



# UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

**Università degli Studi di Padova**

Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale

DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE MEDICHE CLINICHE E

SPERIMENTALI

INDIRIZZO: DIABETOLOGIA

CICLO XX

**STUDIO DI ASSOCIAZIONE TRA VARIANTI GENETICHE COMUNI NEI  
LOCI DELL' INTERLEUKIN-6 SIGNAL TRASDUCER (*IL6ST*) E DEL  
RECETTORE DELLA LEPTINA (*LEPR*) E ALCUNI MARCATORI DI  
INSULINO-RESISTENZA E DI INFIAMMAZIONE.**

**Direttore della Scuola:** Ch.mo Prof. Silvano Todesco

**Coordinatore di Indirizzo:** Ch.mo Prof. Anotonio Tiengo

**Supervisore:** Ch.mo Prof. Angelo Avogaro

**Dottorando:** Dott.ssa Lucia Gottardo

## INDICE

<b>- RIASSUNTO</b>	1
<b>- ABSTRACT</b>	3
<b>- INTRODUZIONE</b>	5
SINDROME METABOLICA, INSULINO RESISTENZA INFIAMMAZIONE	7
TESSUTO ADIPOSO E ADIPOCHINE	9
<i>Leptina e il suo recettore</i>	11
<i>IL-6 e il suo recettore</i>	13
POLIMORFISMI E HAPLOTYPE BLOCKS	14
<b>- SCOPO DELLO STUDIO</b>	17
<b>- MATERIALI E METODI</b>	
SOGGETTI DELLO STUDIO	19
SNP GENOTYPING	20
ANALISI DEI DATI	21
<b>- RISULTATI</b>	
<i>IL6ST</i>	23
<i>LEPR</i>	25
<b>- DISCUSSIONE</b>	29
<b>- BIBLIOGRAFIA</b>	33
<b>- TABELLE E FIGURE</b>	41



## RIASSUNTO

Per sindrome metabolica si intende un'associazione di più alterazioni metaboliche tra cui obesità, alterazione del metabolismo glucidico, insulino-resistenza, dislipidemia, ipertensione arteriosa associate con un aumentato rischio di sviluppare diabete mellito tipo 2 e malattie cardiovascolari. Molti studi hanno dimostrato che tali patologie sono caratterizzate da uno stato di infiammazione cronica di basso grado. E' stato dimostrato che alcune delle molecole secrete dal tessuto adiposo sono coinvolte nel mantenimento di tale stato infiammatorio e nella patogenesi dell'insulino-resistenza e delle alterazioni metaboliche caratteristiche di tale sindrome.

Nel nostro studio abbiamo indagato se varianti genetiche comuni a livello dei loci genetici di alcune di tali molecole e/o dei loro relativi recettori fossero in qualche modo coinvolte nella modulazione di tratti fenotipici, marcatori metabolici e/o di infiammazione in soggetti non diabetici. In particolare vengono qui esposti i risultati riguardanti il gene dell' interleukin 6 signal transducer (*IL6ST*, noto anche come gp130) e del recettore della leptina (*LEPR*), due recettori con parziale omologia di sequenza genetica e simile struttura. La struttura del linkage disequilibrium di tali loci genetici è stata valutata al fine di identificare polimorfismi capaci di catturare in modo completo la loro variabilità genetica. Queste varianti genetiche sono state successivamente tipizzate in due popolazioni di soggetti non diabetici, una proveniente da Padova (PD, n=630) e l'altra da San Giovanni Rotondo (SGR, n=553) ricercando eventuali associazioni con marcatori di sindrome metabolica e infiammazione. Lo studio di *IL6ST* ha identificato delle varianti genetiche possibili determinanti di un alterato metabolismo glucidico e di altre alterazioni tipiche della sindrome metabolica, mentre lo studio del *LEPR* ha dimostrato che in una delle popolazioni alcuni polimorfismi di questo gene sono associati ai livelli plasmatici di fibrinogeno ed ai livelli di CRP, confermando l'ipotesi che molecole secrete dal tessuto adiposo possano essere alla base del noto legame tra obesità, infiammazione ed insulino-resistenza.



## ABSTRACT

The term metabolic syndrome refers to the variable clustering of abdominal obesity, impaired glucose tolerance, dyslipidemia, and high blood pressure. Together, these metabolic abnormalities are associated with a greatly increased risk of type 2 diabetes mellitus and cardiovascular disease. Growing evidence suggests that a state of chronic low-grade inflammation may contribute to such clustering of metabolic abnormalities and to their association with diabetes and increased atherosclerosis. While the molecular mechanisms underlying the link between inflammation and metabolic syndrome are not known, many studies point to proinflammatory cytokines released by the adipose tissue as possible mediators. The aim of our study was to examine whether genetic variability at the genetic loci of some of these molecules and their receptors can modulate metabolic and inflammatory traits in non-diabetic subjects. Here we show the results regarding the interleukin 6 signal transducer (*IL6ST*, also known as *gp130*) and leptin receptor (*LEPR*) genes, two receptors sharing partial sequencing homology and similar structure. We first established the LD structure at the *IL6ST* and *LEPR* loci to select htSNPs comprehensively capturing genetic variability at these loci then we evaluate whether genetic variants at *IL6ST* and *LEPR* loci can modulate metabolic and inflammatory traits in two healthy populations, one from Padova (PD, n=630) the other from San Giovanni Rotondo (SGR, n=553).

The *IL6ST* study points to some genetic variants as possible determinants of impaired glucose metabolism and other abnormalities of the metabolic syndrome, while the *LEPR* study, by finding that variability in the gene is a significant predictor of CRP and fibrinogen levels, lends further support to the hypothesis that leptin has a physiological influence on inflammatory and prothrombotic traits.



## **INTRODUZIONE**

### **SINDROME METABOLICA, INSULINO RESISTENZA ED INFIAMMAZIONE**

L'associazione di più alterazioni metaboliche nello stesso individuo è riconosciuta sin dall'inizio degli anni '60. Tale sindrome, nota con vari nomi tra cui sindrome plurimetabolica, sindrome dell'insulinoresistenza, sindrome X, sindrome metabolica, è definita dalla contemporanea presenza nello stesso individuo di alterazioni che riguardano il metabolismo glucidico, lipidico, purinico, energetico e i meccanismi di controllo della pressione arteriosa. Insieme queste alterazioni si associano ad elevato rischio cardiovascolare e di sviluppare la malattia diabetica (1). Negli ultimi anni sono stati fatti vari tentativi di creare dei criteri standardizzati per definire tale sindrome. Le differenze nei criteri utilizzati confermano le visioni contrastanti sui meccanismi patogenetici di tale sindrome.

Nel 1998 la World Health Organization (WHO) (2) elaborò una definizione che vedeva come componente principale la presenza di insulino-resistenza, identificata dalla presenza di diabete mellito tipo 2 o di alterata glicemia a digiuno o di ridotta tolleranza glucidica, oppure di glicemia a digiuno normale ( $<110$  mg/dl), ma con insulino-resistenza rilevata mediante la metodica del clamp euglicemico iperinsulinemico, associata ad almeno due delle seguenti alterazioni: ipertensione arteriosa ( $\geq 140/90$  mmHg); dislipidemia (trigliceridemia  $\geq 150$  mg/dl; colesterolo HDL  $< 35$  mg/dl nell'uomo o  $< 39$  mg/dl nelle donne); BMI  $> 30$  kg/m<sup>2</sup> e/o rapporto circonferenza/vita  $> 0,9$  nell'uomo,  $> 0,85$  nella donna; microalbuminuria ( $\geq 20$  ug/min o rapporto albumina/creatinina  $\geq 30$  mg/g).

Un'altra definizione, quella attualmente più utilizzata nella pratica clinica, è stata fornita nel 2001 dal National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III (NCEP ATP III) (3). Secondo tale definizione, i pazienti affetti da sindrome metabolica devono avere 3 o più dei seguenti criteri: obesità addominale (circonferenza vita  $> 102$  cm nell'uomo,  $> 88$  cm nella donna); ipertrigliceridemia ( $\geq 150$  mg/dl); basso colesterolo HDL ( $< 40$  mg/dl nell'uomo,  $< 50$  nella donna); ipertensione arteriosa ( $\geq 130/\geq 85$  mmHg); alterata glicemia a digiuno ( $\geq 110$  mg/dl). La raccomandazione di misurare la circonferenza vita invece che il BMI riconosce,



l'importante ruolo dell'obesità centrale in tale sindrome al di là della presenza di insulino-resistenza.

Individui con sindrome metabolica sono ad elevato rischio di sviluppare diabete mellito tipo 2 ed hanno maggior rischio di mortalità per malattie cardiovascolari (4). È stato riportato che oltre al diabete mellito ed alla malattia cardiovascolare i soggetti con sindrome metabolica sono più suscettibili ad altre condizioni patologiche tra cui ad esempio la sindrome dell'ovaio policistico (5), steatosi epatica non alcolica (6), colelitiasi, alcune forme di neoplasia, come pure è frequente il riscontro di iperuricemia (7). È stata inoltre dimostrata la prevalenza di uno stato protrombotico caratterizzato da un aumento di fibrinogeno e PAI 1 (8); disfunzione endoteliale e stato infiammatorio confermato dal riscontro di livelli aumentati di proteina C reattiva e di alcune citochine tra cui ad esempio il tumour necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e l'interleukin-6 (IL-6) (9). Alcune di queste alterazioni vengono classificate dal NCEP come fattori di rischio *emergenti* per le malattie cardiovascolari.

Recentemente l'IDF (International Diabetes Federation) ha riconosciuto che l'obesità centrale è la componente più importante della sindrome metabolica e che c'è una forte correlazione tra circonferenza vita, rischio cardiovascolare e gli altri componenti della sindrome metabolica per cui, secondo i loro criteri, una persona si definisce affetta da sindrome metabolica se è presente obesità centrale (circonferenza vita  $\geq 94$ cm e per gli uomini e  $\geq 80$ cm per donne di origine europea) associata ad almeno due dei seguenti quattro fattori: trigliceridi  $\geq 150$  mg/dL; HDL colesterolo  $< 40$  mg/dL negli uomini e  $< 50$  mg/dL nelle donne, o terapia ipolipemizzante specifica in atto; pressione arteriosa elevata (sistolica  $\geq 130$  o diastolica  $\geq 85$  mm Hg, oppure terapia antiipertensiva in atto; glicemia a digiuno  $\geq 100$  mg/dL o precente diagnosi di diabete mellito di tipo 2 (10).

Molti studi hanno dimostrato che uno stato di infiammazione cronica è presente nella sindrome metabolica e si associa alle caratteristiche alterazioni metaboliche, alla malattia diabetica e all'aumentato rischio di aterosclerosi (11). I meccanismi molecolari alla base dell'associazione tra infiammazione e sindrome metabolica non sono del tutto conosciuti, ma molti studi hanno dimostrato il ruolo mediatore di alcune citochine proinfiammatorie rilasciate

dal tessuto adiposo (12) dal momento che molte di queste molecole possono profondamente influenzare la sensibilità insulinica, lo stato infiammatorio e protrombotico.

L'insulino resistenza insieme alla presenza dei mediatori di infiammazione può portare ad uno stato di disfunzione dell'endotelio vascolare, ad anomalie nel profilo lipidico, ipertensione e danno vascolare promuovendo l'insorgenza di aterosclerosi e malattia cardiovascolare.

## **TESSUTO ADIPOSO E ADIPOCHINE**

L'obesità è dunque il fattore più importante nell'insorgenza delle malattie metaboliche. In questi ultimi anni si sono accumulate conoscenze in merito al ruolo del tessuto adiposo nella regolazione di molti processi patologici. Infatti il tessuto adiposo non è un tessuto funzionante meramente da deposito energetico, ma anche un organo endocrino che secreta specifici ormoni o sostanze dette adipochine, che agiscono da potenti messaggeri a livello muscolare, epatico e cerebrale allo scopo di mantenere il bilancio energetico globale e l'omeostasi metabolica (22). Il tessuto adiposo modula il metabolismo rilasciando acidi grassi liberi e glicerolo, specifici ormoni e alcune citochine (11, 13, 14). Nell'obesità la produzione di molte di queste molecole è aumentata ed è stato dimostrato che molte di queste hanno azione proinfiammatoria ed un effetto negativo sull'insulino sensibilità.

Adiponectina, leptina, visfatina e resistina sono alcune di queste cosiddette adipochine, molecole che forniscono un importante legame tra obesità, insulino-resistenza e il correlato stato infiammatorio. Adiponectina e leptina sono quelle prodotte in quantità più abbondante dagli adipociti. Altri prodotti del tessuto adiposo sono citochine come il TNF $\alpha$ , IL-6, interleuchina 1 (IL-1), il CC-chemokine ligand 2 (CCL2, noto anche come MCP1), RBP4 e alcuni mediatori della trombogenesi, come il plasminogen-attivator inhibitor type 1 (PAI-1) e alcuni fattori del complemento. TNF $\alpha$ , IL-6, MCP-1, visfatin e PAI-1 sono anche espresse a livelli elevati nei macrofagi ed in altre cellule. TNF $\alpha$ , IL-6, leptina e altre citochine proinfiammatorie sembrano partecipare nell'induzione e mantenimento dello stato di

infiammazione subacuto associato all'obesità. MCP-1 ed altre chemochine hanno ruolo essenziale nel reclutamento dei macrofagi nel tessuto adiposo.

Le adipocitochine sono responsabili dell'attivazione di segnali che promuovono lo sviluppo di insulino-resistenza e diabete mellito tipo 2 (23). Ad esempio il Retinol-binding protein-4 (RBP4), un altro dei prodotti del tessuto adiposo, induce insulino-resistenza attraverso la riduzione del phosphatidylinositol-3-OH kinase(PI(3)K) signalling nel muscolo e un'aumentata espressione dell'enzima della gluconeogenesi fosfoenolpiruvato carbossichinasi nel fegato (15). Anche l'aumentato rilascio di citochine come il TNF- $\alpha$ , IL-6, monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) e altri prodotti dei macrofagi e delle altre cellule che popolano il tessuto adiposo ha un ruolo nell'insorgenza dell'insulino-resistenza (14-17). TNF- $\alpha$  and IL-6 agiscono attraverso i loro recettori stimolando le vie della c-Jun aminoterminal kinase (JNK) e I $\kappa$ B kinase- $\beta$  (IKK- $\beta$ )/nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), risultando in una upregulation di mediatori dell'infiammazione e nell'attivazione delle suppression of cytokine signaling (SOCS) proteins (18) o della inducibile nitric oxide synthase (iNOS) (19) coinvolte nell'insorgenza di insulino-resistenza. Solo adiponectina e un'altra adipocitochina recentemente scoperta detta VASPIN (visceral adipose-tissuederived serine protease inhibitor), hanno azione insulino-sensibilizzante (24). Adiponectina agisce da insulino-sensibilizzante stimolando l'ossidazione degli acidi grassi in modo dipendente dall'attivazione di AMP-activated protein kinase (AMPK) e peroxisome proliferator activated receptor- $\alpha$  (PPAR- $\alpha$ ) (16).

Il rilascio di acidi grassi liberi da parte del tessuto adiposo, in particolare quello viscerale, è un'altra componente critica nella modulazione dell'insulino sensibilità. I livelli di acidi grassi sierici sono aumentati nell'obesità e nel diabete mellito tipo 2 e provocano insulino-resistenza con azione diretta su vari tessuti (20, 21).

Verranno qui sotto descritte le proprietà e le principali funzioni di leptina e IL-6 e dei loro rispettivi recettori che sono stati oggetto di questo studio.

### *Leptina e il suo recettore*

La leptina è una delle prime adipochine ad essere stata scoperta. È una proteina circolante di 16 Kda prodotta quasi esclusivamente dagli adipociti. Originariamente scoperta come la proteina mancante nei topi ob/ob (25), la leptina ha ruolo regolatore nella funzione neuroendocrina, l'omeostasi energetica, la regolazione del peso corporeo, l'ematopoiesi, l'angiogenesi ed è inoltre un mediatore della risposta immunitaria e dell'infiammazione (26-29). Ha una struttura simile a quella di IL-6 ed altre citochine come IL-12 e il granulocyte colony stimulating factor e nel complesso è considerata come una adipochina proinfiammatoria. Il suo ruolo principale è comunque quello di regolatrice dell'appetito: con l'aumento della massa adipocitaria, i livelli di leptina aumentano, segnalando ai centri ipotalamici di ridurre l'apporto di cibo e di aumentare la spesa energetica. L'opposto accade in condizioni di restrizione calorica (27). I topi ob/ob che hanno una mutazione del gene codificante la leptina e i topi db/db, portatori di una mutazione a livello del recettore, sono obesi e come tali vengono pertanto usati in molti studi come modelli di obesità. I livelli sierici di leptina sono proporzionali alla massa adiposa totale sia negli uomini che nel topo e sono 2-3 volte più elevati nelle donne che negli uomini (25).

Oltre che dal tessuto adiposo in realtà la leptina è prodotta anche da altri tessuti tra cui la placenta, midollo osseo, stomaco, muscolo e encefalo (33). Nei monociti e macrofagi la leptina aumenta la produzione di citochine pro-infiammatorie come TNF, IL-6 e IL-12 e in modelli animali l'espressione di leptina è aumentata in condizioni associate con il rilascio di citochine pro-infiammatorie, come ad esempio in caso di sepsi (31,32).

I risultati di studi in vitro e su modelli animali hanno dimostrato che la leptina oltre agli effetti proinfiammatori ha anche effetti protrombotici. Tali effetti possono spiegare il legame tra aumentata massa adiposa e aumentata aterogenesi (34-37).

In ogni modo le prove per tale ruolo negli uomini restano incomplete. In alcuni studi i livelli plasmatici di leptina correlavano positivamente con markers dell'infiammazione anche dopo che i parametri venivano aggiustati per le misure di adiposità (38-40) e correlavano in modo indipendente con le calcificazioni delle arterie coronarie (41). In accordo con questi

risultati, in uno studio prospettico, la leptinemia è stata identificata come un fattore di rischio cardiovascolare indipendente (42). In altri studi invece l'associazione tra leptinemia e markers di infiammazione o di aterosclerosi scompariva dopo che i parametri venivano aggiustati per il peso corporeo (43). In altri studi di intervento la somministrazione di leptina aumentava TNF $\alpha$ , soluble TNF $\alpha$  receptor, e i livelli di proteina C reattiva (CRP) ma solamente in soggetti magri e non negli obesi (44-46) con il limite però che la risposta alla leptina esogena non può mimare la complessa azione fisiologica di questa adipochina.

La leptina esercita i suoi effetti attraverso un recettore, membro della class I cytokine receptor family, che include anche il recettore per l'interleuchina 6 (47). Il gene del recettore della leptina si trova sul cromosoma 1p31 (*LEPR*), ha varie isoforme dovute a splicing alternativo, tutte condividono lo stesso dominio extracellulare a cui si lega la leptina ma possiedono un dominio intracitoplasmatico di diversa lunghezza (47,48). Inizialmente identificato nell'ipotalamo, il recettore è in realtà distribuito in vari tessuti, incluso il fegato, le cellule ematopoietiche, rene, polmone e cuore (48).

È noto che molti degli effetti pro-infiammatori della leptina sono mediati dalla isoforma lunga del recettore della leptina, che viene espressa soprattutto dalle cellule endoteliali e dai leucociti.

È noto da tempo che la leptina agisce attraverso il suo recettore primariamente attivando la via Janus kinase (JAK)/Signal transducers and activator of transcription (STAT), cascata di segnali che porta all'alterazione della trascrizione di alcuni geni che mediano i processi metabolici (49), anche se in un recente è stato dimostrato che la leptina agisce anche direttamente sull'AMP kinasi in modo indipendente dai cambiamenti dell'espressione genica (50). Le vie del segnale attraverso il recettore della leptina sono anche responsabili dell'attivazione delle suppressor of cytokine signaling (SOCS) proteins molecole coinvolte nella regolazione di molte citochine e che possono regolare negativamente il segnale della leptina portando a leptino-resistenza.

### ***IL-6 e il suo recettore***

IL-6 è una molecola molto studiata a causa dei suoi pleiotropici effetti: ha un ruolo chiave come mediatore della risposta infiammatoria, i suoi livelli sierici sono aumentati nei pazienti obesi e/o diabetici e in condizioni caratterizzate da insulino-resistenza (51).

IL-6 appartiene ad una famiglia di citochine implicate nella regolazione della differenziazione, sopravvivenza, apoptosi e proliferazione cellulare che include anche molecole quali la interleukin 11 (IL-11), leukemia inhibitory factor (LIF), e ciliary neurotrophic factor (CNTF), oncostatin M (OSM), cardiotrophin-1 (CT-1) (52). IL-6 e le altre citochine esercitano le loro azioni attraverso un recettore eterodimerico che consiste di due glicoproteine di membrane: una subunità legante la citochine e una glicoproteina detta interleukin 6 transducer o *IL6ST* (conosciuta anche come gp130), che è responsabile della trasduzione del segnale e della stabilizzazione del complesso ligando-subunità alfa (52). Mentre la subunità alfa (*IL6R* nel caso di IL-6) è specifica per ogni citochina, *IL6ST* è condiviso da tutte le citochine della famiglia. *IL6ST* è espresso quasi ubiquitariamente, mentre l'espressione di *IL6R* è prevalentemente confinata agli epatociti e ai leucociti. Esiste una forma solubile biologicamente attiva di *IL6R* (*sIL6R*), che legandosi a IL-6 può attivare *IL6ST* nelle cellule che non esprimono le *IL6R* sulla membrana con un meccanismo che viene chiamato "transignaling" (52). Tale meccanismo è alla base degli effetti pleiotropici di IL6 (Figura 1).

Esistono due diverse vie attraverso le quali la forma solubile di *IL6R* viene prodotta, una attraverso il clivaggio dalla superficie cellulare mediante specifiche proteasi e l'altro mediante splicing alternativo della molecola che viene prodotta priva del suo dominio transmembrana (Figura 1).

IL-6 lega prima lo specifico recettore, la subunità alfa, e successivamente sulla membrana gp130 forma un dimero, che attiva il segnale intracellulare attraverso una cascata di fosforilazioni di residui tirosinici. Le vie attivate sono simili a quelle attivate dal *LEPR* (Figura 2), ma in *IL6ST* sono presenti più siti di fosforilazione rispetto al *LEPR*.

In letteratura sono state riportate associazioni di alcuni polimorfismi nel gene di *IL6R* con obesità, diabete mellito tipo 2 e insulino-resistenza (53-55). Un'associazione tra il polimorfismo di *IL6Rα* Asp358Ala e obesità è stato descritto in Pima Indians non diabetici (53). Lo stesso polimorfismo era anche associato con il diabete mellito tipo 2, ma non con il BMI in una popolazione di Caucasici danesi (55) e con caratteristiche della sindrome metabolica in una popolazione di soggetti Caucasici spagnoli (56). Al contrario di *IL6R*, il ruolo della variabilità genetica di *IL6ST* nello sviluppo dell'insulino-resistenza e della sindrome metabolica è stato finora poco studiato.

Uno studio riguardava l'associazione di un polimorfismo di questo gene con iperandrogenismo in un gruppo di donne (65). Il recente studio di Luchtefeld invece dimostrava che topi knockout per gp130 a livello epatico in un background pronò allo sviluppo di aterosclerosi esibivano meno aterosclerosi e avevano un ridotto numero di macrofagi a livello della placca. Lo stesso gruppo dimostrava anche che alcuni polimorfismi di *IL6ST* erano associati significativamente con malattia coronarica (66).

## **POLIMORFISMI ED HAPLOTYPE BLOCKS**

La resistenza insulinica è un tipico esempio di “tratto complesso” ad eziologia multifattoriale, cioè una malattia che riconosce una suscettibilità genetica. Il gene non presenta quasi mai una mutazione rara che compromette gravemente o completamente la funzione o l'espressione della proteina codificata ma, più facilmente, presenta variazioni strutturali relativamente frequenti (polimorfismi) compatibili con disfunzioni modeste nella sintesi o nella funzione proteica.

Un locus polimorfico è un locus in cui gli alleli o varianti sono tali che l'allele più comune è presente con una frequenza inferiore al 99% nella popolazione (es. se il locus è biallelico, la mutazione più rara deve essere presente con una frequenza maggiore dell'1% nella popolazione). Un polimorfismo è il risultato di una mutazione. Il più semplice dei polimorfismi è il risultato della mutazione di una singola base in cui un nucleotide viene sostituito con un altro ed è perciò chiamato “single nucleotide polymorphism” (SNP) (64).

Alcuni SNPs possono avere diretta influenza su una malattia, ma spesso sono semplicemente un marker di diversità biologica in linkage disequilibrium con il fattore genetico realmente responsabile di tale fenotipo. I polimorfismi possono essere presenti ovunque nel genoma, all'interno di sequenze di esoni, introni, promotori o enhancers e dunque influenzare, in base alla posizione, direttamente la struttura della proteina, lo splicing o l'espressione del gene. SNPs in regioni codificanti le proteine sono detti non-sinonimi o sinonimi se modificano o non modificano rispettivamente la sequenza aminoacidica del prodotto del gene. Gli SNP non sinonimi sono detti anche coding SNPs (63). Gli SNP in regioni introniche e intergeniche si trovano in regioni non codificanti. Di solito è più probabile che un coding SNP possa influire sulla funzione della proteina (63) ma in realtà tutti i tipi di SNP possono causare malattia, ad esempio alterando la regolazione dell'espressione di un gene e la trascrizione di una proteina.

Gli SNPs vengono dunque utilizzati negli studi di associazione al fine di identificare le basi genetiche di malattie comuni a cosiddetta eziologia complessa.

Maggiori informazioni possono essere assunte combinando gli SNPs in aplotipi dove per aplotipo si intende un gruppo di alleli sullo stesso cromosoma che vengono ereditati insieme. È noto da tempo che il genoma umano può essere suddiviso in regioni dette "haplotype blocks", in cui SNPs all'interno sono fortemente associati tra loro, in forte linkage disequilibrium, dove per linkage disequilibrium si intende l'associazione non casuale di alleli di loci differenti in una popolazione. Queste zone sono separate da cosiddetti "hotspots", ove fenomeni di ricombinazione genica (crossing over) avvengono più frequentemente.

Dunque le informazioni date dagli SNPs all'interno di ogni blocco possono essere ridondanti, in altre parole dalle informazioni date da un singolo SNP si possono ricavare le informazioni riguardanti gli altri, per cui la maggior parte degli aplotipi in un block può essere identificata usando un numero minore di SNPs, detti haplotype tagging SNPs o htSNPs. L'utilizzo di questi htSNP è in grado di ridurre gli sforzi richiesti per intraprendere studi di associazione in larga scala.

Ci sono stati vari progetti di catalogazione degli SNP comuni su progetti sovvenzionati da governi e industrie e molti di questi sono ancora in corso (61,62).



Vari metodi sono stati creati per identificare htSNPs ottimali, inclusa la semplice ispezione e approcci analitici. Il recente International HapMap Project ha delineato gli SNPs e gli haplotype blocks presenti lungo il genoma di quattro differenti gruppi di soggetti appartenenti a diverse etnie.

## SCOPO DELLO STUDIO

Se leptina e IL-6, come molte altre molecole secrete dal tessuto adiposo, sono modulatrici della risposta infiammatoria e dell'insulino-resistenza, varianti genetiche con effetto sulla espressione e/o funzione dei loro rispettivi recettori potrebbero avere un ruolo nel mediare le attività di queste molecole. Per valutare tale ipotesi abbiamo condotto questo studio di associazione genetica il cui scopo era di stabilire la struttura di linkage disequilibrium di geni di alcune molecole secrete dal tessuto adiposo e dei loro rispettivi recettori e di selezionare mediante l'aiuto di software e database disponibili online gli haplotype tagging (ht) SNPs in grado di catturare in modo completo la variabilità genetica di tali loci. Una volta individuati, tali htSNPs sono stati genotipizzati in due popolazioni di soggetti sani una proveniente da Padova, l'altra da San Giovanni Rotondo allo scopo di individuare eventuali associazioni con caratteristiche fenotipiche dei soggetti, marcatori del metabolismo glucidico e lipidico. L'associazione con alcuni marcatori di infiammazione, il cui dosaggio era disponibile, è stata valutata nella popolazione di Padova

Sono qui illustrati i risultati riguardanti lo studio del recettore della leptina (67) e *IL6ST* [Gottardo L et al., il lavoro verrà pubblicato sulla rivista Obesity con il titolo: "A Polymorphism at the *IL6ST* (gp130) Locus is Associated with Traits of the Metabolic Syndrome"].



## **MATERIALI E METODI**

### **SOGGETTI**

Soggetti sani di origine Caucasica sono stati reclutati tra gli impiegati del Comune della città di Padova (n=630) e dell'Ospedale 'Casa Sollievo della Sofferenza' di San Giovanni Rotondo in provincia di Foggia (68).

Tutti i soggetti avevano glicemia plasmatica a digiuno < 7 mmol/l al momento dello screening e non assumevano farmaci inclusi anche gli ormoni estroprogestinici.

Il protocollo dello studio e il consenso informato sono stati approvati dai rispettivi comitati etici locali.

Tutti i soggetti sono stati esaminati tra le 8:00 e le 9:00 dopo una notte di digiuno. L'altezza e il peso sono stati utilizzati per calcolare l'indice di massa corporea (BMI). La circonferenza vita, il valore massimo tra il margine dell'ultima costa e la cresta iliaca, è stato misurato nei soggetti in posizione eretta dallo stesso operatore, utilizzando un metro di plastica. Le indagini biochimiche e l'estrazione del DNA sono state eseguite su campioni di sangue prelevati in un unico momento.

La glicemia plasmatica, l'insulinemia sierica e il profilo lipidico (colesterolo sierico totale, HDL colesterolo e trigliceridi) sono stati dosati a digiuno utilizzando kit enzimatici disponibili in commercio.

La leptina plasmatica è stata dosata mediante IRMA (DSL, Webster, TX). Il fibrinogeno plasmatico è stato invece dosato mediante metodo di Clauss con un coagulometro automatizzato (Dasit, Milan, Italy), la proteina C reattiva (CRP) con metodo immunonefelometrico (N *High Sensitivity* CRP, Dade Behring Diagnostics, Deerfield, IL) e l'interleuchina 6 (IL-6) mediante ELISA (HS600 Quantikine kit, R&D Systems, Minneapolis, MN). I coefficienti di variazione erano meno del 10% per tutti i saggi. IL-6 è stata misurata in 425 dei 630 soggetti provenienti da Padova, le cui caratteristiche non differivano significativamente da quelle dell'intera popolazione dello studio.

La sensibilità insulinica è stata calcolata utilizzando l'homeostasis model assessment index ( $HOMA_{IR}$ ) calcolato dalla formula:  $HOMA_{IR} = \text{fasting serum insulin (mU/l)} \times \text{fasting plasma glucose (mmol/l)} / 22.5$ .

Nello studio di *IL6ST*, per ogni soggetto è stato calcolato un punteggio definito come metabolic score, basato sulla presenza del numero di componenti della sindrome metabolica secondo i criteri del National Cholesterol Education Program – Adult Treatment Panel III (NCEP/ATP-III) (3): circonferenza vita > 102 cm per gli uomini e > 88 cm per le donne, pressione sistolica  $\geq 130$  mmHg o diastolica  $\geq 85$  mmHg; HDL colesterolo sierico < 40 mg/dl per gli uomini e < 50 mg/dl per le donne; trigliceridi sierici  $\geq 150$  mg/dl; e glicemia plasmatica  $\geq 110$  mg/dl.

### **SNP GENOTYPING**

Lo studio dei genotipi di questi soggetti è stato eseguito presso i laboratori del Joslin Diabetes Center (Section of Genetics and Epidemiology) di Boston (USA).

La qualità delle procedure di genotipizzazione è stata testata in ogni studio includendo sei campioni controllo in cieco in ogni 96-well assay. La media di replicazione dei risultati nei controlli era del 99%.

### **IL6ST.**

Per completare le informazioni disponibili sul database di HapMap ([www.hapmap.org](http://www.hapmap.org)), tre SNPs selezionati dal dbSNP database (rs11746627, rs11747625 e rs3729960 – noto anche come Arg148Gly) sono stati genotipizzati nel pannello di soggetti caucasici dell'HapMap project (CEU HapMap panel) per mezzo di PCR seguita da single base extension/fluorescence polarization (AycloPrime-FP SNP Detection System) utilizzando a Wallac VICTOR<sup>2</sup> Multilabel Plate Reader (Perkin-Elmer, Boston, MA). Per lo studio di associazione, gli htSNPs sono stati tipizzati nei gruppi di studio per mezzo dei TaqMan assays (Applied Biosystems, Foster City, CA) implementati con un ABI PRISM 7700 HT Sequence Detection System, ad eccezione di rs3729960, che è stato genotipizzato per mezzo della single base extension/fluorescence polarization.

## ***LEPR***

Gli SNPs per lo studio del linkage disequilibrium sono stati tipizzati nel pannello dei soggetti caucasici dell'HapMap project per mezzo di PCR seguita da single base extension/fluorescence polarization (AycloPrime-FP SNP Detection System) utilizzando a Wallac VICTOR<sup>2</sup> Multilabel Plate Reader (Perkin-Elmer, Boston, MA). Per lo studio di associazione, tutti gli htSNPs sono stati tipizzati nei gruppi di studio per mezzo dei TaqMan assays (Applied Biosystems, Foster City, CA) implementati con un ABI PRISM 7700 HT Sequence Detection System, ad eccezione degli SNP rs4655802 e rs3934256, che sono stati tipizzati mediante single base extension/fluorescence polarization.

## **ANALISI DEI DATI**

In ogni locus polimorfico la distribuzione dei genotipi e' stata testata per l'equilibrio di Hardy Weinberg.

## ***IL6ST***

La stima dei coefficienti di linkage disequilibrium ( $D'$  and  $r^2$ ) e' stata fatta con l'Haploview software package. I blocchi di linkage disequilibrium sono stati determinati secondo il metodo degli intervalli di confidenza utilizzando i criteri di Gabriel (57). La frequenza degli aplotipi e degli htSNPs e' stata determinata per mezzo di algoritmi implementati nell'Haploview software utilizzando 0.04 come frequenza soglia per definire gli aplotipi comuni.

Insulinemia,  $HOMA_{IR}$ , e trigliceridemia sono state analizzate dopo trasformazione in logaritmo a causa della loro distribuzione asimmetrica. I tratti metabolici sono stati confrontati tra i gruppi genotipici con ANCOVA includendo l'eta', sesso, e BMI come covariabili, con l'eccezione di BMI e circonferenza vita per cui l'analisi e' stata aggiustata solamente per eta' e sesso. Un p value nominale di 0.05 e' stato considerato come significativo.

Nel caso di rs715180, gli omozigoti CC erano meno di dieci in entrambe le popolazioni per cui sono stati considerati insieme con gli eterozigoti AC per le analisi statistiche.

La significativita` del trend di associazione tra gli SNPs e le diverse classi di metabolic score e` stata determinata per mezzo di multivariable ordinal logistic regression con le classi di metabolic score come outcome e con i genotipi degli SNPs, eta` e sesso come predictors. La differenza nel trend di associazione tra le popolazioni studiate e` stato studiato aggiungendo un' interaction term (SNP 0,1 x population 0,1) all' ordinal logistic regression model.

### ***LEPR***

I coefficienti di linkage disequilibrium ( $D'$  and  $r^2$ ) sono stati stimati utilizzando il GOLD software package (58). Le frequenze degli aplotipi sono state ricavate utilizzando il sistema Haplo Stats (59). La definizione degli Haplotype block e la selezione degli haplotype-tagging SNP (htSNPs) e` stata fatta per mezzo di algoritmi implementati nell' HapBlock software (60), con  $\alpha$  (minimal proportion of chromosomes accounted by common  $[\geq 0.05]$  haplotypes)=85%.

Per la loro distribuzione asimmetrica, fibrinogeno e CRP sono stati prima trasformati in logaritmo e poi aggiustati per eta`, sesso, BMI, circonferenza vita, leptinemia, e fumo di sigaretta utilizzando il programma SAS (Cary, NC).

La significativita` dell'associazione tra valori aggiustati del fibrinogeno e CRP e la variabilita` genetica in ogni blocco e` stata determinata utilizzando F tests in un modello di regressione lineare che includeva tutti gli htSNPs del blocco in esame. Nel caso di una associazione significativa dei markers di infiammazione con uno dei blocchi, il contributo di ogni htSNP in quel blocco e` stato valutato per mezzo di modelli di regressione lineare.

L' associazione tra i marcatori metabolici e gli aplotipi comuni di *LEPR* e` stata analizzata con lo score statistico proposto da Schaid et al. ed implementato nella funzione HAPLO.SCORE dell' Haplo Stats software (59). Questo metodo ha permesso l'aggiustamento per variabili non genetiche. Un p value di 0.05 era considerato significativo.

## RISULTATI

### *IL6ST*

Il gene di *IL6ST*, noto anche come gp130, si trova sul cromosoma 5, e' lungo 54Kb ed e' formato da 17 esoni. Per selezionare dei marcatori in grado di catturare in modo completo la variabilita' di tale locus genetico, i genotipi di 25 SNPs comuni, aventi cioe' una frequenza dell'allele minore (MAF)  $\geq 0.05$ , presenti nel database di HapMap (HapMap Public Release #21), sono stati integrati con quelli di altri tre SNPs (rs11746627, rs11747625, and rs3729960) che erano stati tipizzati da noi nel pannello della popolazione Caucasica di HapMap. Un totale di 28 SNPs (MAF  $\geq 0.05$ ) coprivano l'intero gene piu' 9.76 Kb a monte (regione 5') e 320 bp a valle (regione 3') del locus per un totale di 64.1 Kb, in media uno SNP ogni 2.1 Kb. Elaborando i dati dei genotipi con il software Haplowiew si evidenziava una unica larga regione di linkage disequilibrium (LD) comprendente l'intero locus di *IL6ST*. Cinque aplotipi comuni ( $\geq 5\%$ ) inclusi in questo singolo blocco potevano essere definiti da quattro haplotype-tagging (ht) SNPs: rs715180 nella 5'flanking region, rs3729960 (una sostituzione non sinonima nell'esone 13), rs11574780 e rs10940495 negli introni (Figura 3).

Questi quattro SNPs sono stati valutati in due popolazioni di soggetti non diabetici di origine europea, una proveniente da Padova (n=630), l'altra da San Giovanni Rotondo (n=553) allo scopo di valutare eventuali associazioni tra htSNPs e caratteri metabolici quali l'indice di massa corporea (BMI), la circonferenza vita, la glicemia a digiuno (fasting blood glucose, FBG), trigliceridemia (TG), colesterolo HDL (HDL), e pressione arteriosa sistolica (systolic blood pressure, SBP) e diastolica (diastolic blood pressure, DBP). E' stata inoltre valutata l'associazione con un semplice indice di insulino-resistenza quale l'Homeostasis Model Assessment Index (HOMA<sub>IR</sub>) calcolato secondo la formula descritta da Matthews et al. Le caratteristiche cliniche delle due popolazioni sono illustrate nella tabella 1.

La distribuzione dei genotipi era in equilibrio di Hardy-Weinberg in ogni locus e non vi erano differenze significative nella distribuzione degli alleli tra le due popolazioni.

Si osservavano differenze significative nei livelli dei singoli tratti metabolici in piu' loci polimorfici, anche se i parametri metabolici coinvolti nella associazione erano diversi tra i



gruppi. Nella popolazione di Padova, tre dei quattro htSNPs erano significativamente associati con la glicemia a digiuno (Tabella 2). A livello di rs715180, gli omozigoti per l'allele maggiore avevano glicemia a digiuno più elevata rispetto ai portatori dell'allele minore ( $p=0.02$ ), mentre a livello di rs10940495 si osservava un progressivo aumento della glicemia dagli omozigoti per l'allele maggiore agli eterozigoti e portatori di dell'allele minore ( $p=0.05$ ). A livello di rs3729960, gli eterozigoti avevano livelli di glicemia più alti rispetto agli omozigoti ( $p=0.02$ ), sebbene questi dati debbano essere presi con cautela visto che gli omozigoti per l'allele minore erano solamente tredici. Di questi tre SNP, rs715180 era associato anche con l'indice  $HOMA_{IR}$  mentre rs3729960 con i livelli di trigliceridi (Tabella 2). Vari altri trends di associazione si osservavano nella stessa direzione di quella descritta sopra anche se non raggiungevano la significatività con la numerosità di questo campione (per esempio, trigliceridemia e rs715180, HDL e rs10940495).

L'analisi degli aplotipi (dati non riportati) non ha rilevato alcun effetto genetico in aggiunta a quelli osservati nell'analisi dei singoli SNPs.

Nella popolazione di SGR, non si è rilevata alcuna associazione tra gli stessi htSNPs e glicemia o  $HOMA_{IR}$  (Tabella 3). In questa popolazione, rs715180 si associava con i livelli di HDL ( $p=0.01$ ), mentre rs3729960 mostrava un'associazione con la circonferenza vita ( $p=0.005$ ) e la pressione sistolica (SBP) ( $p=0.02$ ). Nonostante le associazioni con diversi parametri, era interessante notare come i risultati ottenuti nelle due popolazioni presentavano una corrispondenza fisiologica: per esempio il genotipo di rs715180 (AA) associato con le HDL basse in SGR era lo stesso che si associava a glicemia elevata e sensibilità insulinica più bassa nella popolazione di Padova; similmente il genotipo di rs3729960 che era associato con la circonferenza vita più larga e la pressione sistolica più alta in SGR era lo stesso che si associava con la glicemia più alta in PD.

Basandosi su questi risultati abbiamo ipotizzato che polimorfismi del locus *IL6ST* potessero determinare una propensione alla sindrome metabolica, anche se il tratto specifico dell'insulino resistenza che mostrava un'associazione con questi SNPs poteva variare tra le popolazioni. I soggetti dello studio sono stati pertanto suddivisi in tre gruppi basati sul numero

di componenti della sindrome metabolica, cioè obesità viscerale, ipertrigliceridemia, basso HDL colesterolo, ipertensione, ed iperglicemia definite secondo i criteri del NCEP/ATP-III criteria (3). I tre gruppi erano:

1. nessuna componente della sindrome metabolica, cioè soggetti normali;
2. uno o due componenti (i.e., soggetti che portatori di anomalie metaboliche, ma non sufficienti a diagnosticare la sindrome metabolica)
3. tre o più componenti (i.e., soggetti affetti da sindrome metabolica).

In entrambe le popolazioni si osservava una progressiva riduzione nella frequenza dei portatori dell'allele minore di rs715180 se si andava da individui senza componenti a quelli con tre o più componenti ( $p$  for trend=0.09 in PD and 0.044 in SGR, aggiustati per età e sesso) (Figura 4). Questo trend non era significativamente diverso nelle due popolazioni ( $p$  for interaction=0.69) e raggiungeva un  $p$  value di 0.006 nei due studi combinati (Figura 4). In confronto agli omozigoti per l'allele maggiore i portatori dell'allele minore avevano una riduzione del 40% nella probabilità di avere uno o più componenti della sindrome metabolica (OR = 0.6, 95% CI 0.4-0.8). Risultati simili si ottenevano anche se venivano utilizzati nella definizione di sindrome metabolica i criteri dell'IDF (10) invece di quelli del NCEP/ATP-III. Questo tipo di analisi è stata condotta anche per gli altri tre SNPs ma non ha rilevato nessun trend significativo (dati non riportati).

L'analisi dell'associazione tra htSNPs di *IL6ST* e marcatori di infiammazione testati nella popolazione di PD, tra cui CRP, fibrinogeno e IL6 non ha rilevato alcuna associazione significativa.

### ***LEPR***

Il recettore della leptina è un gene lungo circa 220 Kb, comprende 20 esoni e si trova sul cromosoma 1p31. Per meglio definire la variabilità genetica del locus di *LEPR* sono stati selezionati 31 SNPs comuni ( $MAF \geq 0.05$ ) dal database di dbSNP e del progetto Celera e genotipizzati nel pannello dei Caucasiche dell'HapMap project. Tali polimorfismi erano presenti all'interno del gene e in 15 Kb a monte (5') e a valle (3') del gene. I genotipi di

questi 31 SNPs sono stati poi integrati con quelli di altri 40 SNPs disponibili nel database di HapMap. Il risultante set di 71 polimorfismi spaziava nel locus un totale di 247 Kb, corrispondente in media ad uno SNP ogni 3.5 Kb.

L'analisi del linkage disequilibrium di questo locus genetico ha rilevato quattro blocchi di linkage disequilibrium (figura 5).

Gli aplotipi comuni, aventi cioè una frequenza nella popolazione  $\geq 5\%$ , potevano essere definiti da 11 haplotype-tagging SNPs (htSNP) le cui caratteristiche sono evidenziate nella Tabella 4. Come per il gene di *IL6ST* tali htSNPs sono stati tipizzati nelle due popolazioni in esame per evidenziare eventuali associazioni con marcatori di sindrome metabolica e alcuni marcatori di infiammazione che erano stati dosati nella popolazione di Padova.

La distribuzione dei genotipi era in equilibrio di Hardy-Weinberg in ogni locus.

Inaspettatamente non è stata rilevata alcuna associazione tra gli htSNPs e markers caratteristici della sindrome metabolica come era stato rilevato per *IL6ST* (dati non riportati). Al contrario invece in questo studio veniva evidenziata l'associazione con alcuni marcatori di infiammazione, in particolare fibrinogeno e CRP, nei soggetti di Padova (325 uomini e 305 donne) (tabella 5).

I livelli plasmatici di fibrinogeno erano significativamente associati con i tre htSNPs del blocco n°4 ( $p=0.005$ ) e responsabili del 3% della variabilità di questo trait ( $r^2=0.030$ ) (Tabella 6). La stessa associazione si osservava anche con CRP, anche se con un p value meno significativo ( $p=0.049$ ,  $r^2=0.022$ ). I livelli sierici di CRP erano in parte associati anche con il secondo blocco ( $p=0.053$ ), forse in seguito ad un residuo linkage disequilibrium con il blocco n°4 in quanto il p value per il blocco n°2 perdeva significatività se gli htSNPs del blocco n°4 venivano aggiunti al modello di analisi statistica ( $p=0.11$ ). Risultati simili si osservavano anche aggiustando l'analisi solamente per età e sesso. Nessuna associazione invece si osservava con i livelli di leptina, mentre era evidente una associazione marginale con IL-6 ( $p=0.06$ ). Il dosaggio di IL-6 era disponibile solo per 425 di questi soggetti.

Nella tabella 7 sono riportati i livelli medi di fibrinogeno, CRP, leptina e IL6, secondo i genotipi dei tre htSNPs del blocco n°4. E' evidente come il fibrinogeno sia piu' alto del 10% nei portatori omozigoti dell'allele minore di rs379042 rispetto agli omozigoti per l'allele maggiore, con valori intermedi negli eterozigoti ( $p=0.015$ ). CRP variava in modo simile in questo locus senza pero' raggiungere la la significativita' in questo campione. A livello di rs1805096, CRP era piu' elevata del 32% ( $p=0.011$ ) e il fibrinogeno del 5% ( $p=0.007$ ) negli portatori omozigoti dell'allele maggiore rispetto ai portatori dell'allele minore. Questo polimorfismo era anche associato con IL-6, anche se la maggior parte della significativita' sembrava dovuta agli eterozigoti che avevano livelli piu' bassi rispetto agli omozigoti . Non si osservava invece alcuna associazione tra i markers infiammatori e rs1137101.

La figura 6 mostra le frequenze dei genotipi di rs3790432 e di rs1805096 in soggetti con livelli bassi ( $<1$  mg/l), intermedi (1-3 mg/l) ed elevati ( $>3$  mg/l) di CRP. Si puo' notare come la frequenza degli omozigoti per l'allele minore di rs3790432 (TT) aumentava mentre quella degli omozigoti per l'allele maggiore progressivamente diminuiva andando dalla classe con CRP piu' bassa a quella con CRP piu' alta ( $p$  for trend = 0,021). Se paragonati dunque agli omozigoti per l'allele minore (TT) gli omozigoti per l'allele maggiore (AA) avevano un rischio di tre volte maggiore di essere nella classe con CRP elevata (OR 2.97, 95% CI 1.2-7.4). Un pattern opposto si osservava per rs 1805096, con la frequenza degli omozigoti per l'allele minore (TT) in diminuzione rispetto agli omoziogoti per l'allele maggiore andando dalla classe con CRP piu' `bassa a quella piu' alta ( $p$  for trend 0.05).

I tre SNPs del blocco n° 4 definivano 5 aplotipi comuni, aventi cioe` una frequenza maggiore del 5% nella nostra popolazione, illustrati nella tabella 8 insieme al loro score statistico per associazione con fibrinogeno e CRP. Uno score positivo denota un'associazione livelli elevati, mentre uno negativo con livelli bassi. L'aplotipo TGC, che corrisponde all'allele minore del htSNP rs3790432, riportava il punteggio piu' alto sia per l'associazione con il fibrinogeno che per CRP. Il valore negativo piu' basso si osservava con l'aplotipo 'AAT' per quanto riguarda l'associazione con il fibrinogeno e con 'AGT' per CRP, la T di questi aplotipi corrispondente all'allele minore di rs1805096. L'associazione con livelli infiammatori elevati

sembrava dunque essere guidata dal allele minore di rs3790432, mentre quella con i livelli bassi dall' allele minore di rs1805096.

Tre mutazioni (Lys109Arg , Gln223Arg, Asn656Lys) sono state descritte nella regione del blocco #4. Per questo abbiamo ipotizzato che l'associazione di questo blocco con il fibrinogeno e CRP poteva riflettere l'effetto di uno o piu' di queste varianti aminoacidiche. Gln223Arg corrispondente a rs1137101, uno degli htSNP studiati, non era risultato associato con CRP o fibrinogeno (Table 7) e risultati negativi si sono ottenuti anche per le altre due varianti. Quando pero' tali mutazioni venivano analizzate insieme con gli htSNPs, era evidente come alcuni degli aplotipi associati con i markers di infiammazione portavano un unica combinazione di tali varianti aminoacidiche (Tabella 9). In particolare l'aplotipo 'AAT', che era significativamente associato con livelli bassi di fibrinogeno, era l'unico caratterizzato dalla combinazione<sup>109</sup>Lys-<sup>223</sup>Gln-<sup>656</sup>Asn e l' aplotipo 'TGC', che era associato con fibrinogeno elevato, era l'unico portatore della combinazione <sup>109</sup>Lys-<sup>223</sup>Arg-<sup>656</sup>Lys (Tabella 9).

## DISCUSSIONE

I risultati di questo studio suggeriscono che la variabilità genetica nel locus di *IL6ST* potrebbe essere una determinante significativa del rischio di sindrome metabolica e confermano che la leptina ha un ruolo fisiologico sullo stato infiammatorio e protrombotico essendo alcune varianti del gene del suo recettore predittrici dei livelli di CRP e fibrinogeno.

Un aspetto interessante dei risultati riguardanti *IL6ST* è che caratteristiche diverse della sindrome metabolica erano associate con gli SNPs nelle due popolazioni esaminate. Nella popolazione di Padova, l'associazione riguardava soprattutto i livelli di glicemia e l'  $HOMA_{IR}$ , mentre in quella di San Giovanni Rotondo, l'associazione era con la circonferenza vita, HDL e pressione arteriosa. La ragione di questa discrepanza non è nota. Dal momento che le popolazioni sono Caucasiche e della stessa regione d'Europa, sembra poco probabile, anche se non si può escludere, che i differenti pattern di associazione siano dovuti a differenze genetiche tra le due popolazioni. Un ruolo potrebbe essere giocato dalle differenze riguardanti la distribuzione del sesso e del peso corporeo tra le due popolazioni essendo il BMI della popolazione di SGR, dove anche prevale il numero di donne rispetto agli uomini, in media leggermente più elevato che in quella di PD (Tabella 1). Non è stata comunque evidenziata alcuna interazione tra gli SNPs, i traits esaminati e queste variabili sebbene le analisi probabilmente non raggiungevano sufficiente potere statistico. Un ruolo importante potrebbe essere giocato dalle differenze nella dieta tra Nord e Sud Italia (69,70). Al Nord la dieta risulta più ricca in grassi animali e proteine, più simile a quella dell'Europa Centrale, mentre quella del Sud è più ricca di carboidrati complessi e fibre (69,70). Visto il ruolo critico giocato dalla nutrizione nello sviluppo e progressione della sindrome metabolica (71), differenze nella dieta potrebbero essere responsabili delle diverse associazioni fra gli SNPs di *IL6ST* e markers di insulino-resistenza rilevate tra le due popolazioni. Dati dettagliati riguardanti la dieta non erano disponibili per le nostre popolazioni.

Le identità delle varianti genetiche responsabili di questo effetto e le vie che legano questi polimorfismi alla sindrome metabolica non sono note. Rs715180, lo SNP che mostrava la associazione più forte con i traits metabolici, è infatti localizzato nella 5' flanking region

del gene di *IL6ST*, 6.5 Kb dal sito di inizio della trascrizione. In tale posizione potrebbe influenzare qualche elemento regolatorio non ancora caratterizzato. Differenze di espressione di *IL6ST* potrebbero influenzare la produzione di quelle proteine note con il nome di suppressors of cytokine signaling (SOCS), la cui produzione aumenta con il segnale trasmesso da *IL6ST* e che esercitano un effetto negativo sul segnale insulinico negli epatociti e nel tessuto adiposo (72). Alcuni studi sostengono che l'aumentata attività delle SOCS proteins indotta da citochine proinfiammatorie, è un elemento che accomuna le diverse componenti della sindrome metabolica ed è uno step critico nello stabilire il circolo vizioso che mantiene lo stato di insulino-resistenza, iperinsulinemia e che aumenta la produzione di acidi grassi da parte del fegato (73). In questo contesto si può pensare che la presenza dell'allele minore di rs715180 potrebbe portare ad un'espressione più bassa di *IL6ST*, che di conseguenza comporta una ridotta attivazione delle proteine SOCS e dunque a una ridotta suscettibilità a sviluppare la sindrome metabolica.

L'altro studio riguardante invece le varianti genetiche di *LEPR* ha confermato il ruolo della leptina nella modulazione dello stato infiammatorio e protrombotico, ruolo peraltro già evidenziato da studi precedenti. Uno studio cross-sectional riguardante 100 soggetti sani aveva dimostrato che i livelli plasmatici di leptina erano correlati significativamente con i livelli circolanti di CRP, indipendentemente dal peso corporeo ed altri possibili confounders (74). Una correlazione significativa tra leptinemia e fibrinogenemia era stata dimostrata in modo simile in 268 uomini nell' Health Professionals Follow-up study (75) e in uno studio più piccolo condotto in Spagna (76). Questi studi comunque non hanno potuto chiarire se la relazione tra leptinemia e markers infiammatori era dovuta ad un effetto diretto o se entrambi erano regolati da un fattore comune. Il nostro studio, mostrando che polimorfismi di *LEPR*, l'effettore dell'azione della leptina, sono predittivi dei livelli di CRP e fibrinogeno, supporta la prima ipotesi.

In realtà, come per il primo studio, l'identità della varianti effettivamente responsabili di questo effetto non è nota. Il blocco n°4, lungo circa 80 Kb include la maggior parte della sequenza codificante del gene. Tre polimorfismi causa di sostituzioni

aminoacidiche, sono stati descritti in questa regione e non correlavano in modo consistente con il peso corporeo (77). Nel nostro studio nessuno di tali polimorfismi erano associati con markers infiammatori, però gli aplotipi associati con livelli bassi e alti di fibrinogeno portavano combinazioni differenti di tali varianti (rispettivamente <sup>109</sup>Lys-<sup>223</sup>Gln-<sup>656</sup>Asn e <sup>109</sup>Lys-<sup>223</sup>Arg-<sup>656</sup>Lys). Per questo si potrebbe ipotizzare che le differenze nella composizione aminoacidica potrebbero determinare differenze nell'affinità del recettore o nelle proprietà di trasduzione del segnale in grado di modulare l'azione leptinica sui livelli di fibrinogeno e CRP. Se questo fosse vero ci si aspetterebbe però un coinvolgimento di tutti i tessuti dove il recettore è espresso, cosa che non è stata evidenziata nel nostro studio. Un'altra possibilità è che la variante causale si trovi a livello di un elemento cis-attivo regolante l'espressione del recettore o influenzante la abbondanza relativa delle sue isoforme alternative. Dal momento che i polimorfismi in regioni regolatrici influiscono sull'espressione genica modulando il legame di elementi trans-attivi (78), è probabile che il loro effetto sia tessuto-specifico, influenzando per esempio l'espressione del recettore nei monociti o nel fegato ma non nell'ipotalamo o in altri siti metabolicamente importanti come il muscolo e il tessuto adiposo. Questo scenario spiegherebbe l'associazione con l'infiammazione in assenza di un effetto sul peso corporeo o sulla leptinemia e potrebbe anche spiegare l'assenza di associazione con i markers di infiammazione nello studio di *IL6ST*, almeno per quanto riguarda la SNP rs715180 che si trova nella 5' flanking region del gene.

Anche come la leptina possa modulare i livelli di CRP e fibrinogeno non è del tutto chiaro in quanto sia l'ipotesi di un ruolo diretto che indiretto sono possibili e supportate da studi e dalle omologie del suo recettore con *IL6ST*. Come molte altre proteine della fase acuta, CRP e il fibrinogeno sono prodotte dal fegato sotto il controllo di IL-6, IL-1, TNF- $\alpha$  e altre citochine infiammatorie attraverso le vie che coinvolgono NF- $\kappa$ B, C/EBPs e altri fattori della trascrizione. Quindi l'effetto della leptina potrebbe essere mediato dall'azione di IL-6, IL-1, o TNF- $\alpha$ . In supporto parziale di questa ipotesi, le varianti genetiche del blocco n° 4 avevano una tendenza ad essere associate anche con i livelli plasmatici di IL-6, sebbene questi risultati non fossero significativi ( $p = 0.06$ ) nel sottogruppo di soggetti di cui il dosaggio era disponibile.



Un ruolo importante puo` anche essere giocato da TNF- $\alpha$  dal momento che in uno studio sono stati riscontrati livelli elevati di TNF- $\alpha$  dopo la somministrazione di leptina in soggetti leptinosensibili non obesi (79). A supporto di un ruolo diretto ci sono studi in vitro e clinici tra cui la dimostrazione di un incremento selettivo di CRP prodotta dal fegato dopo la somministrazione di leptina (80-82).

Alcune limitazioni del nostro studio dovrebbero essere considerate. I risultati degli studi di associazione genetica vanno sempre interpretati con cautela e i dati andrebbero replicati e confermati in altre popolazioni prima di stabilire un sicuro legame tra polimorfismi genetici e le variabili da noi testate. Inoltre dati dalla letteratura suggeriscono che uno spazio di 3,0 Kb dovrebbe essere sufficientemente stretto per identificare tutti gli aplotipi comuni ( $\geq 5\%$ ), ma non possiamo escludere che restringendo ulteriormente la spaziatura media degli SNP nei due loci non si possano identificare altri aplotipi. Per questo il nostro studio potrebbe aver sottovalutato qualche effetto genetico.

## **BIBLIOGRAFIA**

1. Grundy SM, Brewer HB, Cleeman JI, et al. Definition of metabolic syndrome. Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association Conference on Scientific Issues related to definition. *Circulation* 2004; 109: 433-438.
2. Alberti K, Zimmet P. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus. Report of WHO Consultation. *Diabetic Med.* 1998; 15: 539-553.
3. Expert panel on detection, evaluation and treatment of high blood cholesterol in adults. Executive summary of the third report of the national cholesterol education program (NCEP) expert panel on detection evaluation and treatment of high blood cholesterol in adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA.* 2001; 285: 2486-2497.
4. Lakka HM, Laaksonen DE, Lakka TA et al. The metabolic syndrome and total and cardiovascular disease mortality in middle aged men. *JAMA.* 2002; 288: 2709-2716.
5. Dunaif A, Thomas A. Current concepts in the polycystic ovary syndrome. *Annu Rev Med* 2001; 52: 401-419.
6. Marchesini G, Brizi M, Bianchi G, Tomasetti S, Bugianesi E Lenzi M et al. Non alcoholic fatty liver disease: a feature of the metabolic syndrome. *Diabetes* 2001; 50: 1844-53.
7. Vuorinen-Markkola H, Yki-Jarvinen H. Hyperuricemia and insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab.* 1994; 78: 25-9.
8. Aso Y, Wakabayashi S, Yamamoto R, et al. Metabolic syndrome accompanied by hypercholesterolemia is strongly associated with proinflammatory state and impairment of fibrinolysis in patients with type 2 diabetes: synergistic effects of plasminogen activator inhibitor-1 and thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor. *Diabetes Care.* 2005;28(9):2211-6.
9. Festa A, D'Agostino RJ, Howard G et al. Chronic subclinical inflammation as part of the insulin resistance syndrome: the Insulin Resistance Atherosclerosis Study (IRAS). *Circulation.* 2000;102: 42-47.

10. Alberti KG, Zimmet P, Shaw J. Metabolic syndrome - a new world-wide definition. A Consensus Statement from the International Diabetes Federation. *Diabet Med.* 2006; 23(5):469-80.
11. Shoelson SE, Lee J, Goldfine AB. Inflammation and insulin resistance. *J Clin Invest.* 2006; 116(7):1793-801.
12. Saltiel AR. You are what you secrete. *Nat Med.* 2001;7(8): 887-8.
13. Scherer P. E. Adipose tissue: from lipid storage compartment to endocrine organ. *Diabetes.* 2006; 55: 1537–1545.
14. Wellen K. E. & Hotamisligil, G. S. Inflammation, stress, and diabetes. *J. Clin. Invest.* 2005; 115: 1111–1119.
15. Yang Q. et al. Serum retinol binding protein 4 contributes to insulin resistance in obesity and type 2 diabetes. *Nature.* 2005; 436, 356–362.
16. Kadowaki, T. et al. Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes and the metabolic syndrome. *J. Clin. Invest.* 2006; 116: 1784–1792.
17. Fain JN, Madan AK, Hiler ML, Cheema P, Bahouth SW. Comparison of the release of adipokines by adipose tissue, adipose tissue matrix, and adipocytes from visceral and subcutaneous abdominal adipose tissues of obese humans. *Endocrinology.* 2004; 145: 2273–2282.
18. Mooney RA et al. Suppressors of cytokine signaling-1 and -6 associate with and inhibit the insulin receptor. A potential mechanism for cytokine-mediated insulin resistance. *J.Biol. Chem.* 2001 276: 25889–25893.
19. Perreault M, Marette A. Targeted disruption of inducible nitric oxide synthase protects against obesity-linked insulin resistance in muscle. *Nature Med.* 2001; 7: 1138–1143.
20. Boden G. Role of fatty acids in the pathogenesis of insulin resistance and NIDDM. *Diabetes.* 1997; 46: 3–10.
21. Roden M et al. Mechanism of free fatty acid-induced insulin resistance in humans. *J. Clin. Invest.* 1996; 97: 2859–2865.

22. Kershaw EE, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004; 89(6): 2548-56.
23. Tilg H, Moschen AR. Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol.* 2006; 6(10): 772-83.
24. Hida K. et al. Visceral adipose tissue-derived serine protease inhibitor: a unique insulin-sensitizing adipocytokine in obesity. *Proc. Natl Acad. Sci.* 2005; 102, 10610–10615.
25. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature.* 1994; 372:425-432.
26. Ahima RS, Flier JS. Leptin. *Annu Rev Physiol.* 2000; 62:413-437.
27. Chan JL, Heist K, DePaoli AM, Veldhuis JD, Mantzoros CS. The role of falling leptin levels in the neuroendocrine and metabolic adaptation to short-term starvation in healthy men. *J Clin Invest.* 2003; 111:1409-421.
28. Welt CK, Chan JL, Bullen J, Murphy R, Smith P, DePaoli AM, Karalis A, Mantzoros CS. Recombinant human leptin in women with hypothalamic amenorrhea. *N Engl J Med.* 2004;351:987-997.
29. Lord GM, Matarese G, Howard JK, Baker RJ, Bloom SR, Lechler RI. Leptin modulates the T-cell immune response and reverses starvation-induced immunosuppression. *Nature.* 1998; 394:897-901.
30. Friedman J M, Halaas JL. Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature.* 1998; 395, 763–770.
31. Grunfeld C et al. Endotoxin and cytokines induce expression of leptin, the ob gene product, in hamsters. *J Clin Invest* 1996; 97, 2152–2157.
32. Sarraf, P et al. Multiple cytokines and acute inflammation raise mouse leptin levels: potential role in inflammatory anorexia. *J Exp Med.* 1997; 185, 171–175.
33. La Cava A, Matarese G. The weight of leptin in immunity. *Nature Rev Immunol.* 2004; 4: 371-379.

34. Konstantinides S, Schafer K, Koschnick S, Loskutoff DJ. Leptin-dependent platelet aggregation and arterial thrombosis suggests a mechanism for atherothrombotic disease in obesity. *J Clin Invest.* 2001; 108:1533-1540.
35. Bodary PF, Westrick RJ, Wickenheiser KJ, Shen Y, Eitzman DT. Effect of leptin on arterial thrombosis following vascular injury in mice. *JAMA.* 2002; 287:1706-1709.
36. Stephenson K, Tunstead J, Tsai A, Gordon R, Henderson S, Dansky HM. Neointimal formation after endovascular arterial injury is markedly attenuated in db/db mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003; 23:2027-2033.
37. Schafer K, Halle M, Goeschen C, Dellas C, Pynn M, Loskutoff DJ, Konstantinides S. Leptin promotes vascular remodeling and neointimal growth in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004; 24:112-117.
38. Shamsuzzaman AS, Winnicki M, Wolk R, Svatikova A, Phillips BG, Davison DE, Berger PB, Somers VK. Independent association between plasma leptin and C-reactive protein in healthy humans. *Circulation.* 2004; 109:2181-2185.
39. Gomez-Ambrosi J, Salvador J, Paramo JA, Orbe J, de Irala J, Diez-Caballero A, Gil MJ, Cienfuegos JA, Fruhbeck G. Involvement of leptin in the association between percentage of body fat and cardiovascular risk factors. *Clin Biochem.* 2002; 35:315-320.
40. van Dielen FM, van't Veer C, Schols AM, Soeters PB, Buurman WA, Greve JW. Increased leptin concentrations correlate with increased concentrations of inflammatory markers in morbidly obese individuals. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2001; 25:1759-176,
41. Reilly MP, Iqbal N, Schutta M, Wolfe ML, Scally M, Localio AR, Rader DJ, Kimmel SE. Plasma leptin levels are associated with coronary atherosclerosis in type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004; 89:3872-3878.
42. Wallace AM, McMahon AD, Packard CJ, Kelly A, Shepherd J, Gaw A, Sattar N. Plasma leptin and the risk of cardiovascular disease in the west of Scotland coronary prevention study (WOSCOPS). *Circulation.* 2001; 104:3052-3056.
43. Chu NF, Spiegelman D, Hotamisligil GS, Rifai N, Stampfer M, Rimm EB. Plasma insulin, leptin, and soluble TNF receptors levels in relation to obesity-related atherogenic and

thrombogenic cardiovascular disease risk factors among men. *Atherosclerosis*. 2001; 157:495-503.

44. Hukshorn CJ, Lindeman JH, Toet KH, Saris WH, Eilers PH, Westerterp-Plantenga MS, Kooistra T. Leptin and the proinflammatory state associated with human obesity. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004; 89:1773-1778.

45. Chan JL, Bullen J, Stoyneva V, Depaoli AM, Addy C, Mantzoros CS. Recombinant methionyl human leptin administration to achieve high physiologic or pharmacologic leptin levels does not alter circulating inflammatory marker levels in humans with leptin sufficiency or excess. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005; 90:1618-1624.

46. Chan JL, Moschos SJ, Bullen J, Heist K, Li X, Kim YB, Kahn BB, Mantzoros CS. Recombinant methionyl human leptin administration activates signal transducer and activator of transcription 3 signaling in peripheral blood mononuclear cells in vivo and regulates soluble tumor necrosis factor- $\alpha$  receptor levels in humans with relative leptin deficiency. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005; 90:1625-1631.

47. Tartaglia LA, Dembski M, Weng X, Deng N, Culpepper J, Devos R, Richards GJ, Campfield LA, Clark FT, Deeds J, Muir C, Sanker S, Moriarty A, Moore KJ, Smutko JS, Mays GG, Wool EA, Monroe CA, Tepper RI. Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell*. 1995; 83:1263-1271.

48. Fei H, Okano HJ, Li C, Lee GH, Zhao C, Darnell R, Friedman JM. Anatomic localization of alternatively spliced leptin receptors (Ob-R) in mouse brain and other tissues. *Proc Natl Acad Sci. USA*. 1997; 94:7001-7005.

49. Bjørnbæk C, and Kahn BB. Leptin signaling in the central nervous system and the periphery. *Recent Prog. Horm. Res*. 2004; 59:305–331.

50. Minokoshi Y, et al. AMP-kinase regulates food intake by responding to hormonal and nutrient signals in the hypothalamus. *Nature*. 2004; 428:569–574.

51. Vozarova B, Weyer C, Hanson K, Tataranni PA, Bogardus C, Pratley RE. Circulating interleukin-6 in relation to adiposity, insulin action, and insulin secretion. *Obes Res*. 2001; 9(7):414-7.

52. Taga T, Kishimoto T. Gp130 and the interleukin-6 family of cytokines. *Annu Rev Immunol.* 1997; 15:797-819.
53. Wolford JK, Colligan PB, Gruber JD, Bogardus C. Variants in the interleukin 6 receptor gene are associated with obesity in Pima Indians. *Mol Genet Metab.* 2003; 80(3): 338-343.
54. Wang H, Zhang Z, Chu W, Cooper JJ, Elbein SC. Molecular screening and association analyses of the interleukin 6 receptor gene variants with type 2 diabetes, diabetic nephropathy, and insulin sensitivity. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005; 90:1123–1129.
55. Hamid YH, Urhammer SA, Jensen DP, et al. Variation in the interleukin-6 receptor gene associates with type 2 diabetes in Danish whites. *Diabetes.* 2004; 53:3342–3345.
56. Esteve E, Villuendas G, Mallolas J, et al. Polymorphisms in the interleukin-6 receptor gene are associated with body mass index and with characteristics of the metabolic syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2006; 65(1):88-91.
57. Gabriel SB, Schaffner SF, Nguyen H, et al. The structure of haplotype blocks in the human genome. *Science.* 2002; 296:2225-2229.
58. Abecasis GR, Cookson WO. GOLD - graphical overview of linkage disequilibrium. *Bioinformatics.* 2000; 16:182-183.
59. Schaid DJ, Rowland CM, Tines DE, Jacobson RM, Poland GA (2002) Score tests for association between traits and haplotypes when linkage phase is ambiguous. *Am J Hum Genet.* 2002; 70:425-434.
60. Zhang K, Deng M, Chen T, Waterman MS, Sun FA: Dynamic programming algorithm for haplotype block partitioning. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2002; 99:7335-7339.
61. Varmus H. Genomic empowerment: the importance of public databases. *Nat Genet* 2003; 35 (suppl 1): 3.
62. Reich DE, Gabriel SB, Altshuler D. Quality and completeness of SNP databases. *Nat Genet* 2003; 33: 457–58.
63. Carlson CS, Eberle MA, Kruglyak L, Nickerson DA. Mapping complex disease loci in whole-genome association studies. *Nature* 2004; 429: 446–52.

64. Schork NJ, Fallin D, Lanchbury JS. Single nucleotide polymorphisms and the future of genetic epidemiology. *Clin Genet* 2000; 58: 250-264.
65. Escobar-Morreale HF, Calvo RM, Villuendas G, Sancho J, San Millan JL. Association of polymorphisms in the interleukin 6 receptor complex with obesity and hyperandrogenism. *Obes Res.* 2003; 11(8):987-96.
66. Luchtefeld M, Schunkert H, Stoll M et al. Signal transducer of inflammation gp130 modulates atherosclerosis in mice and man. *J Exp Med.* 2007 Aug 6; 204(8):1935-44.
67. Zhang YY, Gottardo L, Mlynarski et al. Genetic variability at the leptin receptor (*LEPR*) locus is a determinant of plasma fibrinogen and C-reactive protein levels. *Atherosclerosis.* 2007; 191(1):121-7.
68. Ma X, Bacci S, Mlynarski W, et al. A common haplotype at the CD36 locus is associated with high free fatty acid levels and increased cardiovascular risk in Caucasians. *Hum Mol Genet.* 2004; 13(19):2197-205.
69. Lupo A. Nutrition in general practice in Italy. *Am J Clin Nutr.* 1997; 65(6 Suppl): 1963S-1966S.
70. Correa Leite ML, Nicolosi A, Cristina S, Hauser WA, Pugliese P, Nappi G. Dietary and nutritional patterns in an elderly rural population in Northern and Southern Italy: (I). A cluster analysis of food consumption. *Eur J Clin Nutr.* 2003; 57(12):1514-21.
71. Phillips C, Lopez-Miranda J, Perez-Jiminez F, McManus R, Roche HM. Genetic and nutrient determinants of the metabolic syndrome. *Curr Opin Cardiol.* 2006; 21:185–193.
72. Senn JJ, Klover PJ, Nowak IA, et al. Suppressor of cytokine signaling-3 (SOCS-3), a potential mediator of interleukin-6-dependent insulin resistance in hepatocytes. *J Biol Chem.* 2003; 278(16): 13740-6.
73. Ueki K, Kondo T, Tseng YH, Kahn CR. Central role of suppressors of cytokine signaling proteins in hepatic steatosis, insulin resistance, and the metabolic syndrome in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004; 101(28):10422-7.
74. Shamsuzzaman AS, Winnicki M, Wolk R, et al. Independent association between plasma leptin and C-reactive protein in healthy humans. *Circulation* 2004; 109: 2181–5.



75. Chu NF, Spiegelman D, Hotamisligil GS, Rifai N, Stampfer M, Rimm EB. Plasma insulin, leptin, and soluble TNF receptors levels in relation to obesity-related atherogenic and thrombogenic cardiovascular disease risk factors among men. *Atherosclerosis* 2001; 157: 495–503.
76. Gomez-Ambrosi J, Salvador J, Paramo JA, et al. Involvement of leptin in the association between percentage of body fat and cardiovascular risk factors. *Clin Biochem* 2002; 35: 315–20.
77. Heo M, Leibel RL, Boyer BB, et al. Pooling analysis of genetic data: the association of leptin receptor (*LEPR*) polymorphisms with variables related to human adiposity. *Genetics* 2001; 159: 1163-78.
78. Semenza GL. *Transcription factors and human disease*. New York, NY: Oxford University Press; 1998.
79. Chan JL, Moschos SJ, Bullen J, et al. Recombinant methionyl human leptin administration activates signal transducer and activator of transcription 3 signaling in peripheral blood mononuclear cells in vivo and regulates soluble tumor necrosis factor-alpha receptor levels in humans with relative leptin deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90: 1625–31.
80. Wang Y, Kuropatwinski KK, White DW, et al. *J Biol Chem* 1997;272:16216–23.
81. Hukshorn CJ, Lindeman JH, Toet KH, et al. Leptin and the proinflammatory state associated with human obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 1773–8.
82. Chan JL, Bullen J, Stoyneva V, Depaoli AM, Addy C, Mantzoros CS. Recombinant methionyl human leptin administration to achieve high physiologic or pharmacologic leptin levels does not alter circulating inflammatory marker levels in humans with leptin sufficiency or excess. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90: 1618–24.

**TABELLE E FIGURE**



**Tabella 1.** Caratteristiche cliniche delle popolazioni di PD e SGR.

	<b>PD</b>	<b>SGR</b>
N (M/F)	630 (311/293)	553 (209/344)
Eta`	38 ± 8	37 ± 12
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	23.8 ± 3.7	25.5 ± 4.5
Waist (cm)	83.8 ± 12.4	83.0 ± 12.7
FBG (mg/dl)	95.7 ± 8.6	89.8 ± 9.1
HOMA <sub>IR</sub>	1.89 ± 1.1	1.71 ± 1.1
Tg (mg/dl)	86 ± 53	93 ± 61
HDL mg/dl)	60.3 ± 13.9	52.8 ± 13.1
SBP (mmHg)	123 ± 17	114 ± 13
DBP (mmHg)	81 ± 11	76 ± 9

I dati sono medie ± SD.

**Tabella 2.** Caratteristiche metaboliche della popolazione di PD secondo i genotipi di *IL6ST*.

<b>rs715180</b>	<b>AA</b>	<b>AC + CC</b>	<b>P value *</b>	
M/F	267/247	48/51		
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	23.8 (23.5, 24.2)	23.6 (22.7, 24.5)	0.95	
Waist (cm)	83.9 (82.9, 85.0)	83.2 (80.5, 85.9)	0.85	
FBG (mg/dl)	96.1 (95.3, 96.8)	93.5 (91.6, 95.4)	0.02	
HOMA <sub>IR</sub>	1.9 (1.8, 2.0)	1.7 (1.5, 1.9)	0.04	
Tg (mg/dl)	87.7 (82.9, 92.4)	77.2 (68.3, 86.1)	0.09	
HDL(mg/dl)	60.2 (59.0, 61.4)	60.7 (57.8, 63.6)	0.93	
SBP (mmHg)	123.9 (122.4, 125.4)	121.6 (118.7, 124.4)	0.44	
DBP (mmHg)	81.5 (80.5, 82.5)	80.3 (78.2, 82.4)	0.64	
<b>rs3729960</b>	<b>GG</b>	<b>GC</b>	<b>CC</b>	
M/F	219/212	86/74	6/7	
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	23.7 (23.3, 24.0)	24.2 (23.6, 24.8)	24.7 (22.6, 26.8)	0.28
Waist (cm)	83.6 (82.4, 84.7)	84.4 (82.4, 86.3)	83.8 (75.9, 91.5)	0.93
FBG (mg/dl)	95.0 (94.3, 96.0)	96.8 (95.5, 98.0)	92.1 (87.5, 96.6)	0.02
HOMA <sub>IR</sub>	1.9 (1.7, 2.0)	1.9 (1.7, 2.0)	1.8 (1.2, 2.4)	0.4
Tg (mg/dl)	84.8 (79.8, 89.9)	90.8 (82, 99.5)	64.0 (46.2, 81.8)	0.03
HDL (mg/dl)	60.2 (58.8, 61.5)	60.6 (58.4, 62.9)	61.8 (52.9, 70.6)	0.47
SBP (mmHg)	123.7 (122.0, 125.3)	123.3 (120.7, 126.0)	125.4 (113.9,136.8)	0.69
DBP (mmHg)	81.2 (80.1, 82.2)	81.5 (79.8, 83.2)	81.9 (73.5, 90.3)	0.9
<b>rs10940495</b>	<b>AA</b>	<b>AG</b>	<b>GG</b>	
M/F	169/157	122/124	28/21	
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	23.9 (23.5, 24.3)	23.7 (23.2, 24.1)	24.1 (23, 25.3)	0.68
Waist (cm)	83.6 (82.2, 85.0)	83.8 (82.3, 85.3)	85.8 (82.2, 89.5)	0.64
FBG (mg/dl)	95.0 (94.1, 95.9)	96.0 (94.8, 97.2)	97.8 (95.2, 100.3)	0.05
HOMA <sub>IR</sub>	1.8 (1.7, 1.9)	1.9 (1.7, 2.1)	2.1 (1.7, 2.4)	0.13
Tg (mg/dl)	82.9 (77.3, 88.6)	89.0 (82.5, 95.5)	90.6 (71.9, 109.1)	0.12
HDL (mg/dl)	61.1 (59.5, 62.6)	60.0 (58.3, 61.8)	56.7 (53.6, 59.8)	0.08
SBP (mmHg)	122.9(121.0, 124.8)	123.6(121.5, 126.0)	125.8(120.7, 130.9)	0.57
DBP (mmHg)	81.1 (79.9, 82.2)	81.0 (79.6, 82.3)	84.1 (80.3, 88)	0.20
<b>rs11574780</b>	<b>TT</b>	<b>CT</b>		
M/F	310/284	10/17		
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	23.8 (23.5, 24.1)	24.0 (22.3, 25.6)	0.45	
Waist (cm)	83.9 (82.9, 84.9)	84.1 (78.4, 89.7)	0.24	
FBG (mg/dl)	95.7 (95.0, 96.3)	96.2 (92.3, 100.0)	0.34	
HOMA <sub>IR</sub>	1.9 (1.8, 2.0)	2.0 (1.5, 2.5)	0.5	
Tg (mg/dl)	86.5 (82.2, 90.8)	76.0 (61.6, 90.5)	0.55	
HDL (mg/dl)	60.4 (59.2, 61.5)	58.3 (54.2, 62.4)	0.11	
SBP (mmHg)	123.5(122.0, 124.9)	121.9(115.6, 128.0)	0.88	
DBP (mmHg)	81.3 (80.4, 82.2)	80.5 (75.6, 85.4)	0.93	

I dati sono medie (95% C.I.), con l'eccezione di HOMA<sub>IR</sub> e Trigliceridi (Tg), per cui i dati sono medie geometriche (95% C.I.). Tutti i dati eccetto BMI e waist sono aggiustati per età, sesso, e BMI. BMI e waist sono aggiustati per età e sesso. \*p values per confronto tra gruppi di genotipi.

**Tabella 3.** Caratteristiche metaboliche della popolazione di SGR secondo i genotipi di *IL6ST*.

<b>rs715180</b>	<b>AA</b>	<b>AC + CC</b>	<b>p value *</b>	
M/F	173/272	34/59		
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	25.6 (25.1, 25.9)	25.1 (24.2, 25.9)	0.16	
Waist (cm)	83.3 (82, 84.5)	81.3 (78.7, 83.8)	0.06	
FBG (mg/dl)	89.7 (88.9, 90.5)	90.0 (87.9, 92.1)	0.77	
HOMA <sub>IR</sub>	1.7 (1.6, 1.8)	1.6 (1.4, 1.7)	0.45	
Tg (mg/dl)	92.9 (87.4, 98.4)	93.5 (79.0, 108.0)	0.77	
HDL (mg/dl)	52.1 (50.8, 53.2)	56.5 (53.5, 59.5)	0.01	
SBP (mmHg)	114.4 (113.2, 115.6)	113.4(110.9, 115.9)	0.57	
DBP (mmHg)	76.4 (75.5, 77.2)	74.99 (73.2, 76.5)	0.16	
<b>rs3729960</b>	<b>GG</b>	<b>GC</b>	<b>CC</b>	<b>p</b>
M/F	152/264	54/66	3/8	
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	25.2 (24.8, 25.6)	25.8 (24.9, 26.7)	25.2 (22.1, 28.2)	0.07
Waist (cm)	82 (80.9, 83.2)	85.2 (82.6, 87.8)	78.9 (72.0, 85.7)	0.005
FBG (mg/dl)	89.7 (88.8, 90.5)	90.4 (88.5, 92.3)	90.0 (85.8, 94.2)	0.35
HOMA <sub>IR</sub>	1.7 (1.6, 1.7)	1.9 (1.6, 2.1)	1.9 (0.9, 2.8)	0.50
Tg (mg/dl)	93.6 (87.5, 99.6)	87.6 (78.8, 96.4)	98.8 (49.5, 148.0)	0.28
HDL (mg/dl)	53.5 (52.2, 54.8)	52.7 (50.2, 55.0)	48.5 (40.1, 56.7)	0.18
SBP (mmHg)	112.9 (111.7, 114.2)	116.6(114.0, 119.1)	112.7(106.3,119.1)	0.02
DBP (mmHg)	75.5 (74.6, 76.3)	77.5 (75.9, 79)	74.5 (69.7, 79.4)	0.16
<b>rs10940495</b>	<b>AA</b>	<b>AG</b>	<b>GG</b>	<b>p</b>
M/F	128/191	65/117	16/36	
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	25.5 (25.0, 26.0)	24.9 (24.3, 25.6)	25.9 (24.7, 27.2)	0.62
Waist (cm)	83.3 (81.9, 84.7)	81.6 (79.7, 83.5)	82.9 (79.5, 86.3)	0.85
FBG (mg/dl)	90.0 (89.0, 91.0)	89.5 (88.1, 90.9)	89.2 (87.4, 91.1)	0.43
HOMA <sub>IR</sub>	1.7 (1.6, 1.8)	1.7 (1.55, 1.9)	1.6 (1.3, 1.7)	0.32
Tg (mg/dl)	96.0 (89.4, 102.7)	88.5 (79.4, 97.6)	86.4 (71.9, 101)	0.18
HDL (mg/dl)	52.6 (51.1, 54.0)	53.3 (51.3, 55.3)	54.2 (50.6, 57.8)	0.91
SBP (mmHg)	114.5 (113, 116)	112.1(110.3, 113.8)	115.3(111.5, 119)	0.38
DBP (mmHg)	76.5 (75.5, 77.5)	75.0 (73.7, 76.3)	75.6 (73.0, 78.2)	0.53
<b>rs11574780</b>	<b>TT</b>	<b>CT+CC</b>	<b>p</b>	
M/F	191/289	6/26		
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	25.3 (24.9, 25.7)	26.1 (24.6, 27.6)	0.22	
Waist (cm)	82.7 (81.5, 83.8)	82.9 (79.0, 86.9)	0.18	
FBG (mg/dl)	89.7 (88.9, 90.6)	90.5 (87.4, 93.7)	0.42	
HOMA <sub>IR</sub>	1.7 (1.6, 1.8)	1.9 (1.6, 2.2)	0.09	
Tg (mg/dl)	92.1 (86.7, 97.4)	103.1 (71.3, 135)	0.18	
HDL (mg/dl)	52.9 (51.7, 54.0)	53.8 (48.8, 58.8)	0.59	
SBP (mmHg)	114.0 (112.8, 115.1)	110.6(104.5, 116.7)	0.29	
DBP (mmHg)	76.1 (75.3, 77.0)	72.6 (68.7, 76.5)	0.09	

I dati sono medie (95% C.I.), con l'eccezione di HOMA<sub>IR</sub> e Trigliceridi (Tg), per cui i dati sono medie geometriche (95% C.I.). Tutti i dati eccetto BMI e waist sono aggiustati per eta', sesso, e BMI. BMI e waist sono aggiustati per eta' e sesso. \*p values per confronto tra gruppi di genotipi.

**Tabella 4.** Haplotype-tagging (ht) SNPs at the LEPR locus.

<b>refSNP ID</b>	<b>Position<sup>†</sup></b>	<b>Variation</b>	<b>Location</b>	<b>Block</b>
rs913199	-160187	G/T	5'flanking	1
rs10493377	-151997	A/G	5'flanking	1
rs3806318	-145892	A/G	5'flanking	1
rs4655802	-143018	A/G	Intron 1	1
rs3790433	-136907	G/A	Intron 2	2
rs3934256	-126794	C/G	Intron 2	2
rs2025805	-81371	C/T	Intron 2	3
rs6673324	-186	A/G	Intron 2	3
rs3790432	4491	A/T	Intron 3	4
rs1137101	27265	G/A	Exon 6	4
rs1805096	71009	C/T	Exon 20	4

<sup>†</sup> Relative to the translation start site on the May 2004 Human Genome assembly (hg17).

**Tabella 5.** Caratteristiche cliniche dei soggetti di PD secondo il sesso

	<b>Uomini</b>	<b>Donne</b>
N	325	305
Eta`	39.5 ± 8.2	36.1 ± 8.3
BMI	110.6 ± 13	106.6 ± 19
Waist (cm)	91.1 ± 9	76.2 ± 11
Leptin (ng/ml)	3.9 (3.0, 6.1)	8.7 (5.7, 15.1)
Fibrinogen (mg/ml)	2.9 (2.6, 3.3)	3.0 (2.8, 3.5)
C-reactive protein (mg/l)	0.7 (0.4, 1.5)	0.6 (0.3, 1.3)
Interleukin 6 (pg/ml) <sup>†</sup>	0.9 (0.6, 1.7)	1.1 (0.6, 2.0)

I dati sono medie ± SD, con l'eccezione di leptin, fibrinogeno, CRP, e IL6 per cui i valori espressi sono mediane (IQR).

<sup>†</sup> I dati si riferiscono a 204 uomini e 221 donne per cui i dosaggi di IL-6 erano disponibili.



**Tabella 6.** Associazione tra gli haplotype blocks di *LEPR* e markers infiammatori.

Block	Fibrinogen			CRP			IL-6 <sup>‡</sup>		
	F <sup>†</sup>	d.f.	p	F <sup>†</sup>	d.f.	p	F <sup>†</sup>	d.f.	p
1	1.27	8	0.26	1.08	8	0.37	0.46	8	0.89
2	1.13	4	0.34	2.36	4	0.053	1.79	4	0.13
3	0.69	4	0.60	1.64	4	0.16	0.45	4	0.77
4	3.10	6	0.005	2.13	6	0.049	2.05	6	0.06

<sup>†</sup>F statistics from full models with multivariable-adjusted fibrinogen or CRP levels as dependent variables and all htSNPs in a given block as independent variables.

<sup>‡</sup>Data refer to 425 of the 630 subjects.

**Tabella 7.** Markers di infiammazione secondo i genotipi degli htSNP del blocco n°4 di *LEPR*.

	p/p	p/q	q/q	p value <sup>†</sup>
<b>rs3790432</b>				
n	376	219	35	
Fibrinogen (mg/ml)	2.98 (2.91, 3.06)	3.08 (2.99, 3.17)	3.27 (3.06, 3.50)	0.015
C-reactive Protein (mg/l)	0.69 (0.60, 0.79)	0.75 (0.63, 0.88)	0.98 (0.68, 1.41)	0.15
Interleukin 6 (pg/ml) <sup>‡</sup>	1.05 (0.93, 1.18)	0.93 (0.79, 1.08)	1.31 (0.87, 1.99)	0.23
Leptin (ng/ml)	6.62 (6.33, 6.93)	6.07 (5.72, 6.45)	6.60 (5.70, 7.66)	0.08
<b>rs1137101</b>				
n	226	304	100	
Fibrinogen (mg/ml)	3.05 (2.96, 3.14)	2.99 (2.91, 3.08)	3.10 (2.98, 3.23)	0.27
C-reactive Protein (mg/l)	0.76 (0.64, 0.90)	0.72 (0.62, 0.83)	0.69 (0.55, 0.87)	0.75
Interleukin 6 (pg/ml) <sup>‡</sup>	1.05 (0.94, 1.19)	0.96 (0.82, 1.12)	0.90 (0.57, 1.41)	0.59
Leptin (ng/ml)	6.46 (6.17, 6.76)	6.36 (5.98, 6.76)	6.41 (5.45, 7.53)	0.93
<b>rs1805096</b>				
n	236	298	88	
Fibrinogen (mg/ml)	3.12 (3.03, 3.22)	2.96 (2.88, 3.04)	3.04 (2.91, 3.18)	0.007
C-reactive Protein (mg/l)	0.86 (0.73, 1.01)	0.65 (0.57, 0.76)	0.67 (0.52, 0.85)	0.011
Interleukin 6 (pg/ml) <sup>‡</sup>	1.17 (1.00, 1.36)	0.89 (0.78, 1.02)	1.11 (0.86, 1.44)	0.027
Leptin (ng/ml)	6.36 (6.00, 6.74)	6.33 (6.02, 6.67)	6.77 (6.14, 7.45)	0.48

I dati sono least square geometric means (95% CI). Fibrinogen, CRP, e IL6 sono aggiustati per età, sesso, BMI, circonferenza vita, leptina plasmatica e fumo di sigaretta. La leptinemia è aggiustata per età, sesso, BMI, circonferenza vita e fumo di sigaretta. Per rs3790432, p/p=A/A, p/q=A/T, q/q=T/T; per rs1137101, p/p=A/A, p/q=A/G, q/q=G/G; per rs1805096, p/p=C/C, p/q=C/T, q/q=T/T.

<sup>†</sup> ANOVA tra i tre genotipi (2 d.f.)

<sup>‡</sup> I dati si riferiscono a 425 dei 630 soggetti.

**Tabella 8.** Associazione tra aplotipi del blocco n°4 di *LEPR*, fibrinogeno e CRP.

Common haplotypes	Frequency	Fibrinogen <sup>†</sup>		CRP <sup>†</sup>	
		Haploscore <sup>‡</sup>	p value	Haploscore <sup>‡</sup>	p value
A G T	0.133	-0.70	0.48	-2.59	0.009
A A T	0.221	-2.20	0.028	-1.21	0.23
A G C	0.074	-1.74	0.08	-0.52	0.60
A A C	0.335	0.31	0.75	1.04	0.30
T G C	0.170	1.98	0.042	1.61	0.11

<sup>†</sup>Global p value per associazione = 0.004 per fibrinogeno, 0.048 per CRP.

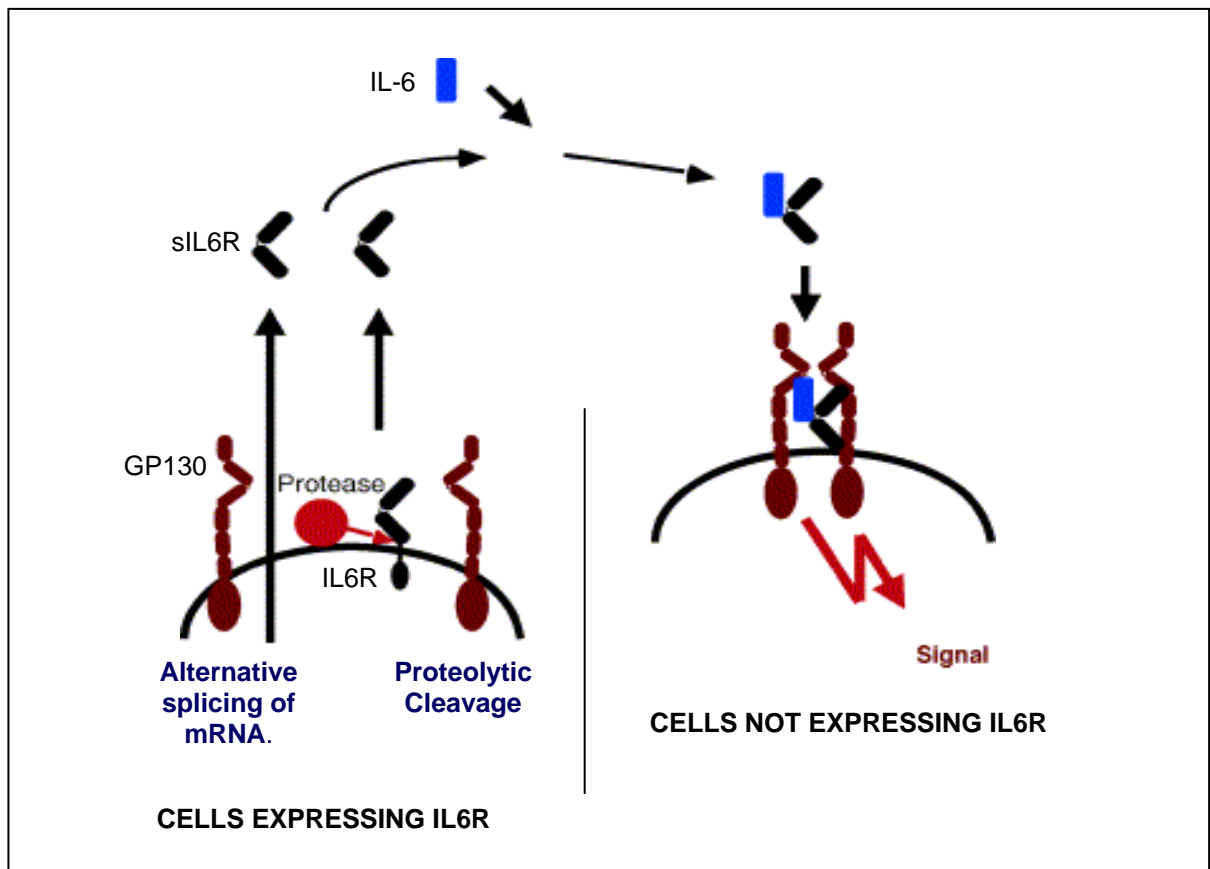
<sup>‡</sup> Haplotype-specific scores per associazione sono stati calcolati con l' Haplo.score program. Valori positivi denotano associazione con livelli elevate, valori negativi con bassi livelli della variabile esaminata. I dati sono aggiustati per età, sesso, BMI, circonferenza vita leptinemia e fumo di sigaretta.

**Tabella 9.** Relazione tra varianti aminoacidiche e aplotipi del blocco n°4.

<b>Haplotypes<sup>†</sup></b>	<b>Frequency</b>	<b>Lys109Arg</b>	<b>Gln223Arg</b>	<b>Asn656Lys</b>
AGT	0.133	Arg	Arg	Lys
AAT	0.221	Lys	Gln	Asn
AGC	0.074	Arg	Arg	Lys
AAC	0.335	Lys	Gln	Lys
TGC	0.170	Lys	Arg	Lys

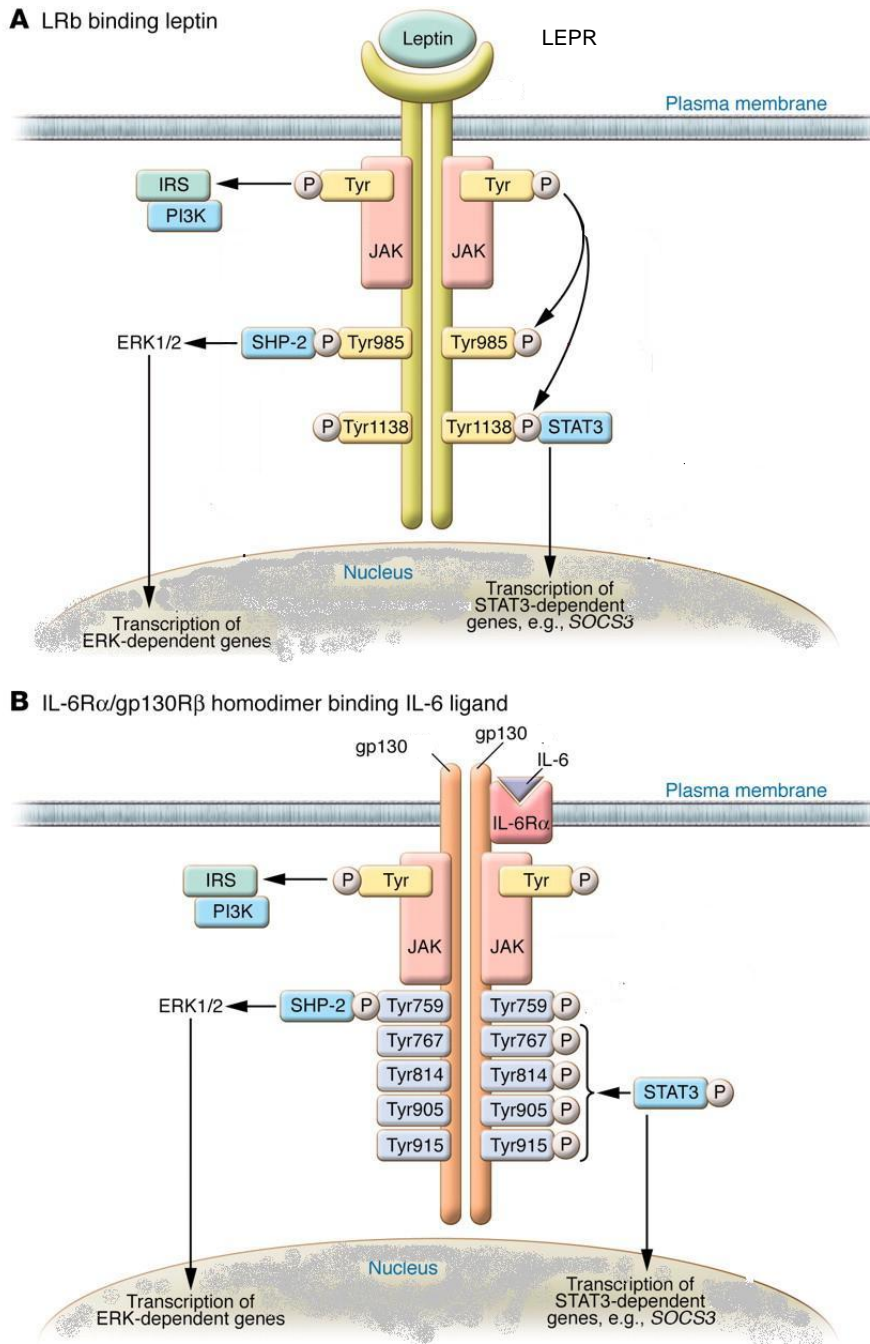
<sup>†</sup>Aplotipi comuni definiti dai tre htSNPs del blocco n°4 (rs3790432, rs1137101, e rs1805096)

**Figura 1**



Meccanismo del trans-signalling del recettore dell'interleuchina - 6

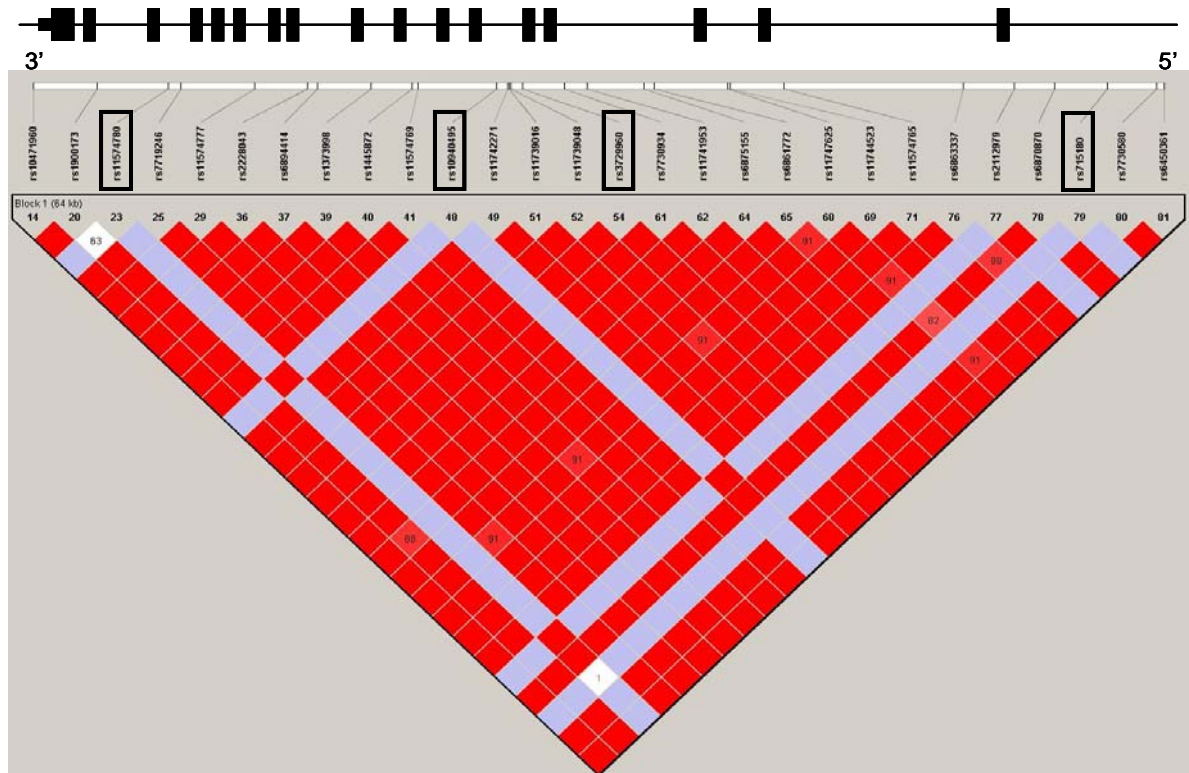
**Figura 2**



Signaling via *LEPR* e gp130 (figura modificata da Febbraio MA, JCI 2007).

Figura 3

A



B

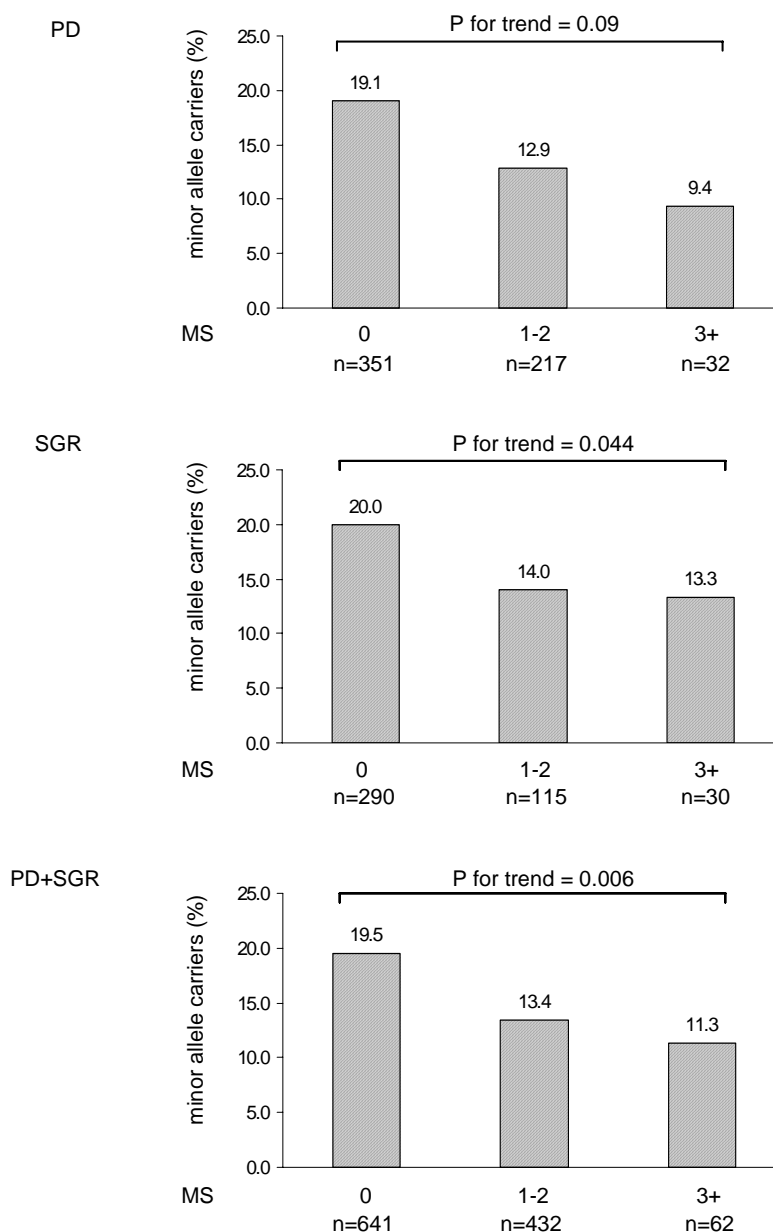
A	T	<b>A</b>	A	G	C	A	C	G	A	<b>A</b>	A	C	C	<b>G</b>	G	T	G	A	C	T	A	T	T	C	<b>A</b>	A	C	0.508
A	T	<b>A</b>	A	G	C	A	C	G	A	<b>G</b>	A	C	C	<b>G</b>	G	T	G	A	C	T	A	T	C	<b>A</b>	A	C	0.2	
A	T	<b>G</b>	A	G	C	A	C	G	A	<b>G</b>	A	C	C	<b>G</b>	G	T	G	A	C	T	A	T	C	<b>A</b>	A	C	0.067	
G	A	<b>A</b>	T	T	G	G	T	A	G	<b>A</b>	G	T	T	<b>C</b>	A	C	A	G	A	A	G	G	T	<b>A</b>	<b>A</b>	G	T	0.067
A	T	<b>A</b>	A	G	C	A	C	G	A	<b>A</b>	A	C	C	<b>G</b>	G	T	G	A	C	T	A	T	T	C	<b>C</b>	A	C	0.058

### Struttura di Linkage disequilibrium del locus di *IL6ST*.

**A.** Immagine dal programma Haploview del blocco di linkage disequilibrium del locus di *IL6ST*. Il rosso indica  $D' = 1.0$  e  $LOD \geq 2.0$ , rosa/rosso  $D' < 1$  e  $LOD \geq 2.0$ , blu  $D' = 1.0$  e  $LOD < 2.0$ , bianco  $D' < 1.0$  and  $LOD < 2.0$ . Il blocco di linkage disequilibrium (segnato dalla linea nera) e' determinato secondo il metodo degli intervalli di confidenza usando i criteri di Gabriel (57). Gli Haplotype tagging SNPs sono indicati dalle black boxes.

**B.** Gli aplotipi con frequenza  $\geq 4\%$  nel blocco di linkage disequilibrium. La frequenza degli aplotipi e gli haplotype-tagging SNPs (indicati in grassetto) sono determinati per mezzo di algoritmi implementati nell'Haploview software.

**Figura 4**

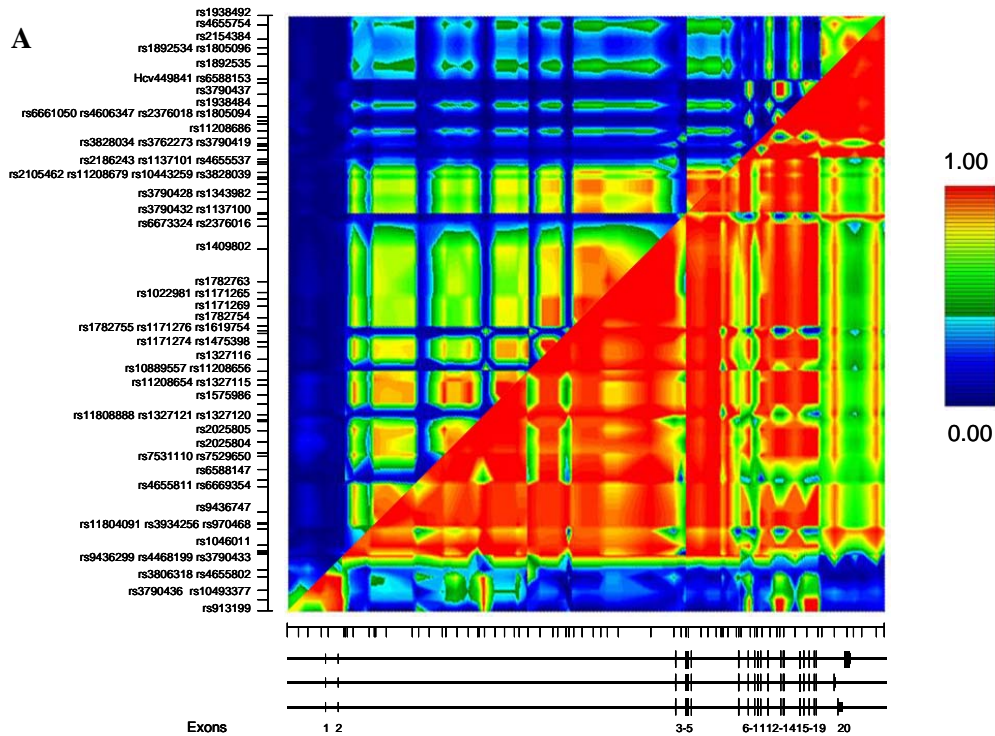


**Associazione di rs715180 con sindrome metabolica.**

Le barre rappresentano le frequenze dei portatori dell'allele minore (AC+CC) at rs715180 in individui con diverso MS score (0, 1-2, 3+) nelle due popolazioni dello studio prese singolarmente (PD e SGR) o combinate insieme (PD + SGR). Lo score è stato calcolato assegnando un punteggio per ogni componente della sindrome metabolica secondo i criteri del NCEP/ATPIII (3). P values sono aggiustati per età e sesso.



**Figura 5**



**B**

Block #1					Block #2											
	rs913199	rs3790436	rs10493377	rs3806318	rs4655802	rs9436299		rs4468199	rs3790433	rs1046011	rs11804091	rs3934256	rs970468	rs9436747	rs4655811	rs6669354
Freq							Freq									
0.33	G	G	A	A	G	C	0.39	T	C	A	A	G	G	T	G	T
0.21	T	C	G	A	A	A	0.37	T	C	G	G	C	T	C	C	T
0.13	G	G	A	A	A	A	0.10	T	T	G	G	G	T	C	C	G
0.11	T	C	G	G	A	A	0.06	C	T	G	G	G	T	C	C	T
0.06	T	G	A	A	A	A										
0.06	G	G	G	A	A	A										

Block #3																												
	rs6588147	rs7531110	rs7529650	rs2025804	rs2025805	rs11808888	rs1327121	rs1327120	rs1575986	rs11208654	rs1327115	rs10889557	rs11208656	rs1327116	rs1171274	rs1475398	rs1782755	rs1171276	rs1619754	rs1782754	rs1171269	rs1022981	rs1171265	rs1782763	rs1409802	rs6673324	rs2376016	
Freq																												
0.35	G	C	G	C	G	G	C	C	A	C	T	A	T	A	C	C	G	A	C	G	T	G	A	C	A	A	A	G
0.27	A	A	A	T	A	G	T	T	G	T	G	G	T	C	T	C	G	G	A	T	A	C	A	G	T	G	G	G
0.18	A	A	A	T	A	G	T	T	G	T	G	G	T	C	T	G	G	A	T	A	C	A	G	T	G	A	A	G
0.06	A	A	A	T	G	A	T	T	G	T	G	C	C	C	T	G	T	G	A	C	A	G	A	G	T	G	G	G

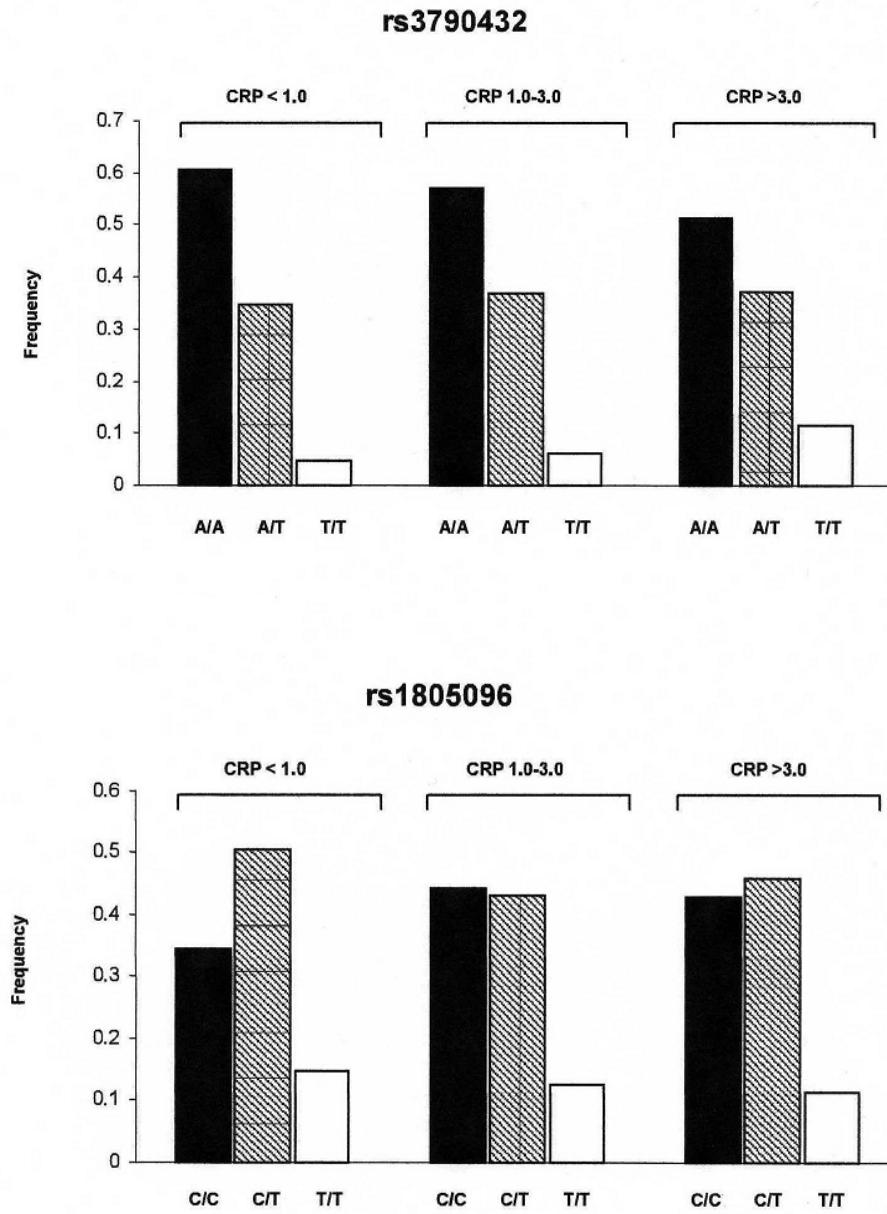
Block #4																													
	rs3790432	rs1137100	rs3790428	rs1346982	rs2105462	rs11208679	rs10443259	rs3828039	rs2186243	rs1137101	rs4655537	rs3828034	rs3762273	rs3790419	rs11208686	rs6661050	rs4606347	rs2376018	rs1805094	rs1938484	rs3790437	Hcv449841	rs6588153	rs1892535	rs1805096	rs1892534	rs2154384	rs4655754	rs1938492
Freq																													
0.23	A	A	C	G	G	C	T	T	T	T	T	T	A	T	G	G	A	C	C	A	C	T	C	G	G	A	A	T	
0.21	A	G	A	A	A	A	T	C	G	C	C	T	C	T	A	C	G	A	C	A	A	C	A	T	A	A	A	G	
0.17	T	A	C	G	G	C	T	G	C	C	T	C	C	C	G	G	A	C	C	A	A	C	A	T	C	A	G	A	T
0.09	A	A	C	G	G	C	T	T	C	C	A	T	G	G	A	G	A	C	C	G	A	A	C	A	A	A	A	A	T
0.09	A	G	A	A	A	A	T	C	G	C	C	T	A	T	G	G	A	C	C	A	C	A	C	T	C	G	G	A	T
0.06	T	A	C	G	G	C	T	T	T	T	T	A	T	G	G	G	A	C	C	A	C	A	C	T	C	G	G	A	T

**Haplotype blocks at the *LEPR* locus.**

**A.** Linkage disequilibrium tra polimorfismi.  $D'$  e  $r^2$  sono riportati rispettivamente sotto e sopra la diagonale. Sugli assi sono riportati i polimorfismi. La struttura del gene del gene di *LEPR* con le isoforme alternative e' riportata sotto la figura.

**B.** Gli aplotipi comuni definiti dai polimorfismi in ognuno dei quattro blocchi. Gli htSNPs e i corrispettivi alleli sono evidenziati in grassetto.

Figura 6



Frequenze dei genotipi di rs3790432 e rs1805096 in individui con livelli di CRP bassi (n=401), intermedi (n=154), e alti (n=75).