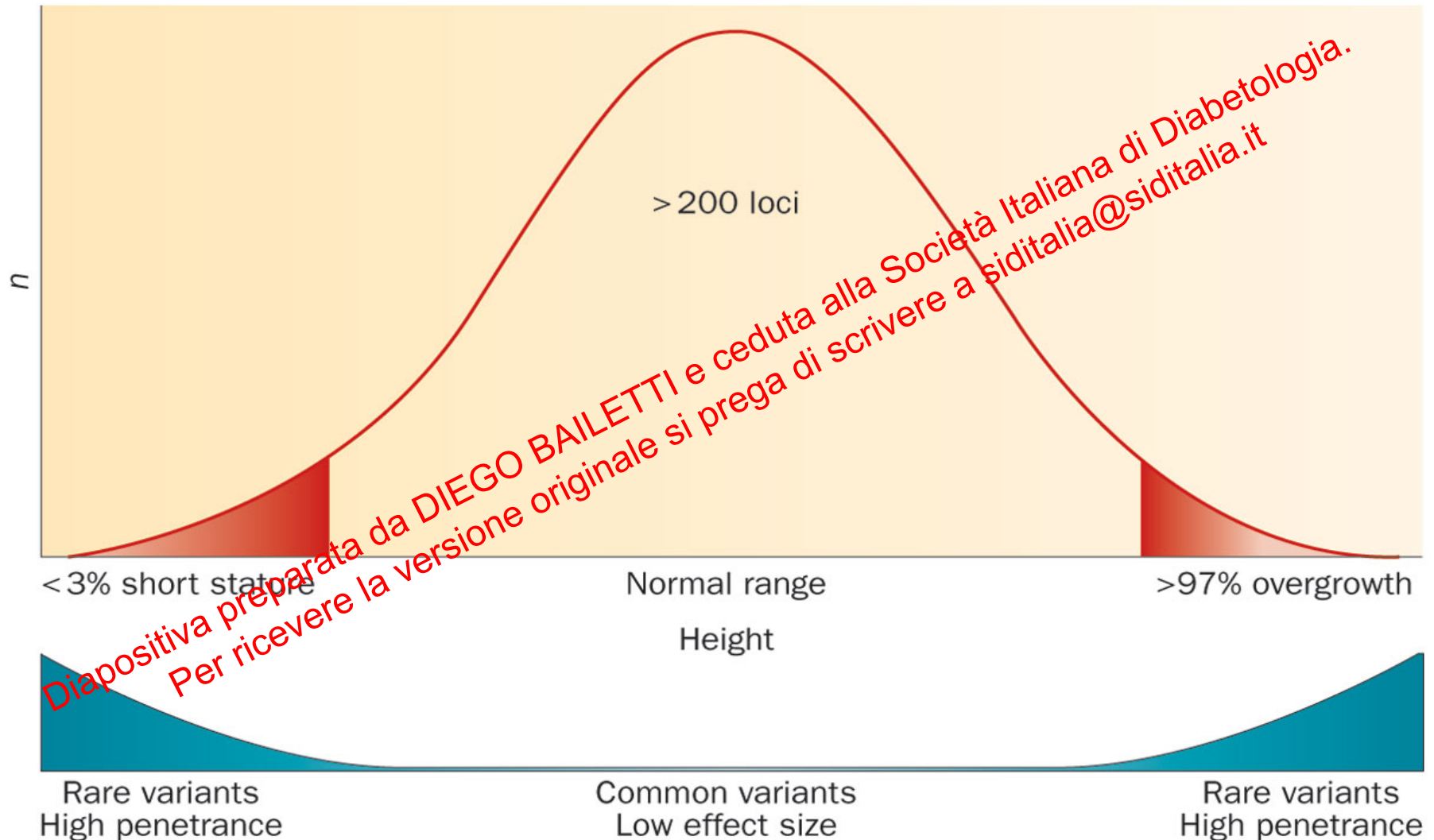
Cromosomi

Variante Causale



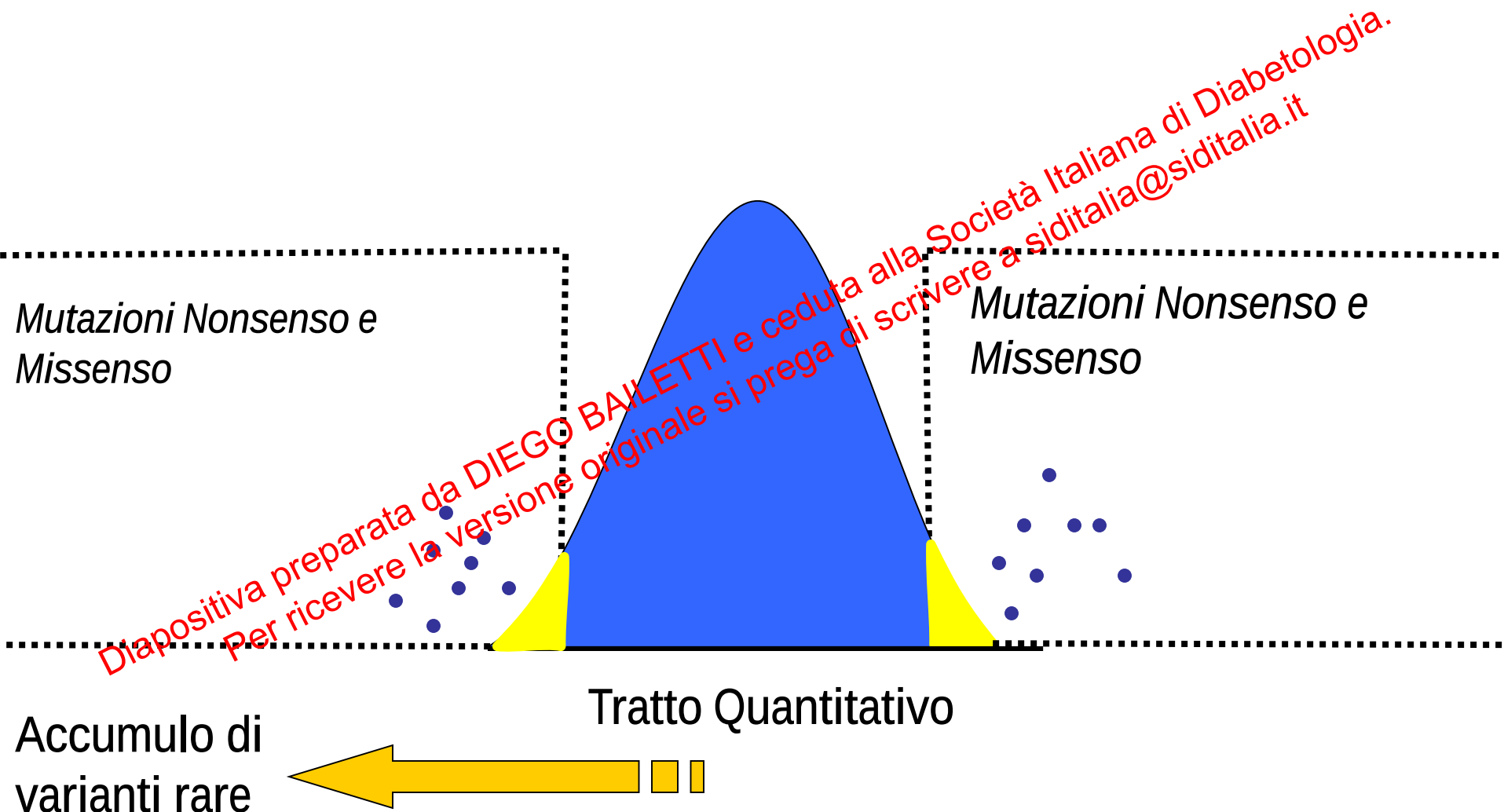
La conferma definitiva delle associazioni genetiche può derivare solo dal sequenziamento dei geni o di un cluster di geni segnalati come fortemente associati.

Distribuzione delle varianti rare e comuni sulla curva della distribuzione normale

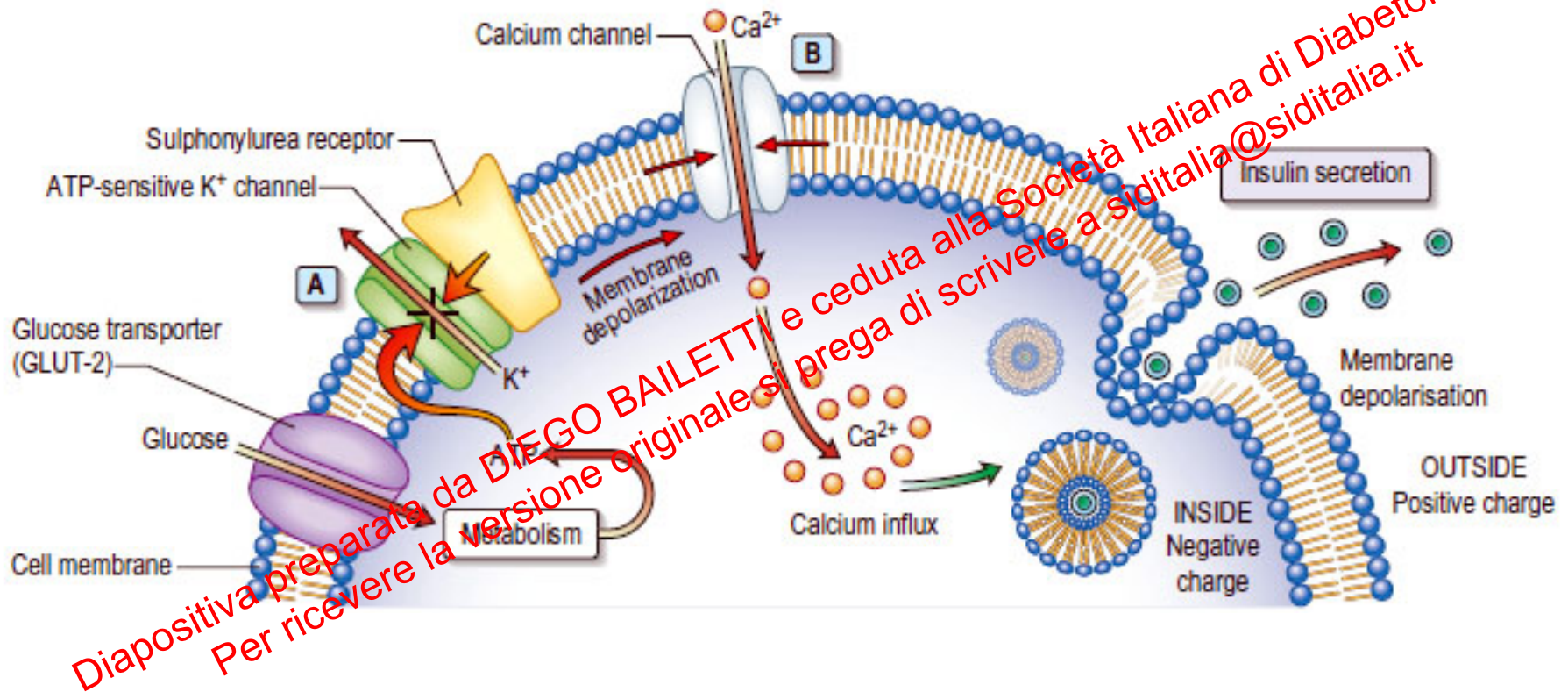


Durand, C. & Rappold, G. A. (2013) Height matters—from monogenic disorders to normal variation
Nat. Rev. Endocrinol. doi:10.1038/nrendo.2012.251

Comparazione degli estremi di un fenotipo



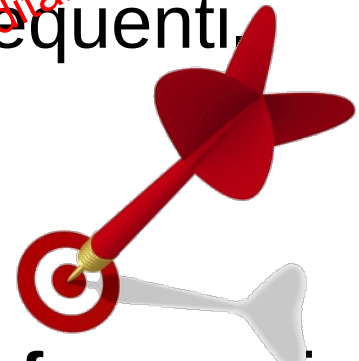
Secrezione Insulinica



Il metabolismo del Glucosio genera aumento di **ATP**. L'alta concentrazione di ATP innesca l'**inibizione** dei canali **K⁺ ATP-dipendenti**. Il blocco dell'efflusso di ioni K⁺ depolarizza la membrana **attivando** i canali **Ca²⁺ voltaggio-dipendenti**. L'influsso di Ca²⁺ induce la liberazione delle vescicole contenenti **Insulina**

Ri-sequenziamento mirato di *loci* associati da **GWAS** ($p < 10^{-8}$) alla **secrezione insulinica**, in un campione selezionato dagli **estremi** del tratto misurato tramite **Disposition Index**, alla ricerca di varianti infrequenti.

- caratterizzare l'**arricchimento di varianti infrequenti, non-sinonime** necessario per chiarire il ruolo dei **geni selezionati**
- valutare il **singolo contributo delle varianti** e il loro **effetto cumulativo** nei casi rispetto ai controlli.



Diapositiva preparata da DIEGO BAILETTI e ceduta alla Società Italiana di Diabetologia.
Per ricevere la versione originale si prega di scrivere a siditalia@siditalia.it

Studi di Associazione di Varianti Infrequenti

Ri-sequenziamento **NGS** nei quintili **estremi** del **Disposition Index (DI)**

Fase 1 – NGS regioni codificanti in 383 pazienti selezionati dai quintili estremi del DI.

Fase 2 – conferma varianti su ulteriore campione (n=384) selezionato da casistica neo-reclutata di ca. 1000 soggetti

Fase 3 – validazione e conferma associazione delle varianti infrequenti precedentemente evidenziate con tratti fenotipici in esame mediante genotipizzazione su tutti i soggetti restanti.

Study Population

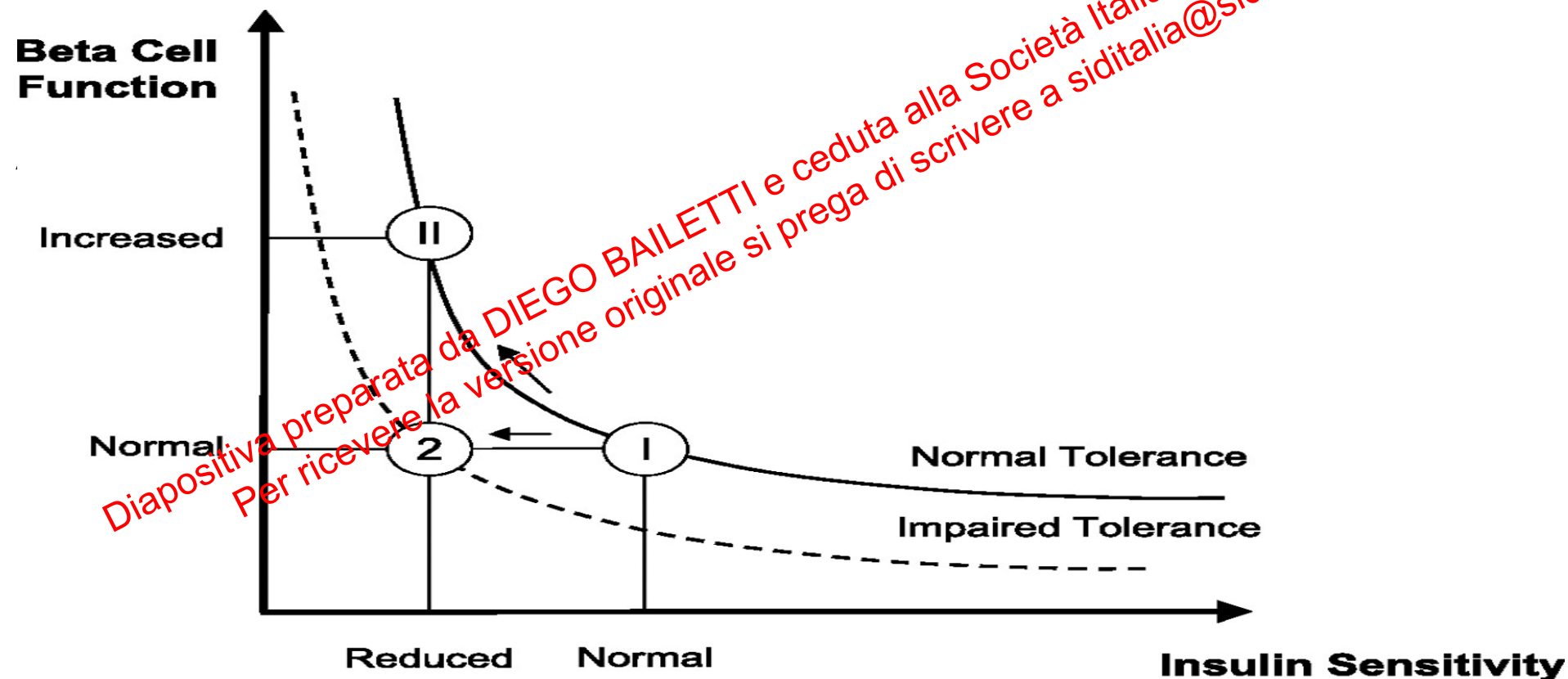
Pazienti afferenti presso il Policlinico Umberto I (n=2200) sottoposti al **OGTT** e valutazione delle principali caratteristiche cliniche ed antropometriche, compresi indici di secrezione e sensibilità insulinica.

Campione esplorativo per il sequenziamento (n=**383**) selezionato dai **quintili estremi** della distribuzione del **DI**.

In corso reclutamento ulteriore casistica di ca. 1000 soggetti da cui selezionare un secondo campione esplorativo (n=384)

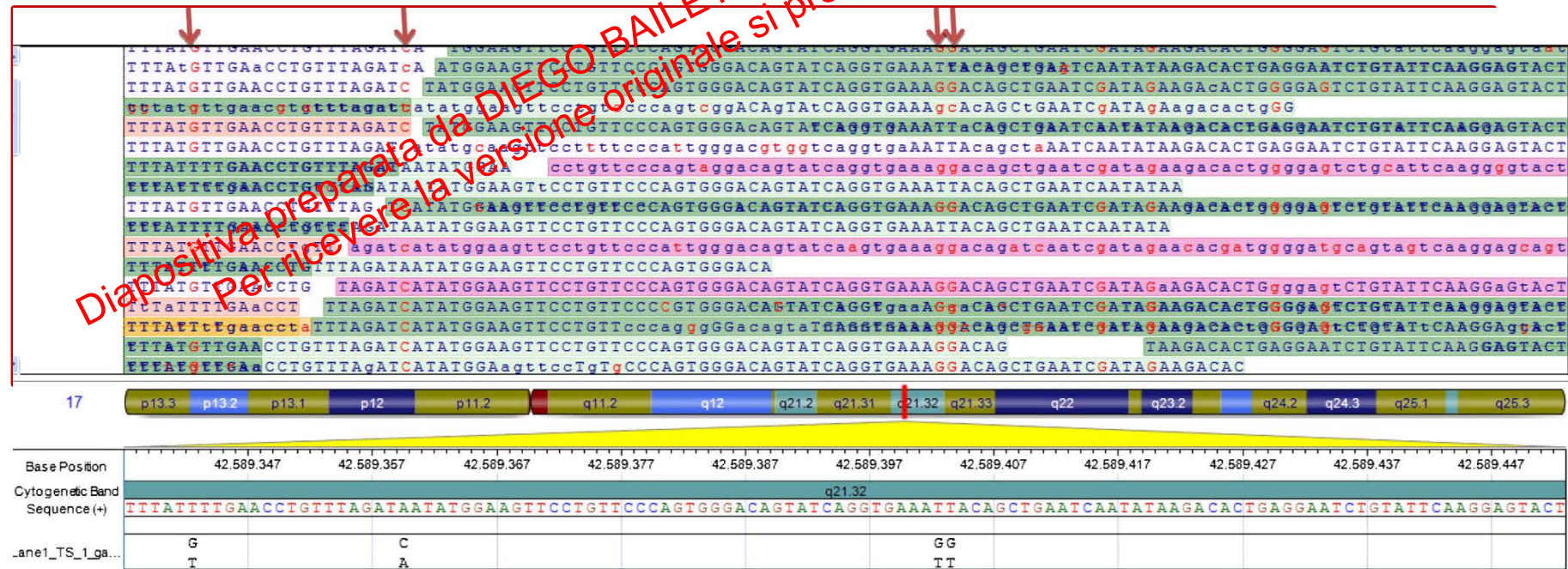
Disposition Index

Indice di Insulino-Secrezione corretto per l'Insulino-Resistenza

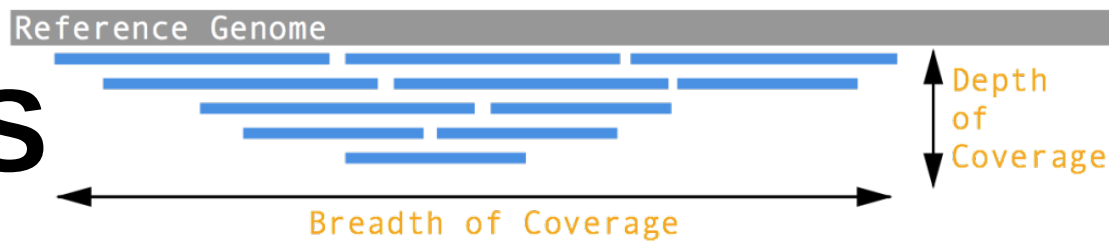


Materiali e Metodi

- Analisi dati NGS: Chiamata della Base (Base calling), Allineamento (Read Mapping), Chiamata della Variante (Variant Calling), Annotazioni (Variant Annotation), Filtraggio (Variant Filtering-dbSNP, 1000 Genome, 5000 Genome, EXAC, ESP, wAnnovar, CRAVAT) e Predizione (Polyphen, SIFT, Mutation Taster, Mutation Assessor, SNP&Go, CADD, LRT)



Glossario NGS



- **Reads:** lettura dei nucleotidi
- **Coverage:** % di copertura del target di interesse
- **Depth Coverage:** numero di volte in cui una base del tuo target viene letta in maniera indipendente. Indicata con una X: ex. 300X coverage depth
- **Breadth Coverage:** % del genoma sequenziato all'1X. Indicata con %: ex. 80% coverage breadth
- **Quality score (Phred score):** è una misura della qualità con cui viene chiamato un nucleotide in una data posizione (si traduce nella percentuale di errore).

Phred Quality Score	Probability of incorrect base call	Base call accuracy
10	1 in 10	90%
20	1 in 100	99%
30	1 in 1000	99.9%
40	1 in 10,000	99.99%
50	1 in 100,000	99.999%
60	1 in 1,000,000	99.9999%

Workflow NGS

MiSeq **Illumina**

Preparazione Pannello

- Geni d'interesse
- Disegno Sonde
- Ottimizzazione

Selezione Campioni

- Selezione Estremi
- Estrazione DNA
- Valutazione quantità e qualità DNA

Preparazione Librerie

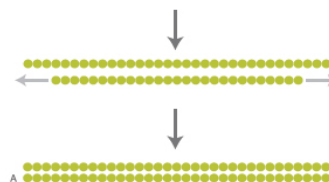
- Ampliconi da PCR
- Aggiunta Barcode e Adattatori

A

B

C

D



Materiale di partenza
DNA/RNA

Preparazione Libreria

A Fragment DNA

B Repair ends
Add A overhang

C Ligate adapters

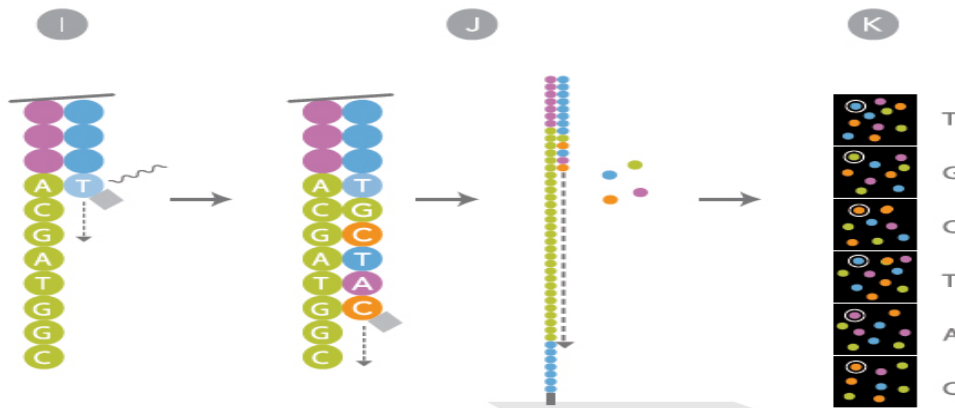
D Select ligated DNA

Frammenti amplificati per PCR (AMPLICONI)

Aggiunta adattatori + Barcodes (multiplexing)

Diapositiva preparata da DIEGO BAILETTI e ceduta alla Società Italiana di Diabetologia.
Per ricevere la versione originale si prega di scrivere a siditalia@siditalia.it

Workflow NGS



- I** Extend first base, read, and deblock
- J** Repeat step to move to extend strand
- K** Generate base calls

MiSeq Illumina

Preparazione Templato

Sequenziamento

Analisi Dati

Amplificazione clonale
(Bridge Amplification)

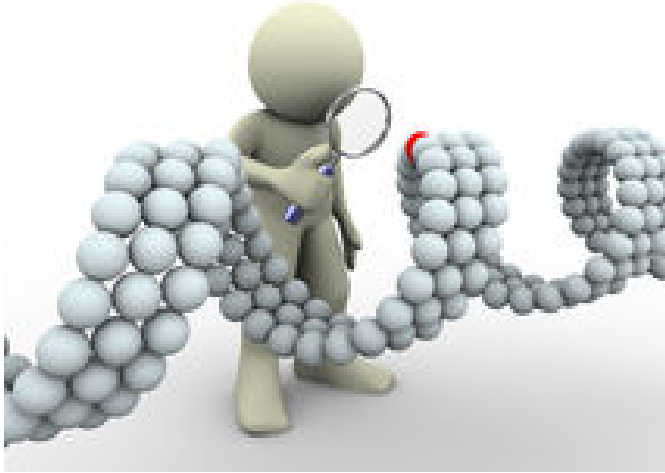
Sequenziamento e acquisizione delle immagini
e/o dati

Analisi 1° : De-Multiplexing / Base Calling

Analisi 2° : Allineamento con sequenza di
riferimento / Quality Assessment

Analisi 3° : Variant Calling, identificazione varianti
geniche e Annotazione

Risultati



Diapositiva preparata da DIEGO BAILETTI e ceduta alla Società Italiana di Diabetologia.
Per ricevere la versione originale si prega di scrivere a siditalia@siditalia.it

```
@RR000615.149 HWUSI-EAS505:1:1:15:14 length=51
+AAAGGCACAACGTTTCTCTCAAGGGCCANNNTNNNNNTNNNNNNN
+RR000615.149 HWUSI-EAS505:1:1:15:14 length=51
95?A/3@C@CC@A+ABCCBCCCC@#####!!!!!!#!!!!!!#!!!!!!
@RR000615.1395 HWUSI-EAS505:1:1:123:13 length=51
CGACGACTGCCCGTGAGCGTGTCTAGTCCGNNNNNNNNNNNGNNNNNNN
+RR000615.1395 HWUSI-EAS505:1:1:123:13 length=51
@B(92.(==9>2@=@#####!!!!!!#!!!!!!
@RR000615.3018 HWUSI-EAS505:1:1:221:15 length=51
TAGGAACACTTTCTCATTATTCTGCCTATCANNNNNNNNNCNNNNNNN
+RR000615.3018 HWUSI-EAS505:1:1:221:15 length=51
7AA5->=9@75CA3>BB6BB;BA9;;5=#####!
@RR000615.3018 HWUSI-EAS505:1:1:221:13 length=51
GTAAAGTTCATCCNNNNNNNNNNNNNNNGNNNNNNN
+RR000615.3021 HWUSI-EAS505:1:1:221:13 length=51
:,B*?4?3;BBB@A@BCCBCB#####!!!!!!#!!!!!!
```

sequence data

1 read data

Esempio File FastQ

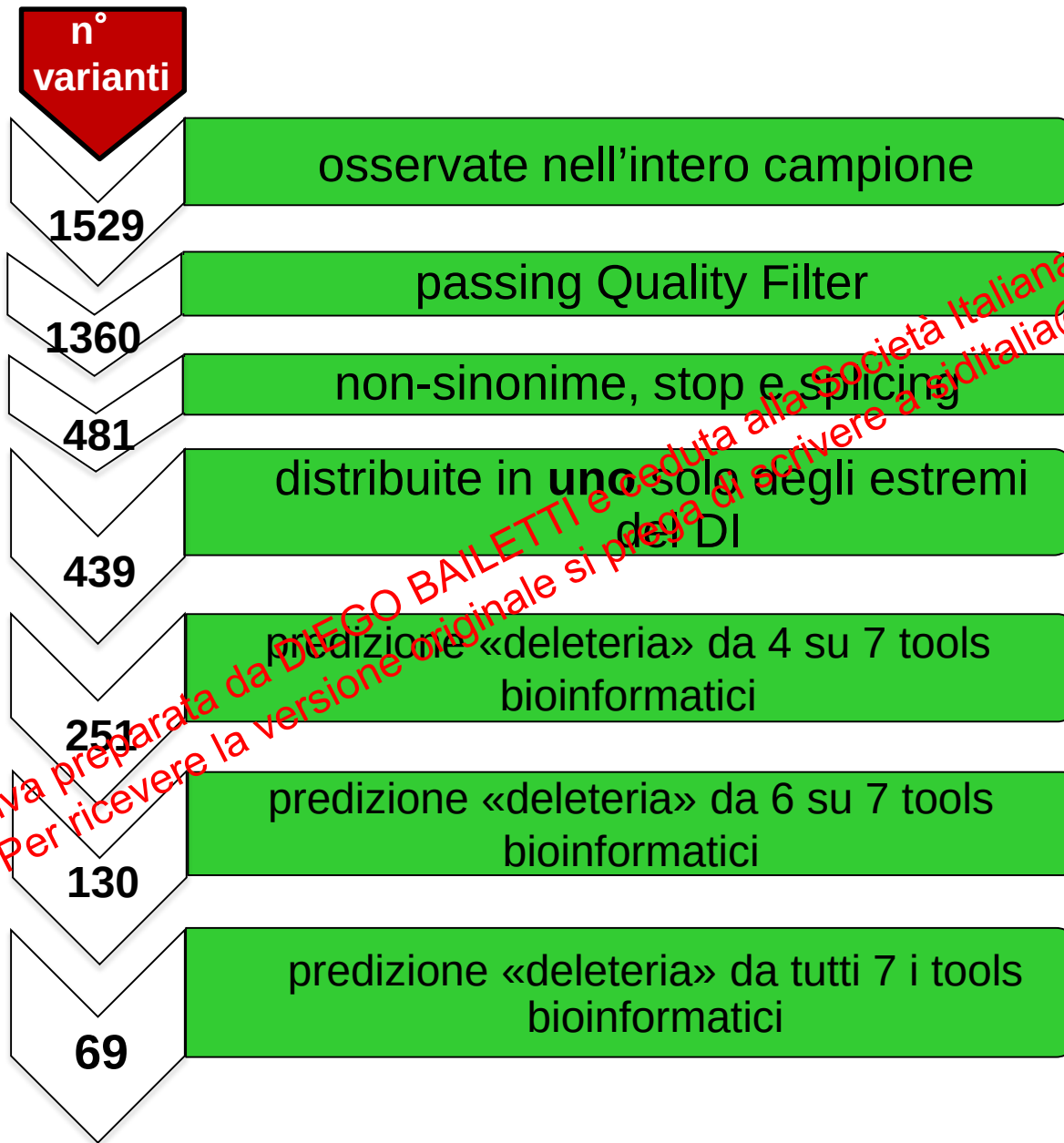
Principali caratteristiche cliniche del campione esplorativo (n=383)

	20% DI	80% DI	P
N	186	197	
GENDER	62 M 124 F	49 M 148 F	0.054
AGE	43.8	35.7	<0.0001
B.M.I.	43.6	37.1	<0.0001
ISI_M	2.1	5.1	<0.0001
IGI30	0.2	3.1	<0.0001
CIR30	0.43	2.2	<0.0001
DI	10.55	10.87	<0.0001
DI (CIR30*ISI)	0.48	8.00	<0.0001
DIAGNOSIS ADA			
NGT	63	181	$6 \cdot 10^{-30}$
IFG	26	7	
IGT	16	7	
IFG+IGT	39	3	
DM	41	0	

N: Number;
 CIR: corrected
 insulin response;
 P: p-value of
 comparison
 NGT: Normal
 Glucose Tolerance;
 IFG: Impaired
 Fasting Glucose;
 IGT: Impaired
 Glucose Tolerance;
 DM: Diabetes
 Mellitus.

Diapositiva preparata da DIEGO BAILETTI e ceduta alla Società Italiana di Diabetologia.
 Per ricevere la versione originale si prega di scrivere a siditalia@siditalia.it

Strategia di Filtraggio

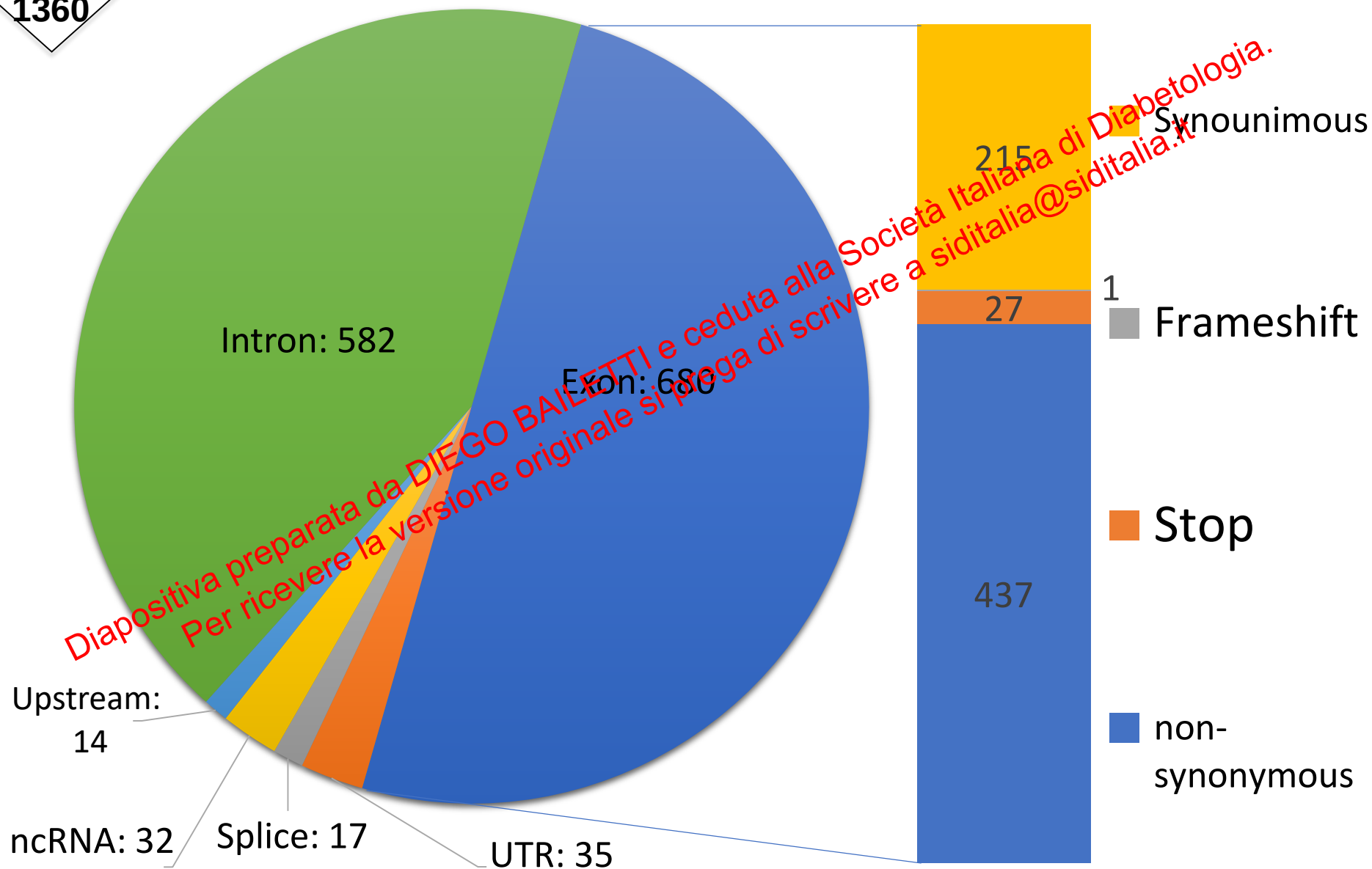


Diapositiva preparata da DEGO BAILETTI e ceduta alla Società Italiana di Diabetologia.
Per ricevere la versione originale si prega di scrivere a siditalia@siditalia.it

Localizzazione delle varianti QC (n=1360)

N=1360
passing Quality Filter

Esoniche



Distribuzione delle varianti “deleterie” e dei loro portatori nel campione di esplorazione

N=
69

predicted to be deleterious by all 7 bioinformatics tools

	SUM variants		Subjects mutated		χ^2	p	odd ratio
	20%	80%	20% n= 186	80% n=197			
TOT	43	28	36	23	4.33	0.037	1.815
ADAMTS9	14	7	6	1	1.30	0.255	1.809
ADCY5	9	2	8	2	4.06	0.044	4.382
IGF2BP2	0	2	0	2	1.90	0.168	n.c.
CDKAL1	0	2	0	2	1.90	0.168	n.c.
JAZF1	1	1	1	1	0.00	0.968	n.c.
GCK	5	5	4	5	0.06	0.802	0.844
NAT2	2	1	2	1	0.40	0.529	2.130
KCNQ1	9	0	6	0	6.46	0.011	n.c.
ARAP1	3	7	3	7	1.42	0.234	0.445

20%, 80%: rispettivamente il quintile inferiore e superiore del DI;

χ^2 : Chi-quadro test; p: p-value

Associazione delle varianti, considerate collettivamente, con gli estremi del DI

Predittori

	p	O.R.	95% CI	
AGE	<0.0001	1.058	1.039	1.077
BMI	<0.0001	1.082	1.054	1.110
ADCY5	0.0375	5.861	1.107	31.031

Regressione Logistica Binaria: stepwise, corretta per età, BMI e sesso.

Associazione portatori delle varianti con gli estremi del DI

Predittori

N=
439

Varianti distribuite in uno solo degli estremi del DI

		P	O.R.	95% CI per O.R.	
				Inferiore	Superiore
Passo 3c	AGE	.000	1.059	1.040	1.078
	BMI	.000	1.083	1.055	1.111
	ADAMTS9_01	.011	2.123	1.187	3.795

Regressione logistica binaria - stepwise wald- corretta per età, sesso e bmi (geni categorizzati)

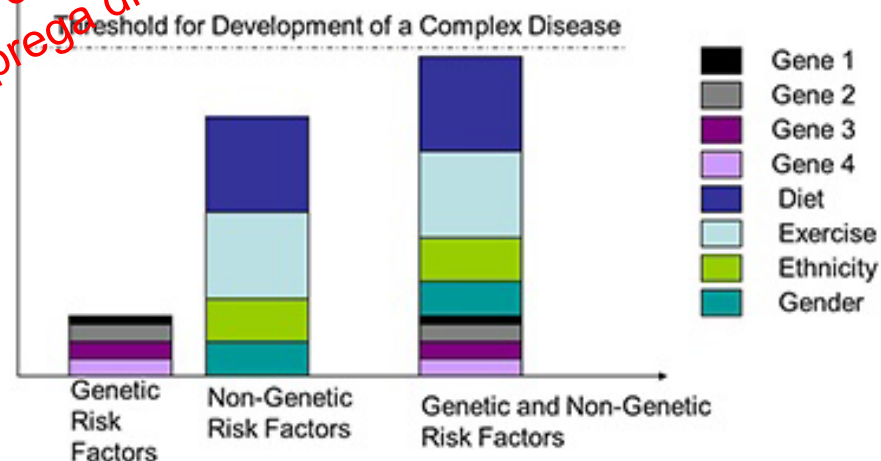
		P	O.R.	95% CI per O.R.	
				Inferiore	Superiore
Passo 3c	AGE	.000	1.057	1.038	1.076
	BMI	.000	1.084	1.057	1.113
	rs6787633_01(1)	.026	12.006	1.339	107.654

Regressione logistica binaria - stepwise wald- corretta per età, sesso e bmi. rs6787633 (categorizzato)

Conclusioni e Limiti

Conferma geni associati da **GWAS**.
Conferma ruolo geni associati alla **Secrezione Insulinica** nel DT2
Alcuni geni mostrano forte **associazione** (ADCY5, ADAMTS9)
mentre altri solo un **trend**
Osservato **accumulo di varianti infrequenti** nel gruppo con ridotta secrezione insulinica. In linea col «modello Omnigenico» (Boyle et al. Cell 2017).

Molteplici varianti sono necessarie per superare una determinata **soglia**



Numerosità del campione in relazione alla bassa frequenza non permette solide associazioni statistiche.
Risultati non generalizzabili a diverse **popolazioni** geografiche.

Prospettive Future

Conferma delle associazioni evidenziate tramite **sequenziamento** gli estremi di un **ulteriore campione** indipendente (**Fase 2**)

Conferma e valutazione delle associazioni tramite **genotipizzazione** di tutti i campioni restanti più un ulteriore casistica indipendente (**Fase 3**).

Valutare l'effetto singolo e combinato delle varianti

migliorare conoscenza dei geni e dei meccanismi patogenetici coinvolti

migliorare approcci terapeutici e preventivi

medicina personalizzata

Diapositiva preparata da DIEGO BAILETTI e ceduta alla Società Italiana di Diabetologia.
Per ricevere la versione originale si prega di scrivere a siditalia@siditalia.it

Ringraziamenti

**Dipartimento Medicina Sperimentale
«Sapienza» Università di Roma**

Marco Giorgio Baroni

Laura Bertocchini

Frida Leonetti

**Dipartimento Medicina Interna e
Specialità Mediche
«Sapienza» Università di Roma**

Marcello Arca

Alessia Di Costanzo

Laura D'Erasmus

**Dipartimento di Scienze Mediche e
Sanità Pubblica
Università di Cagliari**

Efisio Cossu

Michela Incani

**C.S.S. Mendel
IRCCS Casa Sollievo dalla sofferenza
San Giovanni Rotondo (FG)**

Sabrina Prudente

Luana Mercuri

Federica Alberico



Diabetologia



SID

Società Italiana
di Diabetologia



Diapositiva preparata da DIEGO BAILETTI e ceduta alla Società Italiana di Diabetologia.
Per ricevere la versione originale si prega di scrivere a siditalia@siditalia.it

Grazie per l'attenzione

Funzioni Geni Selezionati

ADCY5 NM_183357 7311 pb 1261 aa 21ex chr3

Adenilato Ciclasi legata a membrana stimolata da Prot G. Produce AMPc che induce aumento di Ca^{+2} e conseguente secrezione granuli insulina

ADAMTS9 NM_182920 7624bp 1935aa 40ex chr 3

Metallo-proteasi escrta, cleavage membrana extracellulare. Regione GON permette trafficking cellulare tra RER, Golgi e secrezione extracellulare

IGF2BP2 NM_006548 3688pb 599aa 16ex chr3

Lega RNA di IGF modulandone la trascrizione

CDKAL1 NM_017774 3272bp 579aa 16ex chr 6

Traduce tRNA per AXX

GCK NM_00162 2729pb 465aa 10ex chr7

1° step del metabolismo epatico e pancreatico del glucosio, produce G6P.

Funzioni Geni Selezionati

JAZF1 NM_175061 3125 pb 243 aa 5ex chr 7

Inibisce l'espressione dell'enzima della gluconeogenesi PCK2 attraverso l'inibizione dell'attività del recettore NR2C2

NAT2 NM_000015 1322pb 290aa 2ex chr 8

Metabolizza farmaci a base di idrazine e arilammine.

ARAP1 NM_001040118 5145pb 1450aa 35ex chr 11

Modula actina e citoscheletro, via ARF-RHO, GTP-dipendente. Attivato da PIP3, associato a Golgi, regola trafficking cellulare

KCNQ1 NM_000218 3245 bp 676 aa 16 ex chr 11

Canale K⁺ voltaggio-dipendente. Induce rilascio granuli insulina in seguito a depolarizzazione dei membrana

Diapositiva preparata da DIEGO BAILETTI e ceduta alla Società Italiana di Diabetologia.
Per ricevere la versione originale si prega di scrivere a siditalia@siditalia.it

Glossario Genomica

- Polimorfismo – un area del DNA che varia da persona a persona
- “Single nucleotide polymorphism” (SNP) – polimorfismo a singola base
- “Copy number variant” (CNV) – polimorfismo nel numero di ripetizioni nella sequenza del DNA che variano da persona a persona
- “Indel” – polimorfismo nella sequenza del DNA in cui è presente un’ inserzione o una delezione di materiale genetico

Catalogo GWAS

<http://www.ebi.ac.uk/gwas/>



GWAS Catalog

Home

Search

Diagram

Download

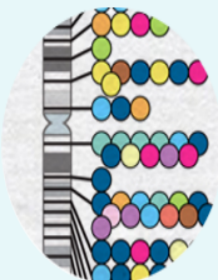
Documentation

About

EMBL-EBI



National Human Genome
Research Institute



GWAS Catalog

The NHGRI-EBI Catalog of published genome-wide association studies

Search the catalog



Examples: breast cancer, rs7329174, Yang, 2q37.1, HBS126.16000000-26000000



Search

Search the Catalog in a number of ways, including by trait, SNP identifier, study and gene.



Diagram

Explore an interactive visualisation of all SNP-trait associations with genome-wide significance ($p \leq 5 \times 10^{-8}$).



Download

Download a full copy of the GWAS Catalog in spreadsheet format and current and older versions of GWAS diagram in SVG format.



Documentation

Including FAQs, our curation process, training materials, related resources and a list of abbreviations.



Summary statistics

A list of all studies for which summary statistics are available in the Catalog.

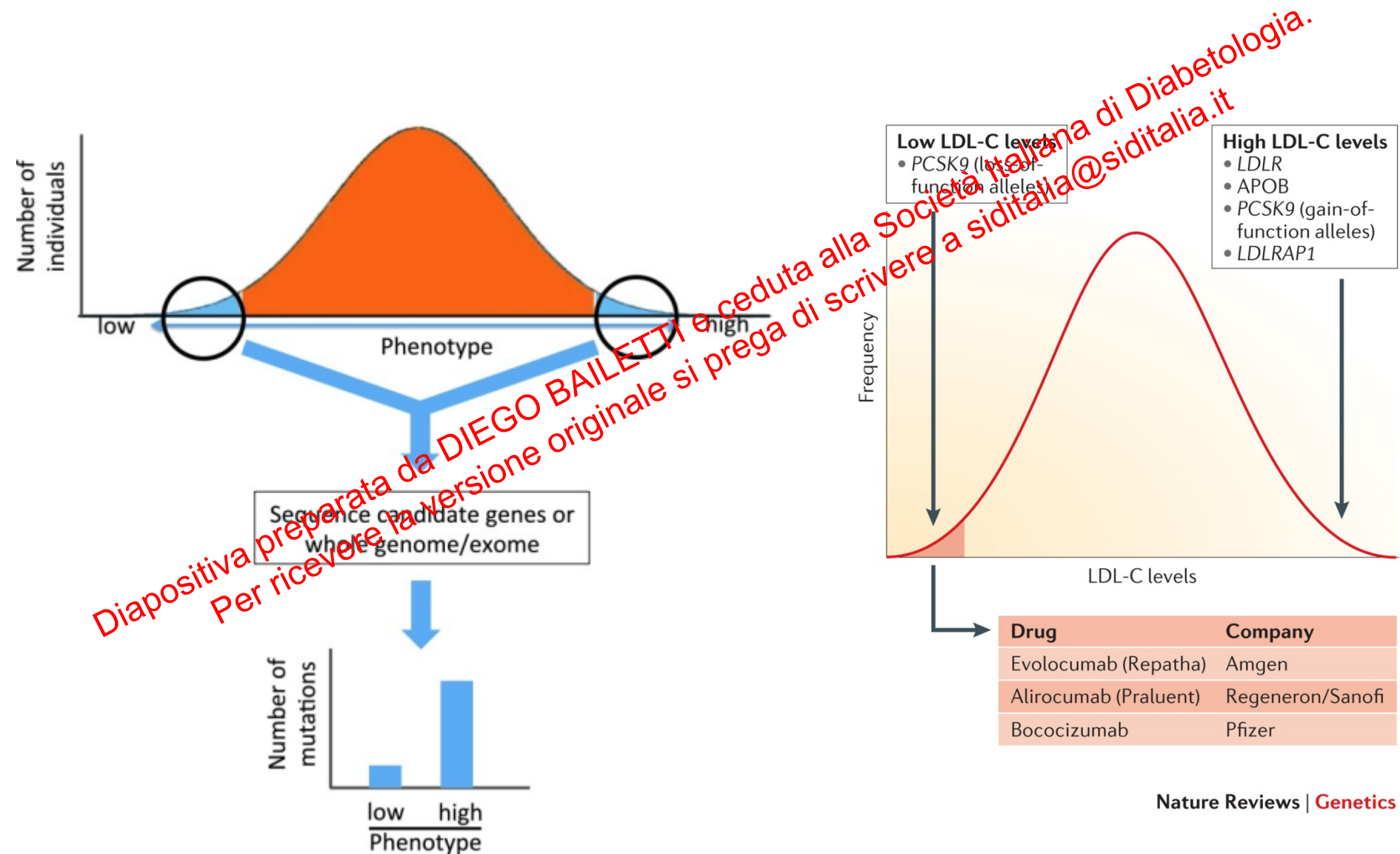


Ancestry

An introduction to our ancestry curation process.

Diapositiva preparata da DIEGO BAILETTI e ceduta alla Società Italiana di Diabetologia.
Per ricevere la versione originale si prega di scrivere a siditalia@siditalia.it

Estremi di Fenotipo



Ghost Slide

Patologia metabolica complessa, multifattoriale, (vita, ambiente, genetica) osservata però componente genetica.

Ad oggi molti (88) geni e locus associati a DT2 e CVD.

Genetica predominante nelle forme precoci (monogeniche - MODY) e stadi iniziali, mentre i fattori ambientali predominano in forme tardive (come per MI) [Rosamond et al. Circulation, 2008]

Diversi metodi utilizzati per chiarirne genetica e meccanismi molecolari.

1° 1992 GCK in famiglia francese. [Froguel et al. Nature, 1992] DT2 non solo IR.

Altri tramite studi di associazione estesi al genoma (GWAS)

Incubo dei genetisti [Neel JV. The Genetics of Diabetes Mellitus, 1976]

pur se riconosciuta forte clusterizzazione familiare nel DT2 [Zimmet et al. Diabetologia, 1982],

GCK in famiglia francese [Froguel et al. Nature, 1992] DT2 non solo IR.

Ereditarietà Mancante:

Genetica < classici predittori di rischio (obesità, la glicemia a digiuno, etc) [Walford et al. Diabetes Care, 2014].

ruolo principale della genetica nei primi stadi dello sviluppo del DT2 ed un ruolo preminente dei fattori ambientali nei pazienti più anziani, come per altre patologie poligeniche tipo l'infarto del miocardio (MI) [.

l'alto rischio conferito dalle varianti (eg. TCF7L2) può essere azzerato attraverso interventi sullo stile di vita [Florez et al. N. Engl. J. Med. 2006]

associazione non significa causalità (spesso tagSNP)

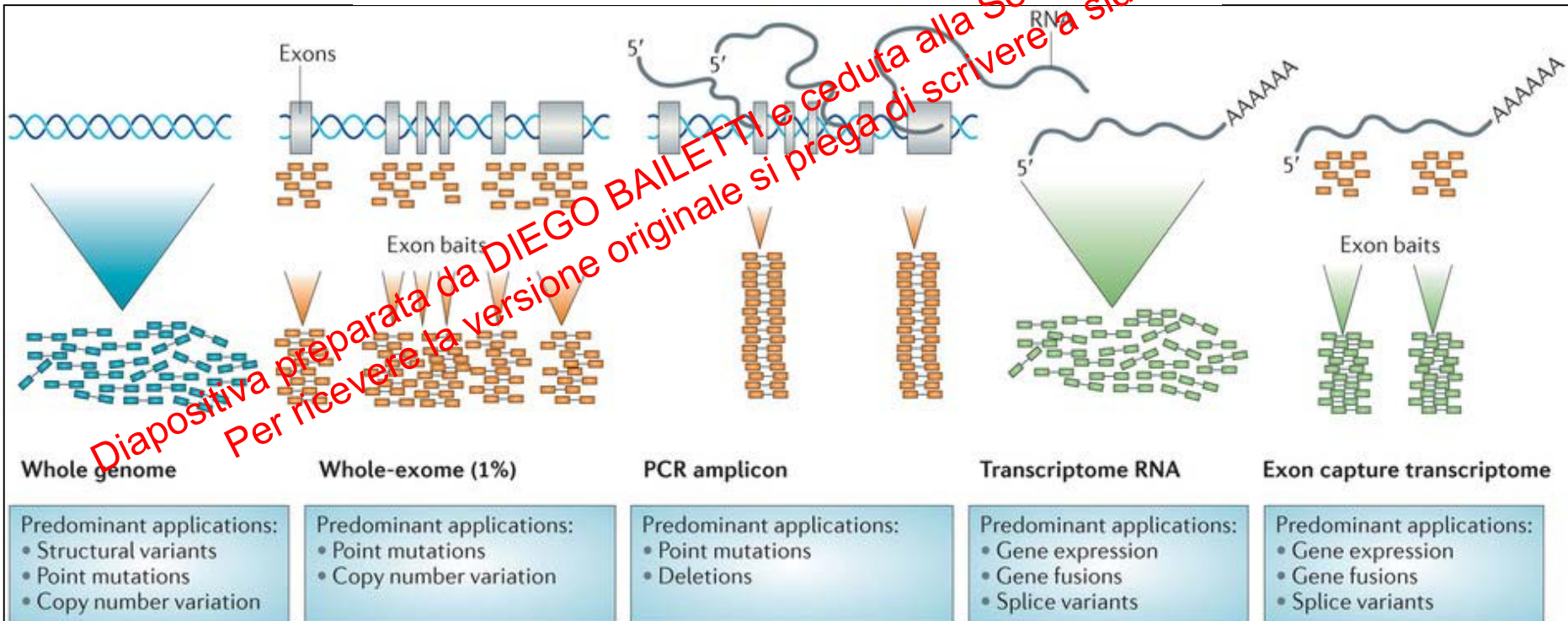
GWAS per SNP noti vs WGS/WES.

meccanismi genetici o epigenetici diversi da SNP (eg CNV marker di obesità) possono contribuire al rischio genetico di DT2.

(Eg. PCSK9)

APPLICAZIONI NGS

- ✓ Le macchine NGS ad oggi disponibili sono dispositivi molto flessibili
- ✓ Un sequenziatore può essere utilizzato per diversi tipi di applicazioni



WORKFLOW NGS

Materiale di partenza
DNA/RNA

Preparazione Libreria

Preparazione Templato

Sequenziamento

Analisi Dati

Quantificazione e valutazione qualità
Metodo fluorimetrico (Qubit)

1°

Primary
Analysis

De-multiplexing

Base Calling

2°

Secondary
Analysis

Read Mapping

Variant Calling

3°

Tertiary
Analysis

Variant Annotation

Variant Filtering

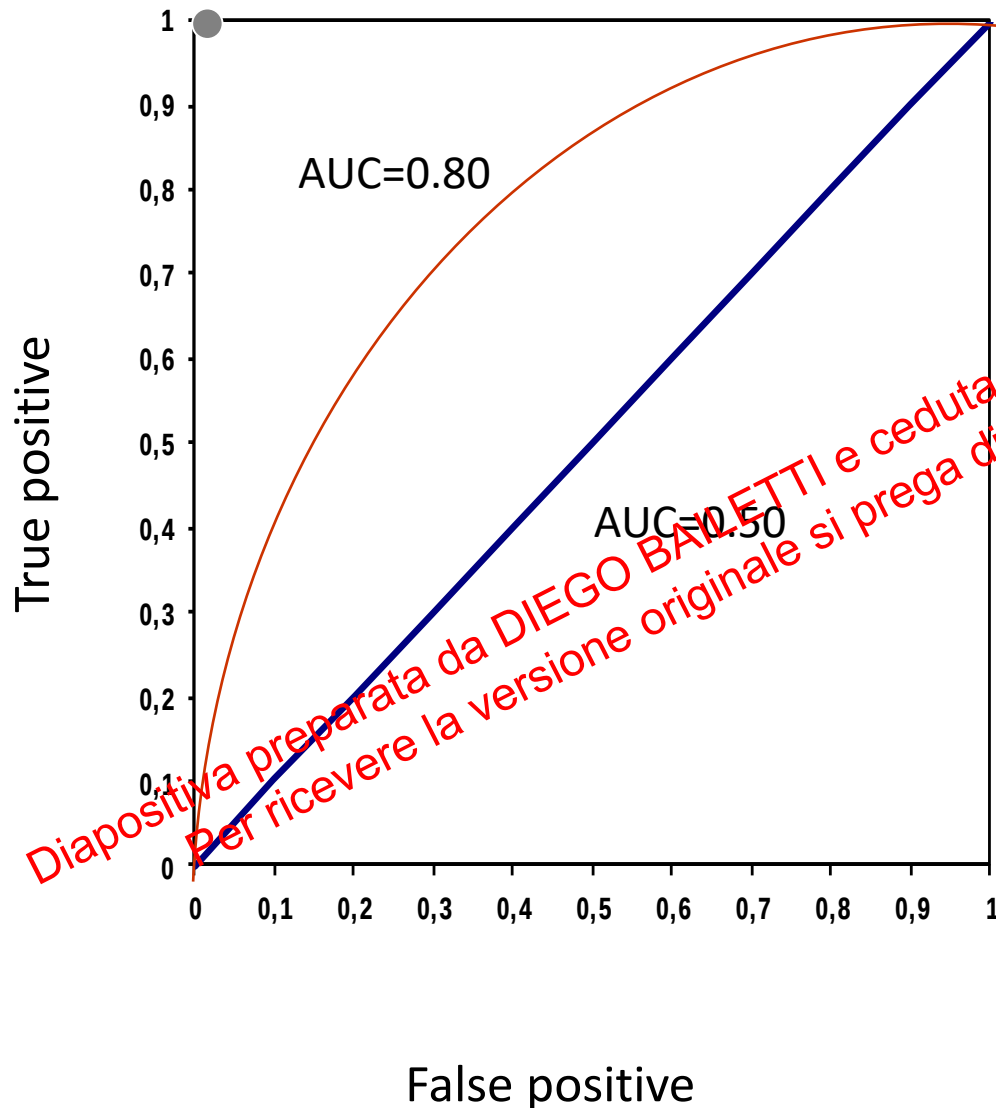
Geni candidati identificati da studi di associazione confermati da GWAs

Locus	Gene	Lipid trait
1p32.3	<i>PCSK9</i>	LDL-C
1p31.3	<i>ANGPTL3</i>	Triglycerides
2p24.1	<i>APOB</i>	LDL-C
5q13.3	<i>HMGCR</i>	LDL-C
6q25.3	<i>LPA</i>	Lipoprotein(a)
8p21.3	<i>LPL</i>	Triglycerides
9q31.1	<i>ABCA1</i>	HDL-C
11q12.2	<i>FADS1/FADS3</i>	Triglycerides
11q23.3	<i>APOA1</i>	Triglycerides
12q24.31	<i>INF1A</i>	Total cholesterol
15q21.3	<i>LIPC</i>	HDL-C
16q13	<i>CETP</i>	HDL-C
16q22.1	<i>LCAT</i>	HDL-C
18q21.1	<i>LIPG</i>	HDL-C
19p31,2	<i>ANGPTL-4</i>	HDL-C
19p23.3	<i>LDLR</i>	LDL-C
19q13.32	<i>APOE</i>	LDL-C
20q13.12	<i>PLTP</i>	HDL-C

Diapositiva preparata da DIEGO BAILETTI e ceduta alla Società Italiana di Diabetologia.
Per ricevere la versione originale si prega di scrivere a siditalia@siditalia.it

Receiver operating characteristic (ROC) curve

Perfect test
AUC 100%



AUC = C-statistics

The numeric value of the C statistic represents the probability of correctly ranking 2 randomly selected individuals (one likely to develop disease and one not so predisposed) on the basis of their predicted risk from the prediction model under evaluation.

Why genetic risk scores don't work

- Some of the risk alleles commonly incorporated in GRS are known to act via pathways that are already captured by the risk factors included in standard prognostic models (eg, lipids) and are therefore unlikely to improve prediction,
- Genetic effect estimates from GWAS are likely to be inflated owing to the “winner’s curse”, and several studies have used extreme subjects to identify genetic associations by sampling high genetic-risk cases and low genetic-risk control subjects.
- Finally, risk prediction is particularly challenging in the context of individuals with established coronary artery disease, given that different pathophysiologic mechanisms could be involved in the development and progression of atherosclerosis versus complications of established disease such as MI,

THE GENETICS OF MULTIFACTORIAL DISORDERS

Future prospects

1. Finding additional novel loci

- GWAs in other large populations
 - Intermediate phenotypes
 - High density maps
 - Low frequency variants $<1\%$ (1000 genome project)
- Copy-number variations (CNV)
- Next-generation genome sequencing

2. Defining the genetic role of new variants

- Gene-environment interaction (FTO in active/inactive subjects)
- Study of the extremes/intermediate phenotypes
- Deep re-sequencing
- Mendelian Randomization
- Functional studies
- Pharmacogenomics

3. Translating discoveries to clinical practice

Diapositiva preparata da DIEGO BIANCHI e ceduta alla Società Italiana di Diabetologia.
Per ricevere la versione originale si prega di scrivere a siditalia@siditalia.it

LESSONS LEARNED FROM GENETIC STUDIES OF MULTIFACTORIAL DISEASES

- Many genes involved
- Modest effect

“power is everything!! ($p < 5 \times 10^{-8}$) ”

“replication ”

Diapositiva preparata da DIEGO BAILETTI e ceduta alla Società Italiana di Diabetologia.
Per ricevere la versione originale si prega di scrivere a siditalia@siditalia.it