

## Lavoro originale

# Assenza di associazione tra polimorfismo Pro12Ala del gene PPAR $\gamma$ 2 e diabete di tipo 2

G. Donnarumma, E. Lapice,  
M. Giacchetti<sup>1</sup>, M. Pinelli<sup>1</sup>, G. Nosso,  
G. Romano<sup>2</sup>, O. Vaccaro

Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale, Università "Federico II" di Napoli;

<sup>1</sup> Dipartimento di Biologia e Patologia Cellulare e Molecolare, "A. Califano" DBPCM, Università "Federico II" di Napoli;

<sup>2</sup> ASL Napoli 4

Corrispondenza: dott.ssa Olga Vaccaro, Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale, Università "Federico II" di Napoli, via S. Pansini 5, 80131 Napoli  
e-mail: ovaccaro@unina.it

G It Diabetol Metab 2006;26:105-109

Pervenuto in Redazione il 5-5-2006

Accettato per la pubblicazione il 31-5-2006

Parole chiave: PPAR $\gamma$  e diabete, polimorfismo Pro12Ala, diabete tipo 2 e genetica

Key words: PPAR $\gamma$  and diabetes, Pro12Ala polymorphism of the PPAR $\gamma$  2 gene, type 2 diabetes

### Riassunto

Il PPAR $\gamma$ 2 (*peroxisome proliferator-activated receptor gamma 2*) è un modulatore chiave dell'adipogenesi e dell'insulino-resistenza, noti fattori di rischio per lo sviluppo di diabete mellito. In virtù di questo suo ruolo nell'ultimo decennio l'attenzione dei ricercatori si è concentrata sullo studio dei polimorfismi di questo gene. Uno dei più studiati è il polimorfismo derivante dalla sostituzione della prolina con l'alanina (Pro12Ala). In molti, ma non in tutti gli studi esistenti la presenza di questo polimorfismo è stata associata a un ridotto rischio di diabete. Tuttavia, la maggior parte di questi lavori include popolazioni asiatiche o nord europee, mentre pochissime informazioni sono disponibili su popolazioni del bacino del Mediterraneo. Scopo del lavoro è valutare in un'ampia popolazione di quest'area l'associazione tra la mutazione Pro12Ala del gene PPAR $\gamma$ 2 e diabete mellito e l'eventuale effetto modulante di età, sesso e grado di adiposità.

Sono state studiate 1417 persone (676 pazienti con diabete tipo 2 e 741 soggetti non diabetici di controllo). Sono stati misurati i principali caratteri antropometrici e di laboratorio, secondo protocollo standardizzato.

I pazienti diabetici presentano una maggiore prevalenza del sesso maschile (68,42% vs 58,28%), sono più anziani (56,3 vs 48,7 anni) e più obesi (29,9 vs 27,2 kg/m<sup>2</sup>). La frequenza del polimorfismo Pro12Ala non differisce in modo significativo nei due gruppi con o senza diabete (12,9% vs 13,4%). L'analisi condotta dopo stratificazione per sesso, età e indice di massa corporea (IMC) non ha modificato questi risultati.

Questo studio non conferma un'associazione significativa tra il polimorfismo Pro12Ala del PPAR $\gamma$ 2 e il ridotto rischio di diabete. Una possibile spiegazione per la discordanza con altri studi presenti in letteratura è che l'effetto della mutazione possa essere modulato dal background genetico e/o ambientale, notevolmente variabile tra popolazioni differenti.

### Summary

*Absence of association between Pro12Ala polymorphism of the PPAR $\gamma$ 2 gene and diabetes*

*The PPAR $\gamma$ 2 (peroxisome proliferator-activated receptor gamma 2) is a key modulator of adipogenesis and insulin-sensitivity, known risk factors to the development of type 2 diabetes. The polymorphism of this gene has been intensely studied. The mutation, given by proline to alanine substitution (Pro12Ala), is one of the most common. In many, but not in all available studies the presence of this polymorphism is associated to type 2 diabetes risk reduction. However most studies includes Asian or north European populations, whereas very little information is available on Mediterranean population. Aim of this study is to evaluate in a large population of this area the association between the mutation Pro12Ala of PPAR $\gamma$ 2 gene and type 2 diabetes. We studied*

1417 subjects (676 type 2 diabetic patients and 741 control subjects). Anthropometric and laboratory features were measured according to standard procedures. Diabetic patients were older (56.3 vs 48.7 years), more obese (29.9 vs 27.2 kg/m<sup>2</sup>) and had a higher prevalence of male gender (68.42% vs 58.28%) than controls. The frequency of the polymorphism did not differ significantly between two groups with or without diabetes (12.9% vs 13.4%). The same analysis conducted after stratification by sex, age and body mass index (BMI) gave similar results. In conclusion our findings do not support the hypothesis that the Pro12Ala variant is significantly associated with a reduced risk of type 2 diabetes. A possible explanation for the discrepancy with other published studies is that the mutation effects may be modulated by genetic and/or environmental background, which may differ across populations.

## Introduzione

Il PPAR $\gamma$ 2 (peroxisome proliferator-activated receptor gamma 2) è un modulatore chiave dell'adipogenesi e dell'insulino-resistenza, noti fattori di rischio per lo sviluppo di diabete mellito<sup>1</sup>. In virtù di questo suo ruolo, nell'ultimo decennio l'attenzione dei ricercatori si è concentrata sullo studio dei polimorfismi di questo gene. Uno dei più studiati è il polimorfismo derivante dalla sostituzione della prolina con l'alanina nel codone 12 dell'esone 6 (Pro12Ala) all'NH<sub>2</sub> terminale<sup>2</sup>.

Fino a oggi sono stati pubblicati numerosi lavori che hanno studiato l'influenza della mutazione sullo sviluppo della malattia diabetica. I risultati sono discordanti: infatti, in molti, ma non in tutti gli studi esistenti, il polimorfismo di questo gene è stato associato a un rischio variabile di diabete<sup>3-8</sup>. Una possibile spiegazione per l'apparente discordanza dei dati è che l'effetto della presenza della mutazione nei confronti dello sviluppo della malattia sia influenzato da un background genetico e ambientale, notevolmente variabile tra differenti popolazioni. La quasi totalità dei lavori che conclude per un ruolo protettivo del genotipo Pro12Ala nei confronti del diabete, include popolazioni asiatiche o nord europee, mentre scarse sono le informazioni disponibili su popolazioni del bacino del Mediterraneo<sup>4,9</sup>.

L'obiettivo del lavoro è quindi valutare in un'ampia popolazione di quest'area se la mutazione Pro12Ala del gene PPAR $\gamma$ 2 influenzi il rischio di diabete, e se questa relazione sia influenzata da variabili quali il sesso, l'età e il grado di adiposità.

## Metodi

Sono stati studiati in tutto 1417 soggetti di cui 676 pazienti con diabete tipo 2 (394 M/282 F) afferenti all'ambulatorio per il diabete di un Distretto Sanitario della Provincia di Napoli (ASLNA4) e un gruppo di controllo di 741 soggetti non diabetici (507 M/234 F), dipendenti della Società dei telefoni, residenti nella stessa area geografica. La diagnosi di diabete tipo 2 è stata posta in presenza di una glicemia a digiuno

maggiore o uguale a 126 mg/dl o trattamento in corso con farmaci anti-diabetici; i controlli dovevano avere una glicemia inferiore a 110 mg/dl e non essere in trattamento ipoglicemizante. Sono stati misurati i principali caratteri antropometrici, quali peso, altezza, circonferenza vita, secondo protocollo standardizzato. È stato effettuato un prelievo a digiuno per la determinazione di glucosio, trigliceridi, colesterolo totale e colesterolo HDL. L'insulina plasmatica è stata determinata con metodo radioimmunologico con doppio anticorpo. Il DNA genomico, estratto da 3 ml di sangue periferico, è stato genotipizzato per il polimorfismo Pro12Ala con metodo SYBR Green sul Realtime ABI PRISM 7000 (PE Applied Biosystem).

La numerosità del campione studiato ha un potere dell'80% di identificare come significativa una differenza di circa il 30% (test a una coda) per la presenza della mutazione nei controlli verso i pazienti con diabete.

I dati sono riportati come media  $\pm$  deviazione standard o percentuale. Il confronto tra le medie è stato eseguito mediante t-test per dati non appaiati. Le proporzioni sono state confrontate mediante chi-quadrato di Pearson. Per verificare l'eventuale effetto confondente dell'età e del grado di adiposità, i partecipanti con o senza diabete sono stati confrontati dopo stratificazione per età e indice di massa corporea (IMC), condotta utilizzando la mediana di tutta la popolazione studiata (i.e. 52 anni per l'età e 27 kg/m<sup>2</sup> per IMC). Tutte le analisi statistiche sono state condotte con SPSS per Windows versione 12.0. Un valore di p inferiore a 0,05 (due code) è stato considerato significativo.

## Risultati

Dei 1417 soggetti studiati 1219 (86%) soggetti sono risultati Pro/Pro, 186 (13,2%) Pro/Ala, 12 (0,8%) Ala/Ala. Nelle successive analisi, a causa del numero esiguo di omozigoti per il polimorfismo Pro12Ala, le persone con genotipo Pro/Ala o Ala/Ala sono state considerate come un solo gruppo, definito Ala carrier e confrontate con i portatori del genotipo Pro/Pro, definiti come non carrier.

Le caratteristiche generali dei partecipanti sono mostrate nella tabella 1. I pazienti con diabete di tipo 2 sono risultati significativamente diversi dai soggetti non diabetici per l'età, più anziana, il sesso, con una più elevata proporzione di uomini, l'IMC superiore, una maggiore adiposità centrale, valori di trigliceridi e pressione arteriosa sistolica più elevati e valori di colesterolo HDL più bassi.

La distribuzione del genotipo non differisce in modo significativo tra i pazienti diabetici e i controlli non diabetici (Tab. 2). Per analizzare l'eventuale effetto confondente di sesso, età e grado di adiposità, la frequenza del polimorfismo nei soggetti con o senza diabete è stata confrontata dopo stratificazione per queste variabili utilizzando la mediana della distribuzione

**Tabella 1** Distribuzione del genotipo del gene PPAR $\gamma$ 2.

	Diabetici	Controlli
Pro/Pro	587 (86,8%)	632 (85,3%)
Pro/Ala	87 (12,9%)	99 (13,4%)
Ala/Ala	2 (0,3%)	10 (1,3%)
Totale	676 (100%)	741 (100%)

$\chi^2 = 5,87$ ;  $p < 0,12$

ficare il potenziale effetto confondente di sesso, età e indice di massa corporea ha confermato l'assenza di associazione sia negli uomini sia nelle donne, sia nei soggetti più giovani che meno giovani (età  $< 0$  o  $\geq 52$  anni), nei soggetti obesi e meno obesi (IMC  $< 27$  o  $\geq 27$ ).

Questi risultati sono in accordo con alcuni degli studi disponibili in letteratura<sup>9,11-13</sup>, mentre in altri è stato osservato un significativo effetto protettivo del polimorfismo Pro12Ala nei confronti dello sviluppo di diabete<sup>3-8,14</sup>. La distribuzione del

**Tabella 2** Caratteristiche generali della popolazione studiata (media  $\pm$  deviazione standard).

	Diabetici	Controlli	p
N.	676	741	
Uomini	394 (58,28%)	507 (68,42%)	0,007
Età (anni)	56,3 $\pm$ 8,1	48,7 $\pm$ 8,0	0,000
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	29,9 $\pm$ 5,5	27,2 $\pm$ 5,3	0,000
Circonferenza vita (cm)	100 $\pm$ 11	94 $\pm$ 12,2	0,000
Colesterolo totale (mg/dl)	204 $\pm$ 47	207 $\pm$ 40	ns
Colesterolo HDL (mg/dl)	47 $\pm$ 12	49 $\pm$ 14	0,060
Trigliceridi (mg/dl)	172 $\pm$ 156	134 $\pm$ 71	0,000
Glicemia (mg/dl)	174 $\pm$ 64	98 $\pm$ 10	0,000
Pressione arteriosa sistolica (mmHg)	150 $\pm$ 22	137 $\pm$ 19	0,000
Pressione arteriosa diastolica (mmHg)	87 $\pm$ 12	87 $\pm$ 12	ns

di tutta la popolazione cioè età  $< 0$  o  $\geq 52$  anni, IMC  $< 0$  o  $\geq 27$  kg/m<sup>2</sup>. La frequenza genotipica è stata pertanto confrontata in pazienti con o senza diabete all'interno di categorie confrontabili per sesso, età e grado di adiposità (Tab. 3). Anche in questa analisi non sono state osservate differenze nella frequenza del polimorfismo Pro12Ala tra i pazienti diabetici e i controlli non diabetici (Tab. 3).

Per valutare un'eventuale associazione tra la mutazione e i componenti della sindrome da insulino-resistenza, abbiamo confrontato IMC, circonferenza vita, HDL colesterolo, trigliceridi, glicemia, insulina e pressione arteriosa sistolica nei soggetti con e senza polimorfismo sia diabetici sia non diabetici (Tab. 4). In entrambi i gruppi le variabili componenti della sindrome metabolica erano confrontabili nei soggetti portatori o non portatori del polimorfismo.

## Conclusioni

Questo studio non ha dimostrato un'associazione significativa tra polimorfismo Pro12Ala del gene PPAR $\gamma$ 2 e rischio di diabete di tipo 2. L'analisi per sottogruppi, condotta per veri-

genotipo nella popolazione da noi esaminata è simile a quella riportata in altre popolazioni caucasiche<sup>10</sup> e questo conferisce ulteriore consistenza ai nostri dati.

Un'ipotesi plausibile per spiegare la discordanza dei dati presenti in letteratura, inclusi i nostri, è che esposizioni ambientali e fattori legati allo stile di vita (per es., dieta, esercizio fisico), notevolmente variabili tra differenti popolazioni, possano modulare l'impatto della mutazione sulla suscettibilità alla malattia. Gli acidi grassi, in particolare i polinsaturi (PUFA), sono ligandi naturali del PPAR $\gamma$ , pertanto la composizione in acidi grassi della dieta, per esempio, potrebbe interferire con l'attività del PPAR $\gamma$ , regolandone l'espressione. Questa ipotesi è supportata da alcuni studi<sup>15-17</sup>, condotti su soggetti non diabetici, i quali mostrano una diversa suscettibilità all'accumulo di adipe in risposta al contenuto di grassi della dieta negli omozigoti Pro/Pro, ma non nei portatori della variante Ala, suggerendo così la possibilità di una interazione gene-ambiente nella risposta alla dieta<sup>18</sup>.

Non va inoltre trascurata, tra le possibili ipotesi interpretative, l'interazione con il background genetico (interazione gene-gene), per esempio con altre varianti del PPAR $\gamma$ 2 o con altri geni in linkage disequilibrium con il PPAR $\gamma$ 2<sup>19</sup>. Uno

**Tabella 3** Frequenze alleliche nei diabetici e nei controlli divisi secondo il sesso, l'età, l'IMC.

	Uomini		Donne		Età (anni)						IMC (kg/m <sup>2</sup> )			
	ProPro	ProAla + AlaAla	ProPro	ProAla + AlaAla	< 52		≥ 52		< 27		≥ 27			
					ProPro	ProAla + AlaAla	ProPro	ProAla + AlaAla	ProPro	ProAla + AlaAla	ProPro	ProAla + AlaAla		
Diabetici	343 (86,6%)	52 (12,3%)	245 (86,5%)	37 (13,1%)	165 (86,4%)	26 (13,6%)	422 (86,8%)	63 (13,2%)	176 (88%)	24 (12%)	411 (86,3%)	65 (13,6%)		
Controlli	427 (84,4%)	79 (15,6%)	203 (87,1%)	30 (12,9%)	387 (83,8%)	75 (16,3%)	245 (88,1%)	33 (11,9%)	366 (84,9%)	65 (15,4%)	266 (86,1%)	43 (13,9%)		
$\chi^2$	1,007		0,010		0,710		0,211		1,071		0,008			
p	0,316		0,922		0,399		0,646		0,301		0,927			

**Tabella 4** Confronto dei componenti della sindrome da insulino-resistenza nei soggetti con e senza polimorfismo Pro12Ala.

	IMC (kg/m <sup>2</sup> )	Circonferenza vita (cm)	Colesterolo HDL (mg/dl)	Trigliceridi (mg/dl)	Glicemia (mg/dl)	Insulina ( $\mu$ U/ml)	Pressione arteriosa sistolica (mmHg)
Diabetici							
ProPro (n. 587)	29,8 $\pm$ 5,3	100 $\pm$ 11	47 $\pm$ 11	168 $\pm$ 151	174 $\pm$ 64	14,3 $\pm$ 5,8	150 $\pm$ 21
ProAla + AlaAla (n. 89)	30,8 $\pm$ 6,3	100 $\pm$ 13	47 $\pm$ 12	193 $\pm$ 186	175 $\pm$ 67	10,9 $\pm$ 9	149 $\pm$ 23
p	0,161	0,679	0,804	0,153	0,933	0,153	0,686
Controlli							
ProPro (n. 632)	27,2 $\pm$ 5,3	94 $\pm$ 12	48 $\pm$ 14	135 $\pm$ 71	98 $\pm$ 9	8,3 $\pm$ 4	137 $\pm$ 18
ProAla + AlaAla (n. 109)	27,4 $\pm$ 5,2	94 $\pm$ 10	49 $\pm$ 13	133 $\pm$ 74	96 $\pm$ 10	8,2 $\pm$ 4	137 $\pm$ 20
p	0,68	0,89	0,86	0,79	0,17	0,82	0,98

studio americano ha dimostrato un'interazione tra il polimorfismo Pro12Ala e il polimorfismo Trp64Arg del recettore  $\beta$ 3 adrenergico (ADR $\beta$ 3) nel modulare l'espressione di variabili antropometriche quali l'obesità<sup>20</sup>. Infatti, la presenza della mutazione Pro12Ala si associa a maggiore obesità solo se coesiste anche la mutazione ADR $\beta$ 3. In un altro studio, condotto su un'ampia popolazione asiatica, è stato mostrato che la variante Pro12Ala determina un aumento dell'insulinosensibilità solo nei soggetti portatori anche del polimorfismo T94G del gene dell'adiponectina<sup>21</sup>.

Al momento non sono disponibili lavori che abbiano valutato l'eventuale effetto di un'interazione gene-ambiente e/o gene-gene nell'associazione tra polimorfismo Pro12Ala e diabete. Tuttavia, sulla base dei dati esistenti, inclusi i risultati di questo studio, è plausibile ipotizzare che l'impatto dell'effetto protettivo della mutazione Pro12Ala sulla suscettibilità al diabete, osservato da alcuni autori, possa essere modulato da fattori ambientali legati allo stile di vita e che pertanto possa variare anche significativamente tra popolazioni diverse.

## Bibliografia

- Ferré P. *The biology of peroxisome proliferators-activated receptors. Relationship with lipid metabolism and insulin sensitivity.* Diabetes 2004;53:S43-S50.
- Stumvoll M, Häring H. *The peroxisome proliferators-activated receptor- $\gamma$ 2 Pro12Ala polymorphism.* Diabetes 2002;51:2341-7.
- Deeb SS, Fajas L, Nemoto M, Pihlajamäki J, Mykkänen L, Kuusisto J et al. *A Pro12Ala substitution in PPAR $\gamma$ 2 associated with decreased receptor activity, lower body mass index and improved insulin sensitivity.* Nature Genetics 1998;20:284-7.
- Atshuler D, Hirschhorn JN, Klannemark M, Lindgren CM, Vohl MC, Nemes J et al. *The common PPAR $\gamma$  Pro12Ala polymorphism is associated with decreased risk of type 2 diabetes.* Nature Genetics 2000;26:76-80.
- Hara K, Okada T, Tobe K, Yasuda K, Mori Y, Kadowaki H et al. *The Pro12Ala polymorphism in PPAR $\gamma$ 2 may confer resistance to type 2 diabetes.* Biochem Biophys Res Commun 2000;271:212-6.
- Poulsen P, Andersen G, Fenger M, Hansen T, Echwald SM, Vølund A et al. *Impact of two common polymorphism in the PPAR $\gamma$  gene on glucose tolerance and plasma insulin profiles in monozygotic and dizygotic twins. Thrifty genotype, thrifty phenotype, or both?* Diabetes 2003;52:194-8.
- Douglas JA, Erdos MR, Watanabe RM, Braun A, Johnston CL, Oeth P et al. *The peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$ 2 Pro12Ala variant. Association with type 2 diabetes and trait differences.* Diabetes 2001;50:886-90.
- Mori H, Ikegami H, Kawaguchi Y, Seino S, Yokoi N, Takeda J et al. *The Pro<sup>12</sup>Ala substitution in PPAR $\gamma$  is associated with resistance to development of diabetes in the general population. Possible involvement in impairment of insulin secretion in individuals with type 2 diabetes.* Diabetes 2001;50:891-4.
- Mancini FP, Vaccaro O, Sabatino L, Tufano A, Rivelles AA, Riccardi G et al. *Pro12Ala substitution in the peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$ 2 is not associated with type 2 diabetes.* Diabetes 1999;48:1466-8.
- Beamer BA, Yen C-J, Andersen RE, Muller D, Elahi D, Cheskin LJ et al. *Association of the Pro12Ala variant in the peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$ 2 gene with obesity in two Caucasian populations.* Diabetes 1998;195-8.
- Ringel J, Engeli S, Distler A, Sharma AM. *Pro12Ala missense mutation of the peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  and diabetes mellitus.* Biochem Biophys Res Commun 1999;254:450-3.
- Malecki MT, Frey J, Klupa T, Skupien J, Walus M, Mlynarski W et al. *The Pro12Ala polymorphism of PPAR $\gamma$ 2 gene and susceptibility to type 2 diabetes mellitus in a polish population.* Diabetes Res Clin Pract 2003;62:105-11.
- Muller YL, Bogardus C, Beamer BA, Shuldiner AR, Baier LJ. *A functional variant in the peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$ 2 promoter is associated with predictors of obesity and type 2 diabetes in Pima Indians.* Diabetes 2003;52:1864-71.
- Li WD, Lee JH, Price RA. *The peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$ 2 Pro12Ala mutation is associated with early onset extreme obesity and reduced fasting glucose.* Mol Genet Metab 2000;70:159-61.
- Robitaille J, Despres JP, Perusse L, Vohl MC. *The PPAR-gamma P12A polymorphism modulates the relationship between dietary fat intake and components of the metabolic syndrome: results from the Quebec Family Study.* Clin Genet 2003;63:109-16.
- Memisoglu A, Hu FB, Hankinson SE, Manson JE, De V, Willett IWC et al. *Interaction between a peroxisome proliferator-activated receptor gamma gene polymorphism and dietary fat intake in relation to body mass.* Hum Mol Genet 2003;12:2923-9.
- Luan J, Browne PO, Harding AH, Halsall DJ, O'Rahilly S, Chatterjee VK et al. *Evidence for gene-nutrient interaction at the PPAR-gamma locus.* Diabetes 2001;50:686-9.
- Kraft P, Hunter D. *Integrating epidemiology and genetic association: the challenge of gene-environment interaction.* Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 2005;360:1609-16.
- Baratta R, Di Paola R, Spanpanato D, Fini G, Marucci A, Coco A et al. *Evidence for genetic epistasis in human insulin resistance: the combined effect of PC-1 (K121Q) and PPARgamma2 (P12A) polymorphism.* J Mol Med 2003;81:718-23.
- Hsueh WC, Cole SA, Shuldiner AR, Beamer BA, Blangero J, Hixson JE et al. *Interaction between variant in the beta3-adrenergic receptor and peroxisome proliferators activated receptor-gamma 2 genes and obesity.* Diabetes Care 2001;24:672-7.
- Yang WS, Hsiung CA, Ho LT, Chen YT, He CT, Curb JD et al. *Genetic epistasis of adiponectin and PPARgamma2 genotypes in modulation of insulin sensitivity: a family-based association study.* Diabetologia 2003;46:977-83.