IGF2R: A new genetic marker related to body fat mass

Assoc. Prof. Wallaya Jongjaroenprasert, MD

Endocrine Unit, Department of Medicine,

Faculty of Medicine Ramathibodi Hospital

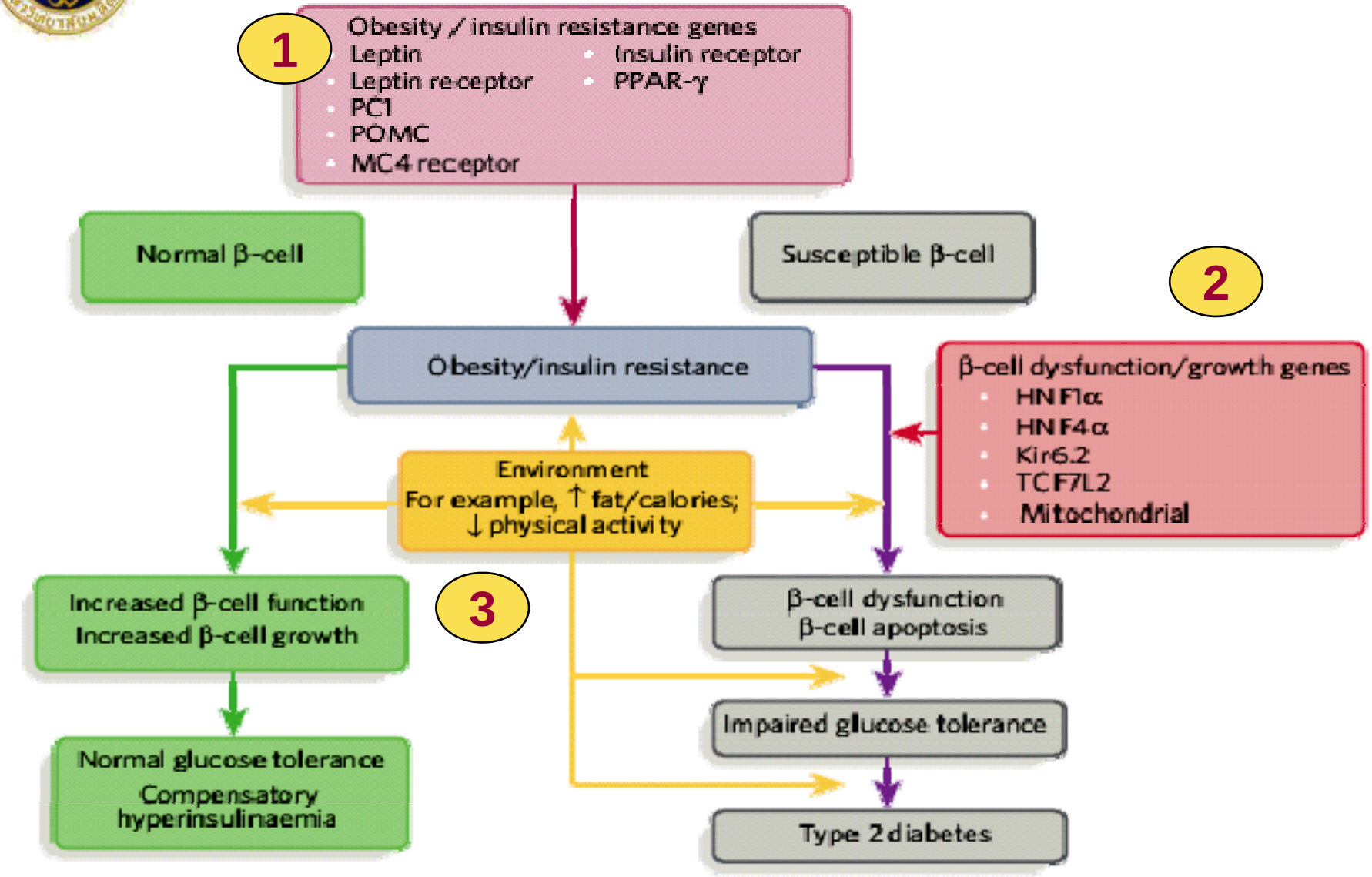
Mahidol University

Background

- Type 2 diabetes is an important risk factors for cardiovascular diseases.
- Patients with diabetes without history of previous MI have a similar risk (~20%) of a major CV events in the next 7 years as those with a history of previous myocardial infarction but no diabetes*.
- Alteration in insulin sensitivity, insulin secretion or hepatic glucose production all contribute to the underlying pathophysiology of type 2 diabetes development.

*Haffner SM, NEJM 1998

Relationships of genes, environment and intermediate phenotypes in T2DM



Stephen Kahn et al. NATURE December 2006

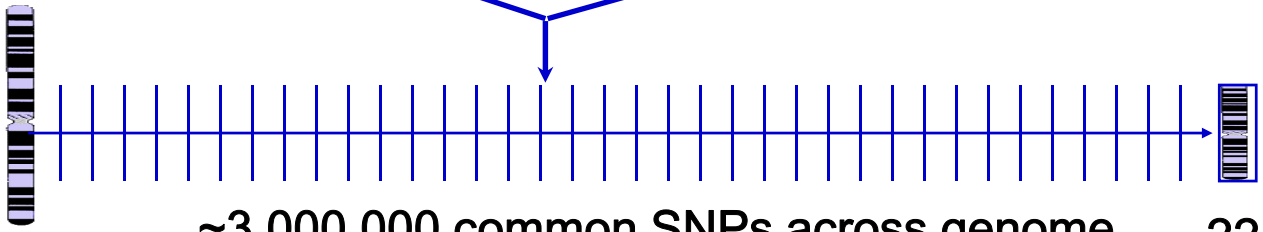
Finding the genes for complex disease we need

- Genetic association study design
- Large sample size
- Dense genetic markers
- Whole genome approach

Genome wide association study

Disease Population
N=500

Matched Control Population
N=500

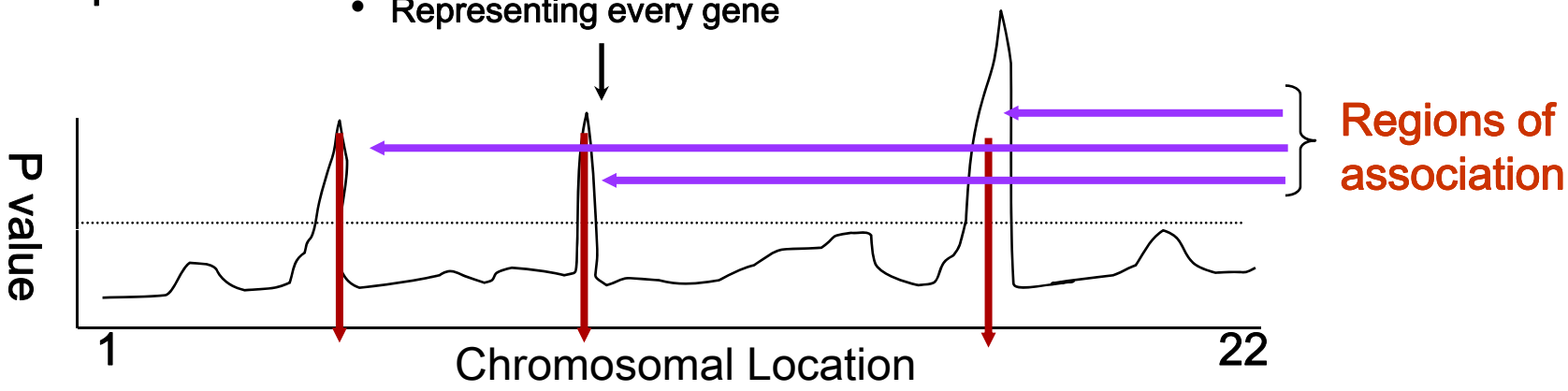


1

~3,000,000 common SNPs across genome

22

- Representing every gene

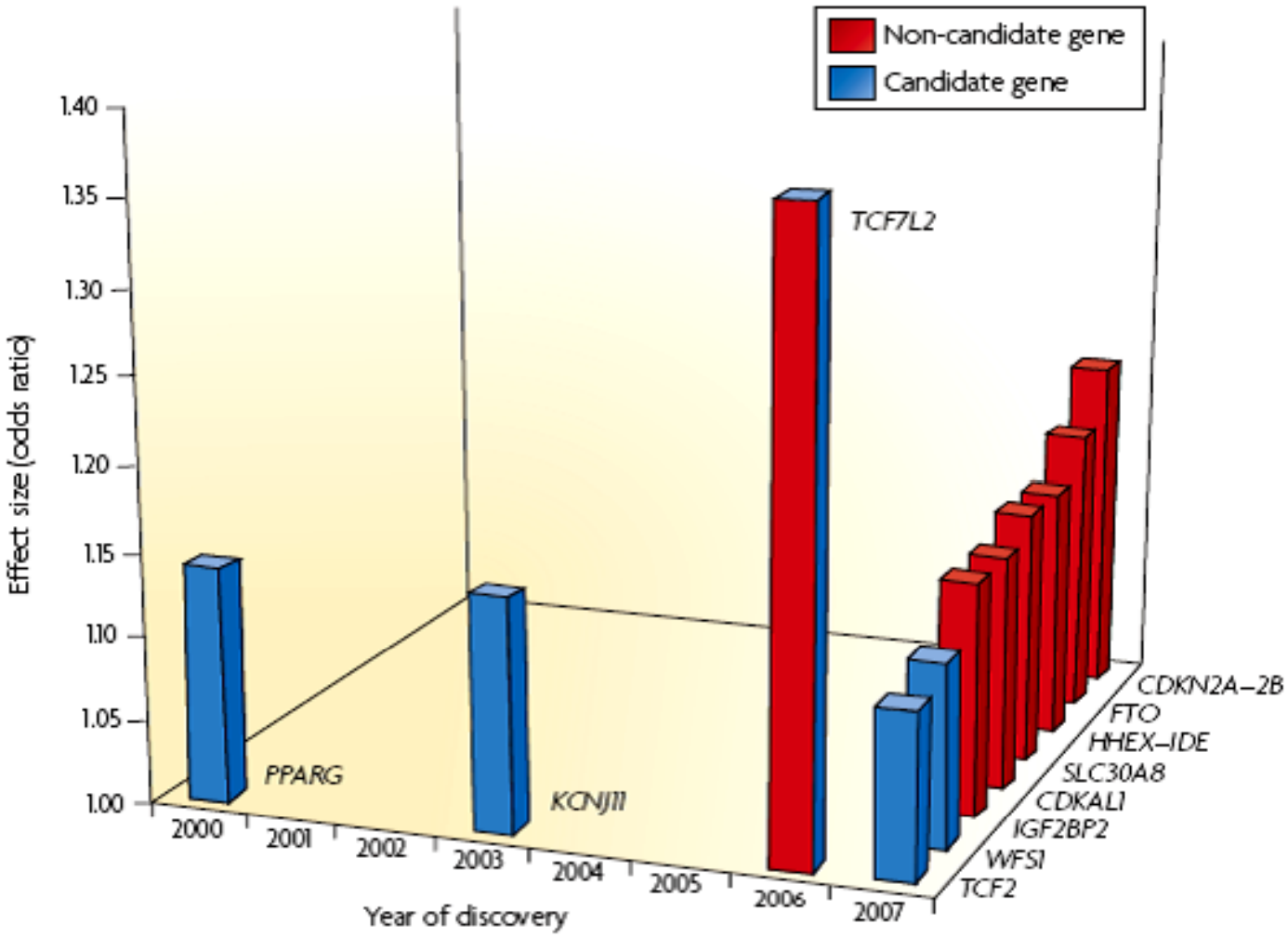


Informatics to ID gene(s) mapped to associated SNP

Genome wide scan in Type 2 diabetes

- Saxena, R. *et a* pe 2 diabetes and triglyceride lev
- Scott, L. J. *et a* Finns detects multiple susce 1345 (2007).
- Sladek, R. *et a* oci for type 2 diabetes. *Nature* 445, 88
- Zeggini, E. *et a* samples reveals risk loci for type 2 2007).
- GWA of 14,000 and 3,000 shared controls. *Natur*

Genome wide scan in Type 2 diabetes



วัตถุประสงค์หลัก

- ศึกษาในเรื่องของลักษณะทางพันธุกรรม ที่มีผลต่อการแสดงออกทางชีวภาพ (phenotype) โดยใช้เทคนิค genome wide-scan
- ศึกษาปัญหาโรคอ้วน และเมแทบอลิค ในแง่มุมต่างๆ ทั้งสาเหตุ ความชุก และผลที่ตามมาของปัญหา

การศึกษาระยะยาวถึงอิทธิพลของปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดโรคหัวใจหลอดเลือดและเมแทบอลิซึมในพนักงานการไฟฟ้าฝ่ายผลิตแห่งประเทศไทย

✓**โครงการย่อยที่ 1**

โครงการการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรม ที่นำไปสู่ปัจจัยเสี่ยงของการเกิดโรคหัวใจหลอดเลือดและเมแทบอลิซึมและมะเร็ง

โครงการย่อยที่ 2

การค้นหาตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ (biomarker) ใหม่และศึกษาหาความสัมพันธ์ระหว่างตัวบ่งชี้ทางชีวภาพต่อการก่อให้เกิดโรคหัวใจหลอดเลือดและเมแทบอลิซึมในระยะยาว

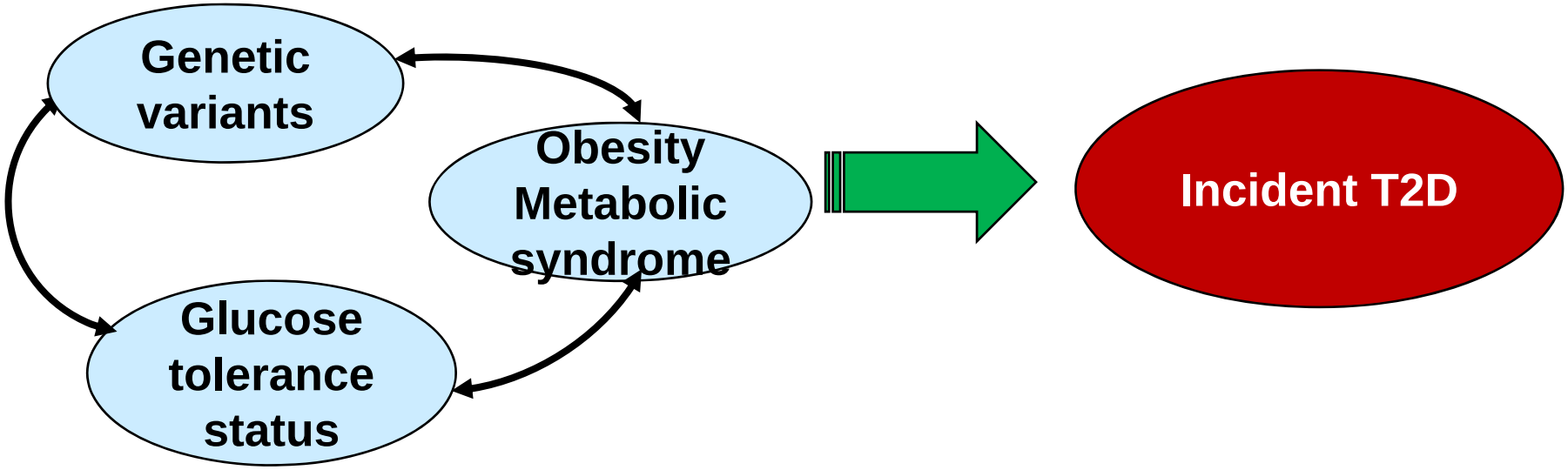
โครงการย่อยที่ 3

การศึกษาหาความสัมพันธ์ระหว่างสถานะทางเศรษฐกิจสังคม, สภาพแวดล้อม, การออกกำลังกาย, สภาวะทางจิตใจ, สภาพร่างกาย และการปรับเปลี่ยนพฤติกรรม ต่อการเกิดโรคหัวใจหลอดเลือดและเมแทบอลิซึม โรคปอด โรคอ้วน และโรคมะเร็ง

Conceptual framework

Cross-sectional analysis

Prospective analysis



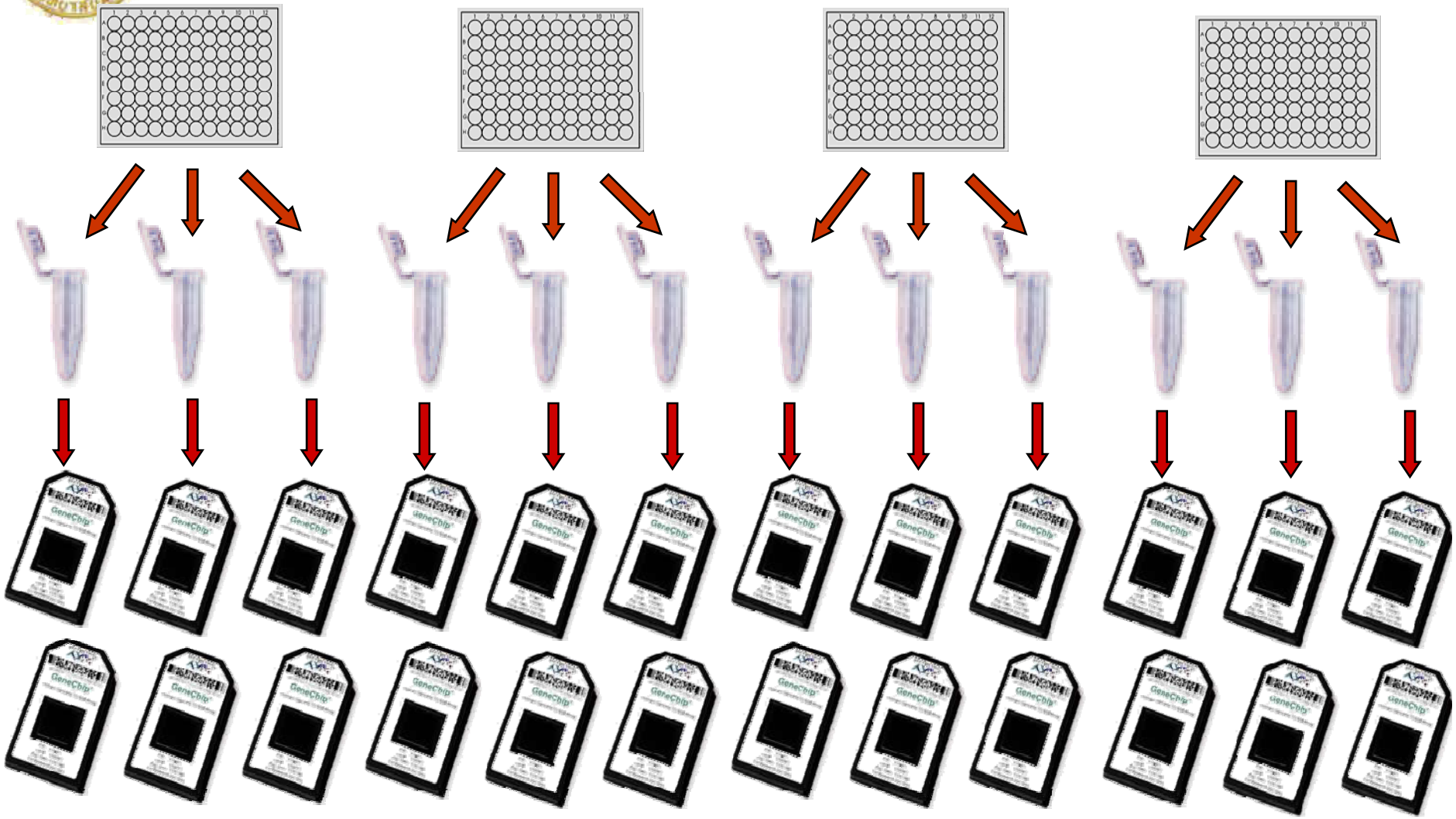
Background of Study

- จากการศึกษาก่อนหน้านี้โดย ศจ. นพ. บุญส่ง องค์พิพัฒนกุล พบความสัมพันธ์ของพันธุกรรม 3 ตำแหน่งและโรคเบาหวานอย่างมีนัยสำคัญ ได้แก่ SNP rs416572 บน *IGF2R* และ rs2270584 บน *TSPAN8* และ rs673710 บน *NDUFB6* gene กับ glucose tolerance status
- วิธีการศึกษาทำโดย DNA pooling with genome wide association study analysis.*
- การศึกษานี้จะเป็นการทดสอบยืนยันความสัมพันธ์นี้กับประชากร EGAT เพื่อยืนยันผล

*Ye Bang Ce et al. Analytical Biochem 2004, SaraH H Shaw Genome Research 1998

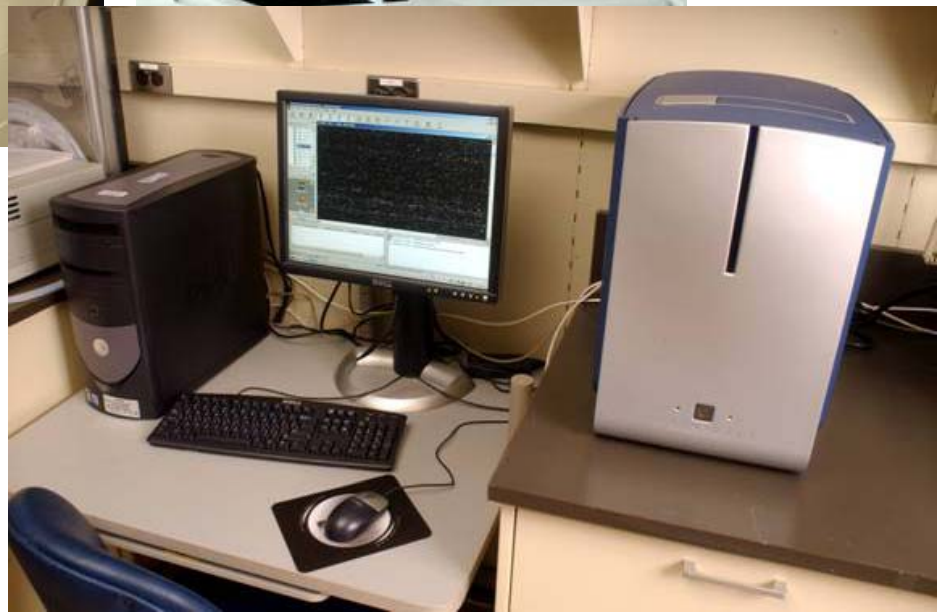
Preliminary Study

- แบ่งกลุ่มอาสาสมัคร 4 กลุ่ม ได้แก่ เบาหวานอ้วน เบาหวานไม่อ้วน คนอ้วนที่ไม่มีโรคเบาหวานและ คนผอมที่ไม่มีโรคเบาหวาน
- ทำการสกัด DNA และ pooled DNA เป็น 4 กลุ่มใหญ่
- ทำการตรวจ whole genome single nucleotide polymorphisms (SNPs) genotyping ด้วย Affymetrix GeneChip 500K แต่ละกลุ่มทำ triplicate



Obese DM Lean DM Obese NGT Lean NGT

Microarray Gene Chip Apparatus



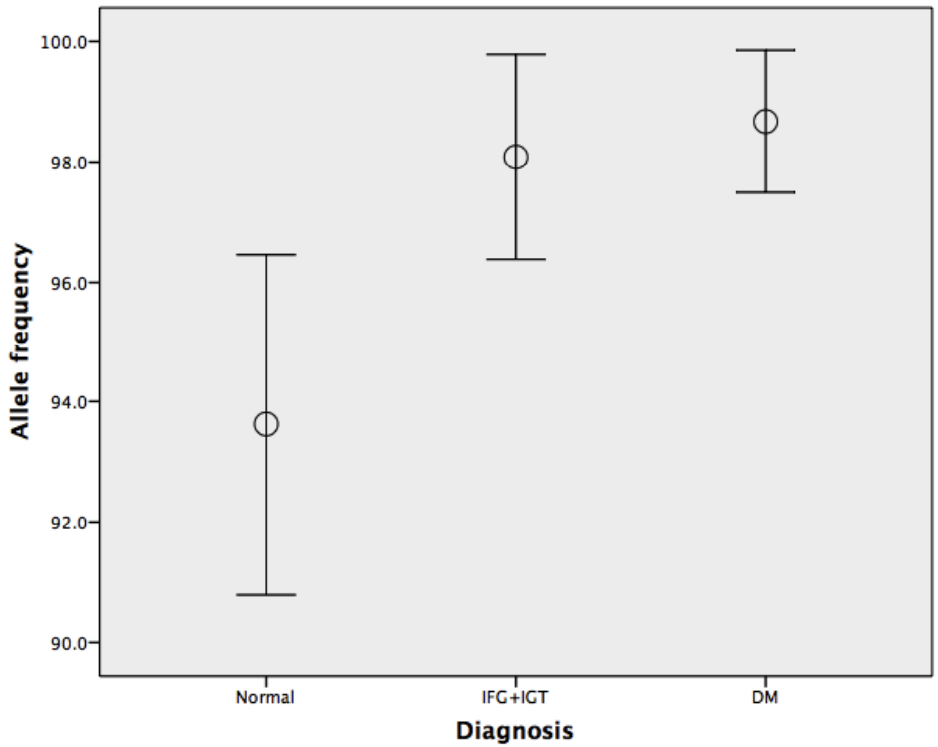
Preliminary Study

- ทำการวิเคราะห์ด้วยวิธีการเปรียบเทียบ estimated allele frequencies ระหว่าง 4 กลุ่ม เพื่อหา SNPs ที่พบบ่อยในโรคเบาหวาน

Variable	Odds Ratio	Odds ratio (95.0% CI)		P
		Lower	Upper	
BMI (kg/m^2)	1.11	1.07	1.16	< 0.001
IGF2R genotype	0.71	0.52	0.97	< 0.05
NDUFB6 genotype	1.40	1.01	1.94	< 0.05

Preliminary Study

- ความสัมพันธ์ของ allele frequency ของ rs673710 บน *NDUFB6* กับภาวะ glucose tolerance ($P < 0.05$)



IGF2R

- *IGF2R* encodes Insulin like growth factor 2 receptor.
- It contains 48 exons and spans about 136 kb.
- It is a multifunctional receptor that possesses binding sites for diverse ligands, including insulin-like growth factor II (IGF2), retinoic acid, TGF-beta, urokinase-type plasminogen activator receptor, and mannose-6-phosphate. IGF2R plays major roles in controlling IGF signaling by directing IGF2 to lysosomes.
- Cytogenetic location: 6q25.3

NDUFB6

- Encodes NADH-UBIQUINONE OXIDOREDUCTASE 1 BETA SUBCOMPLEX, 6 (mitochondrial respiratory chain).
- It is the first multisubunit enzyme complex of the mitochondrial respiratory chain.
- Cytogenetic location: 9p13.2.
- **NDUFB6** is among the set of OXPHOS genes showing significant reduction in muscle from patients with type 2 diabetes compared with healthy control subjects.*

*Mootha at al. Nature Genetics 2003

Subjects

- EGAT 3.1
  - Large cohort (2585 คน) with prospective FU
  - เก็บข้อมูลตั้งแต่อายุ 25 ปี
  - มีฐานข้อมูลที่ครบถ้วนโดยเฉพาะข้อมูลทางด้านเมตาบอลิก
  - Fresh DNA and serum

Subjects

- แบ่งกลุ่มประชากรเป็น 3 กลุ่ม
- 1. DM ; History of diabetes, on antidiabetic medication, or fasting plasma glucose ≥126mg/dl กลุ่มเบาหวาน ได้แก่กลุ่มที่มีประวัติเคยได้รับการวินิจฉัย และหรือมีประวัติทานยารักษา และหรือมีค่า fasting plasma glucose มากกว่า หรือเท่ากับ 126 mg/dl
- 2. Impaired fasting glucose (IFG); No history of previous diabetes with FPG >/= 100 mg/Dl และ <126 mg/dl
- 3. Normal glucose levels; no history of DM, IFG, IGT, และ FPG < 100 mg/dl

Methods

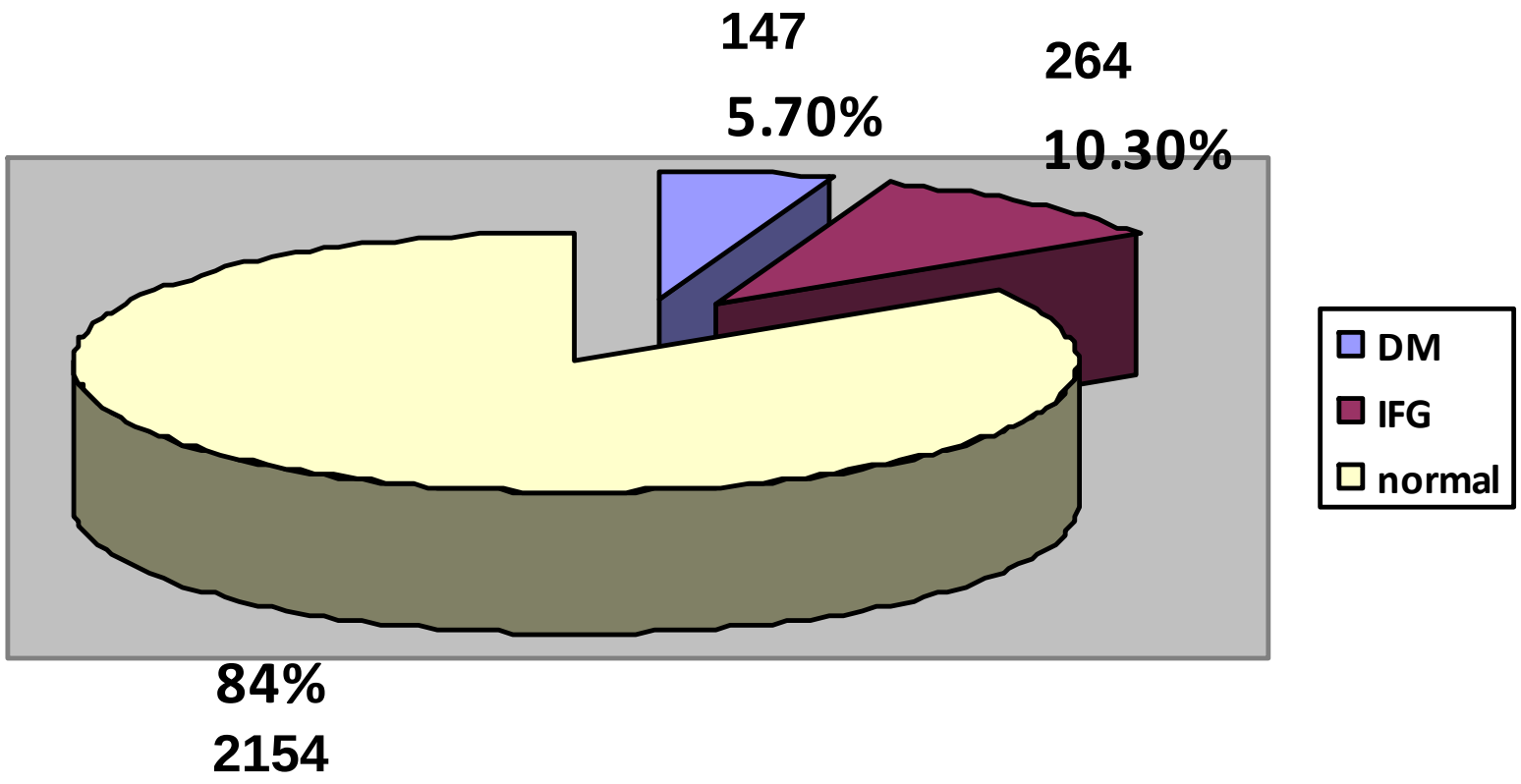
- **Clinical data:** Age, Sex, Income, history of hypertension, history of dyslipidemia, history of previous CVD, BMI, waist circumference, waist to hip ratio, parameters from Inbody analysis (percentage body fat, muscle mass, fat mass, visceral fat area)
- **Biochemical data:** Fasting plasma glucose, ALT, AST, uric acid, hsCRP, lipid profiles
- **Genetic data:** Genotyping ทั้ง 2 SNPs ด้วยวิธีการ TaqMan® assay for SNP genotyping

Analysis

- Study design: Cross-sectional analysis
- Fisher extract's test for discrete data comparison, T-test or ANOVA for continuous variables comparison.
- P Value of< 0.05 consider statistically significance.

Results

EGAT 3



Baseline clinical characteristics

	DM	IFG	Normal	P value**
Sex (%male)	13.7%	12.5%	28.7%	< 0.01#
Age (yrs)	46.14±5.43	44.31±6.19	40.38±7.04	<0.01**
BMI (kg/m²)	26.58± 4.21	25.79±4.07	23.50±3.49	<0.01**
Waist (cms)	95.15±10.36	92.15±10.36	85.14±9.87	<0.01**
Waist hip ratio	0.94±0.06	0.92±0.05	0.84±0.06	<0.01**
% body fat	29.71±7.51	27.98±7.02	26.53±7.15	<0.01**
Body fat mass	22.50±8.71	20.60±7.92	17.40±6.30	<0.01**
Visceral fat area (cm²)	117.65±34.21	111.95±31.40	91.64±32.35	<0.01**
Skeletal muscle mass	28.44±7.08	28.82±5.09	26.43±5.63	<0.01**
ALT	60.14±32.22	55.10±25.40	45.63±20.25	<0.01**
AST	29.80±27.54	25.12±13.95	21.02±12.91	<0.01**
Alkaline phosphatase	91.65±29.80	85.34±24.93	80.04±19.77	<0.01**
Uric acid	5.78±1.75	6.15±1.41	5.47±1.46	<0.01**
Cholesterol	207.78±54.22	227.08±42.49	216.21±37.60	<0.01**
HDL	46.09±10.28	47.43±10.5	52.52±12.42	<0.01**
Triglyceride	186.84±128.64	186.41±133.77	118.57±75.33	<0.01**
LDL	137.75±45.13	155.45±40.62	148.23±35.65	<0.01**
FPG	164.28±66.63	107.10±6.51	86.94±8.41	<0.01**
hsCRP	2.62±3.77	2.62±3.94	1.74±3.12	0.013**

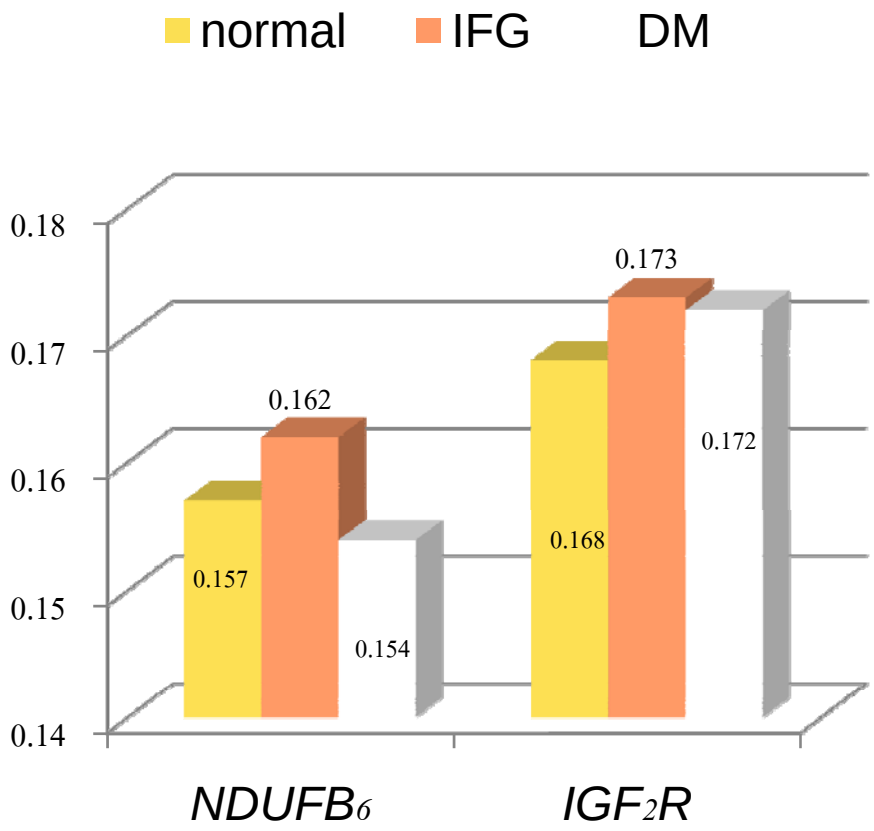
* N= 2564, ข้อมูลแสดงด้วย mean±SD

SNPs allele frequency

SNPs	Allele	Allele frequencies
rs416572 at *IGF2R*	C	0.828
	T	0.172
rs673710 at *NDUFB6*	G	0.155
	T	0.845

Results

- By Fisher extract's test there was *no difference in SNPs allele frequencies* comparing between different groups.



Results

By Fisher extract's test there was ***no difference in genotyping frequencies***, comparing between different groups.

Group	rs673710 at *NDUFB6*			rs416572 at *IGF2R*			P VALUE			
	11	12	22	11	12	22	1 vs 2	11 vs 12 vs 22	11 vs 12+22	11+12 vs 22
DM	1.3%	29.3%	69.3%	3.3%	26.7%	70%	NS	NS	NS	NS
IFG	3.5%	26%	70.5%	2.3%	30.2%	67.4%				
normal	2.5%	25.7%	71.8%	3.4%	27.6%	69%				

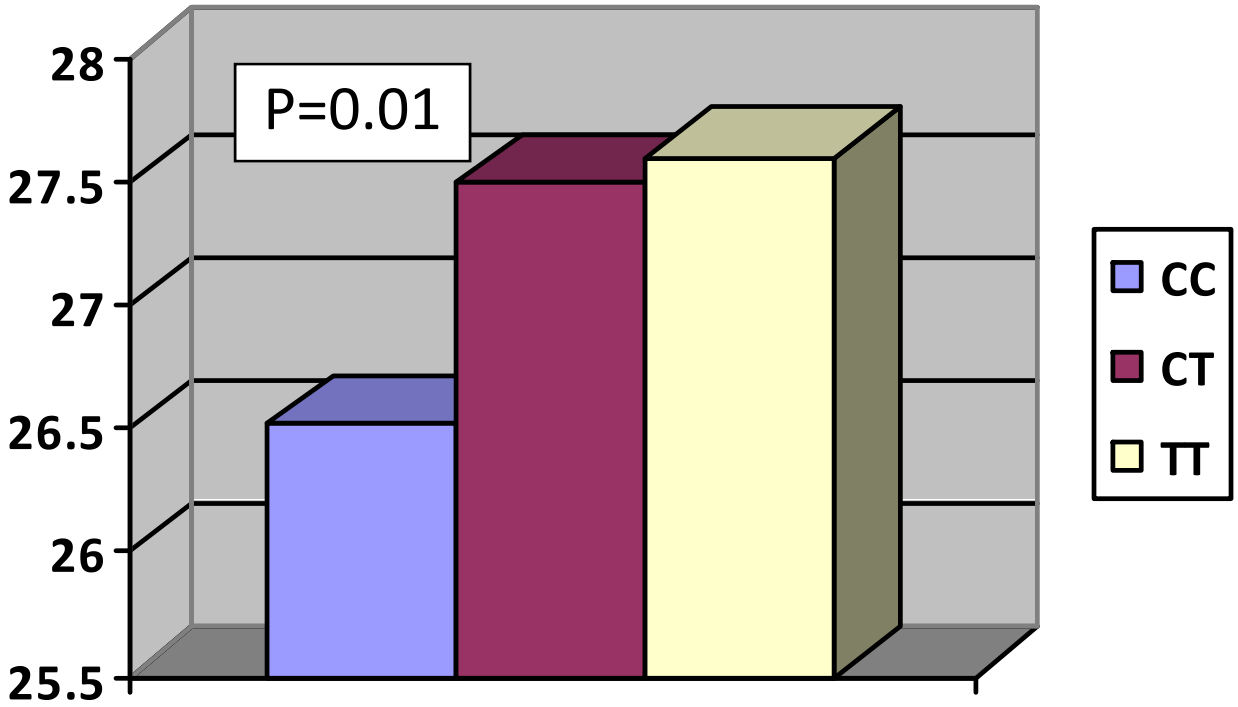
1= minor allele, 2= major allele

Results

	CC	CT	TT	P value**
BMI (kg/m^2)	23.99± 3.75	24.11±3.80	23.79±3.28	NS
Waist (cms)	86.37±10.42	86.47±10.46	86.16±9.53	NS
Waist hip ratio	0.88±0.06	0.88±0.07	0.89±0.06	NS
% body fat mass	26.53±7.26	27.49±7.08	27.61±6.82	0.01
Body fat mass	17.78±6.77	18.42±6.83	18.21±6.22	NS
Visceral fat area (cm^2)	94.02±33.42	96.80±33.44	98.08±33.16	NS
skeletal muscle mass	26.90±5.56	26.47±5.59	26.15±5.41	NS

CC; n=1743 , CT; n= 738 , TT; n=84

Subjects with CC genotype had lower %body fat than those who carried CT and TT

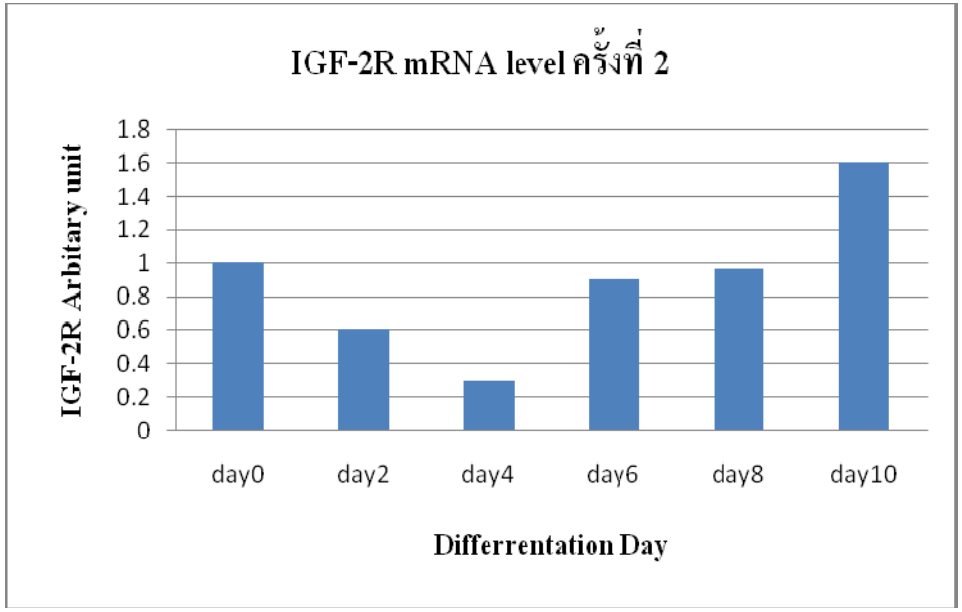


Summary

- Only 5.7% of subjects in EGAT3.1 cohort had underlying diabetes.
- Subjects with diabetes were older, and showed significantly greater components of metabolic derangement than those with IFG and normal subjects; i.e. greater BMI, WC, WHR, body fat, higher transaminase levels, high triglyceride, low HDL and higher hsCRP.
- By cross-sectional analysis, there was no association between SNPs and diabetes, partly due to the low incidence of diabetes in this cohort.

Summary

- We demonstrated here for the first time the association between T allele and percentage body fat in our subjects.
- Previous results in 3T3-L1 preadipocyte cell culture model by Ongphiphadhanakul et al. showed increased expression of *IGF2R* mRNA during differentiation to mature adipocyte.



- *Further study to explore if IGF2R* ; a candidate for genetic marker adipocity, can predict incident diabetes.

Conclusion

- By cross-sectional analysis, there was no association between SNPs of IGF2R and NDUFB6 genes in EGAT3.1 cohort.
- There is evidence of higher body fat mass in subjects who carrie T allele of SNP rs416572.

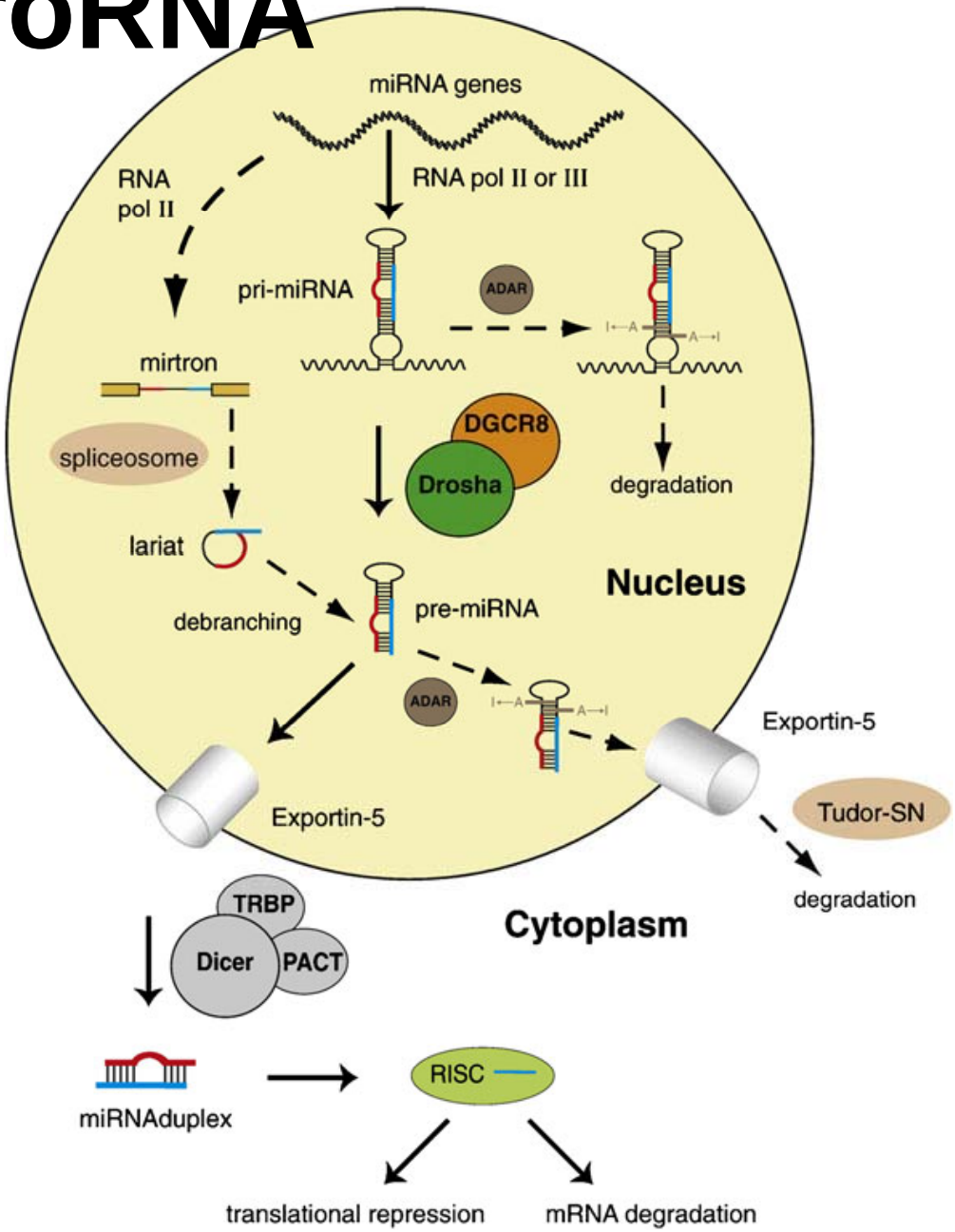
Spare

โครงการย่อยที่ 2

- **<u>วัตถุประสงค์</u>** 2.4 ค้นหา biomarker ด้วยวิธี proteomics และ metabolomics และศึกษาความสัมพันธ์ของ biomarker ต่อการเกิดโรคเบาหวานและโรคทางต่อมไร้ท่อที่เกี่ยวข้อง
- **<u>แผนงานวิจัย</u>** ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง biomarker ที่ค้นพบใหม่ และ biomarker อื่นที่อาจมีความสำคัญ ต่อการเกิดเบาหวานและโรคทางต่อมไร้ท่ออื่น
  - ค้นหา microRNA ที่เกี่ยวข้องกับโรคเบาหวานที่อ้วนและไม่อ้วน เพื่อใช้เป็น Biomarker ในการทำนายการเกิดโรคในระยะยาว

MicroRNA

- MicroRNA เป็น RNA ขนาดเล็ก มีความยาวประมาณ 21-23 nucleotide มีบทบาทสำคัญในการควบคุม post transcriptional translation ของ messenger RNA โดย microRNA จะจับกับ mRNA ที่มีลำดับเบสcomplementary กัน และทำให้ mRNA นั้นถูกทำลายในที่สุด



Detection of miRNA

- Common sites: Tissue, cells
- มีการค้นพบว่าในกระแสเลือดสามารถตรวจพบ microRNA ได้ โดย microRNA จะจับอยู่กับ apoptotic body และ exosomes ทำให้ stable ไม่ถูกทำลายโดย RNAase enzyme ได้ง่ายจึงมีความเป็นไปได้ว่าอาจนำความรู้นี้มาใช้พัฒนา biomarker สำหรับโรคต่างๆที่สามารถตรวจวัดได้ง่ายจากกระแสเลือด

Design and methods

1. ศึกษาและเปรียบเทียบ microRNA profiling ด้วย microarray ในอาสาสมัคร

- อาสาสมัครที่อ้วน (BMI > 25 kg/m^2) 5 รายที่มี type 2 DM เปรียบเทียบกับอาสาสมัคร ที่อ้วน 5 รายที่ไม่มี type 2 DM โดย match เพศและอายุ
- อาสาสมัครที่อ้วน (BMI > 25 kg/m^2) 5 ราย และอาสาสมัครที่ไม่อ้วน 5 ราย (BMI < 25 kg/m^2) โดย match อายุ และ เพศ

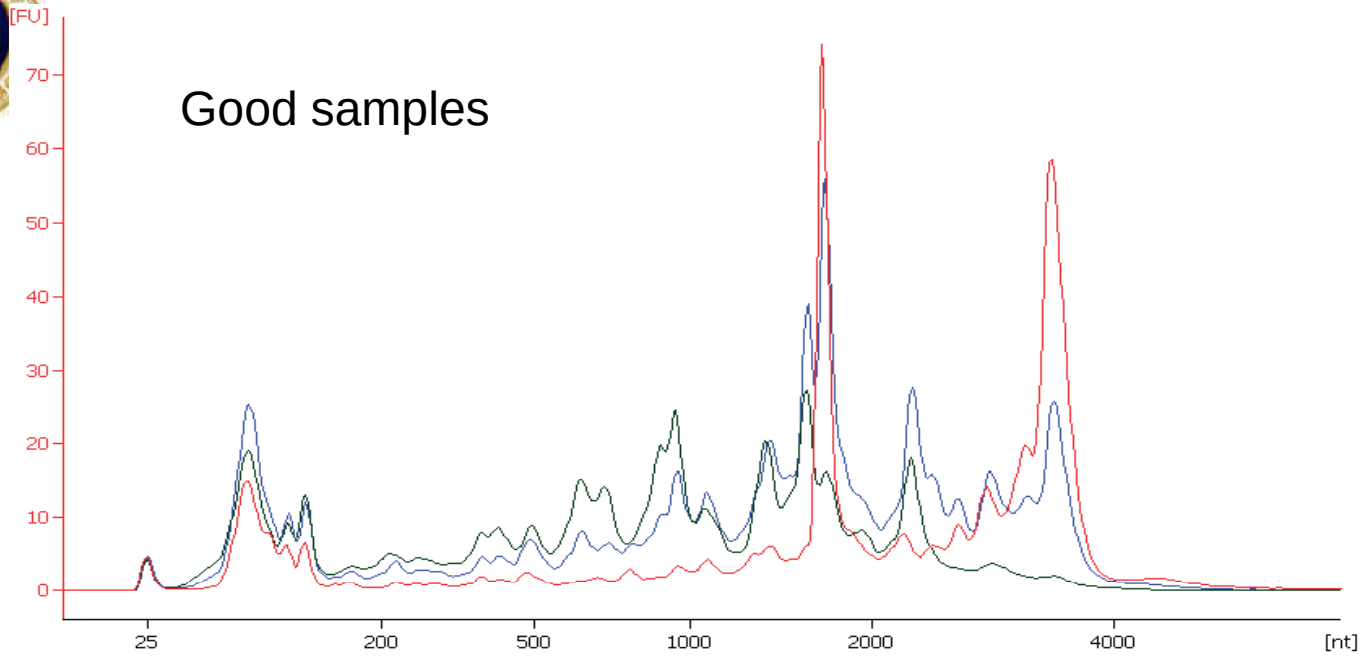
2. วัด expressure ของ microRNA ที่มี differential expression ยืนยันในกลุ่มตัวอย่าง 20 คน

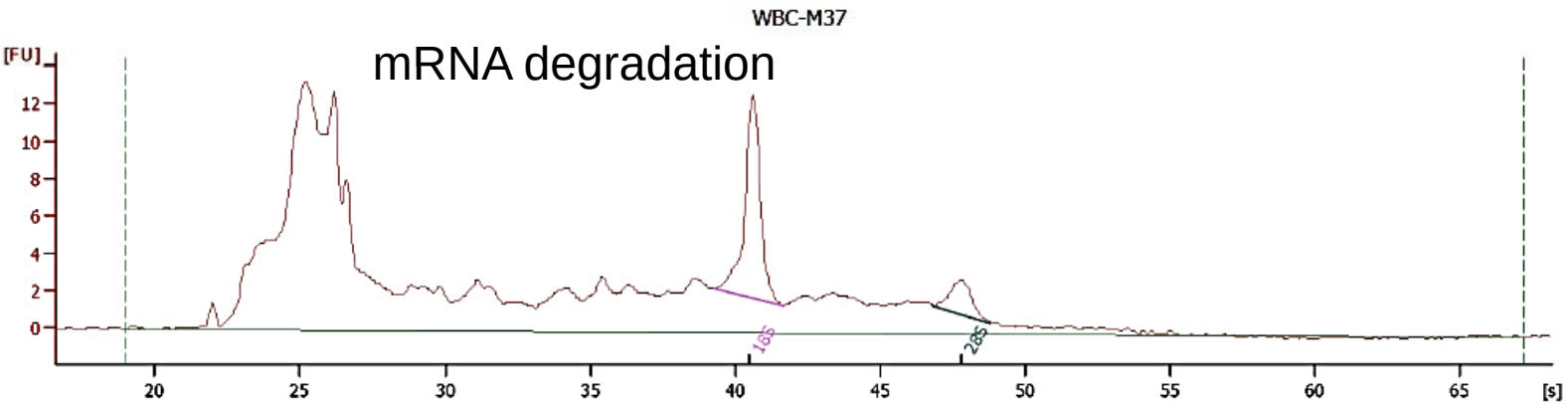
3. ทำการวัด expression ของ microRNA ที่ได้รับการยืนยันใน SERUM ของกลุ่มอาสาสมัครในโครงการ EGAT3 และติดตามระยะยาวเพื่อศึกษาว่า microRNA ที่ได้จากากรคัดกรองดังกล่าวจะเป็น biomarker ของ obesity และ type 2 DM ได้หรือไม่

Current status

- Verifying method of miRNA extraction in serum
- miRNA from mirVana isolation kit (Ambion, Austin, USA)

Sample ID	Nucleic Acid Conc.	Unit	A260	A280	260/280	260/230
Stocked serum1	10.6	ng/µl	0.266	0.204	1.31	0.41
Stocked serum2	14.3	ng/µl	0.357	0.243	1.47	0.25
fresh serum	3.2	ng/µl	0.079	0.069	1.15	0.12
WBC-M37	409.1	ng/µl	10.228	5.338	1.92	1.07


Good samples
[FU]
70
60
50
40
30
20
10
0
25
200
500
1000
2000
4000
[nt]


WBC-M37
mRNA degradation
[FU]
12
10
8
6
4
2
0
18S
28S
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65
[s]

7/25/2011