

PREVENZIONE CARDIOVASCOLARE

GWAS, PREVENZIONE CARDIOVASCOLARE E MEDICINA DI PRECISIONE

GWAS, cardiovascular prevention and precision medicine

**MARIO LUCA MORIERI^{1,2,3}, ANGELA PASSARO¹, GIOVANNI ZULIANI¹,
ALESSANDRO DORIA^{2,3}**

¹Department of Medical Science, University of Ferrara;

²Research Division, Joslin Diabetes Center, Boston, MA;

³Department of Medicine, Harvard Medical School, Boston, MA

SUMMARY

Genome-wide association studies provide a great opportunity for medical research and for clinical practice that goes from discovery of new possible therapeutic targets to the identification of subjects with beneficial (or detrimental) response to drugs. In this review, we highlight some examples that path the way to a precision medicine approach in cardiovascular prevention: e.g. the use of genetic information to identify subjects with better response to statin therapy, and a genome-wide analysis identifying carriers of variants responsible for higher cardiovascular mortality rate during intensive glycaemic control in type 2 diabetes. While further studies are warranted before the clinical translation of these findings, it is conceivable that similar precision medicine approaches will not be long in coming.

Key words: *Genome-wide association, Precision medicine, Cardiovascular prevention, Drug response, Allelic mutations.*

Gli studi di associazione genome-wide (o Genome-Wide Association Studies - GWAS), in grado di valutare l'associazione di milioni di varianti genetiche con specifiche malattie o fenotipi, hanno visto

il loro esordio in ambito cardiovascolare (CV) nel 2007, quando diversi lavori hanno identificato un locus a livello del cromosoma 9 (9p21) la cui variabilità si associava a maggior prevalenza di malattia coronarica (CAD) (1-3). Da allora, in molti campi della ricerca clinica e di base, si è assistito ad una crescita esponenziale degli studi di genomica e dell'utilizzo di altre tecnologie "omiche", come la trascrittomica, proteomica e lipidomica. Queste nuove tecnologie condividono una base comune,

Indirizzo per la corrispondenza

Mario Luca Morieri
Department of Genetic and Epidemiology
Joslin Diabetes Center
Harvard Medical School, One Joslin Place
02215, Boston, MA, USA
E-mail: mario-luca.morieri@joslin.harvard.edu

caratterizzata proprio dalla possibilità di analizzare pressoché simultaneamente centinaia, migliaia o anche milioni di variabili. Per esempio nei GWAS vengono utilizzati moderni microarray di DNA in grado di genotipizzare, per ogni soggetto studiato, milioni di polimorfismi a singolo nucleotide (Single Nucleotide Polymorphism - SNP) su tutto il cromosoma (4, 5). I moderni studi di genetica epidemiologica hanno quindi permesso di estendere la ricerca di associazioni di malattie o fenotipi con regioni geniche precedentemente mai studiate, seguendo un approccio *unbiased*, ossia senza dover selezionare a priori una lista di geni candidati. Questi studi si sono indirizzati non solo a testare le associazioni tra SNP ed eventi cardiovascolari (dove attualmente sono stati identificati, in una lista destinata ad ampliarsi, oltre 50 differenti loci) (6) ma anche l'associazione tra SNP e fattori di rischio CV, come i livelli di lipidi plasmatici (7) o di pressione arteriosa (8). Molti di questi loci ricadono in regioni geniche nuove, o poco studiate precedentemente, e spesso si associano anche a molteplici tratti metabolici e a malattia cardiovascolare (CVD), quindi estremamente interessanti per lo sviluppo di nuovi target terapeutici.

L'applicazione e traslazione clinica degli studi di genomica, in ambito di prevenzione cardiovascolare, ma anche in altri ambiti della ricerca medica, si indirizza su più livelli, connessi tra di loro ma ben distinti. Uno dei punti più interessanti, in virtù dell'approccio *unbiased*, risiede proprio nella possibilità di scoprire varianti del DNA localizzati su geni, o vicino a geni precedentemente non noti per essere coinvolti nella patogenesi della malattia cardiovascolare (5, 9). La maggior comprensione, a trecentosessanta gradi, delle basi genetiche dell'aterogenesi (compreso il ruolo del DNA non codificante, errone-

amente considerato in passato *DNA spazzatura o junk-DNA*) si sta dimostrando in grado di ampliare le nostre conoscenze in ambito fisio-patologico e anche di velocizzare l'identificazione di potenziali nuovi target terapeutici (10).

Un altro aspetto importante riguarda la possibilità di utilizzare gli SNP come marcatori di rischio cardiovascolare (11, 12). Per questo scopo i polimorfismi, selezionati per la loro associazione con CVD, vengono analizzati contemporaneamente a formare un score di rischio genetico (Genetic Risk Score - GRS, corrispondente alla somma degli alleli di rischio in ognuno di questi SNP). L'idea è quindi quella di prevedere il rischio di futuri eventi cardiovascolari sulla base del numero di alleli di rischio presenti nel genoma di una persona. Tuttavia in questo ambito i risultati non si sono ancora mostrati all'altezza delle aspettative, e al momento non ci sono dati forti in grado di suggerire l'implementazione di varianti genetiche agli attuali classici score di rischio cardiovascolare (13). Infatti, se da un lato i GRS per CVD si associano chiaramente all'incidenza di eventi cardiovascolari (11, 14, 15), non è invece altrettanto chiara la loro utilità in ambito clinico. Diversi studi, che hanno testato la performance di score di rischio clinici e genetici rispetto ai soli score di rischio clinici, hanno infatti documentato solo un minimo incremento della capacità predittiva di nuovi eventi cardiovascolari (16, 17).

Infine, un ambito estremamente promettente è quello della medicina di precisione. Ossia, l'utilizzo di variabili genetiche, con lo scopo di identificare quei soggetti in grado di ottenere i massimi benefici da un trattamento, riducendone gli effetti avversi, massimizzando quindi l'efficacia terapeutica. Un chiaro esempio è rappresentato dal recente studio di

Mega et al. (18) sull'utilizzo di un GRS in grado di suggerire chi possa trarre maggior beneficio dal trattamento con statine. In questo studio, condotto su dati provenienti da studi di coorte (il Malmö Diet and Cancer Study) insieme a dati da quattro diversi trial clinici randomizzati di prevenzione primaria (JUPITER e ASCOT trial) e secondaria (CARE e PROVE IT-TIMI) sull'utilizzo di statine, il Genetic Risk Score si basava sui 27 SNP allora noti per essere associati a CVD. Gli autori hanno infatti mostrato come, indipendentemente dai classici fattori di rischio, i soggetti con alto rischio genetico (quindi quei soggetti portatori di un maggior numero di alleli di rischio nei 27 SNP) erano caratterizzati da un significativo maggior beneficio dalla terapia con statine. Infatti la riduzione del rischio relativo di eventi cardiovascolari era pari al 13% nei soggetti con basso GRS, 29% nei soggetti con GRS intermedio, e 48% in quelli con elevato GRS. Negli studi di prevenzione primaria (JUPITER e ASCOT), queste differenze evidenziavano un number-needed-to-treat (NNT) (pari alla stima del numero di soggetti che devono essere trattati con statine per prevenire un singolo evento cardiovascolare in 10 anni) circa 3 volte inferiore nei soggetti con elevato GRS rispetto quelli con basso GRS (rispettivamente 25 *vs* 66 nello studio JUPITER e 20 *vs* 57 nello studio ASCOT). Queste analisi, sebbene derivanti da studi post-hoc, suggeriscono quindi come l'utilizzo di informazioni genetiche possa meglio indirizzare la nostra scelta su chi trattare e chi no. In tal senso, sono promettenti i dati riportati da Kullo et al. (19), su un trial clinico randomizzato condotto alla Mayo Clinic su 206 pazienti in prevenzione primaria. In questo studio i pazienti venivano randomizzati a ricevere una valutazione del rischio cardiovascolare, secondo i classici score di rischio (conventional

risk score - CRS) oppure a ricevere la stessa valutazione con l'aggiunta di informazioni sul GRS (basato su 27 SNP associati a CAD). Dopo questa iniziale valutazione il paziente e il medico decidevano insieme se iniziare o meno terapia con statina. L'obiettivo primario era rivalutare il profilo lipidico e l'utilizzo di statine dopo 6 mesi di follow-up. Al termine dello studio il gruppo con CRS+GRS aveva livelli di colesterolo LDL più bassi e un maggior utilizzo di statine rispetto al gruppo CRS. Inoltre, all'interno del gruppo che aveva ricevuto la valutazione del rischio cardiovascolare combinata (CRS+GRS), i soggetti con elevato GRS avevano un più alto utilizzo di statine rispetto i soggetti con basso GRS (19). Altresì è interessante notare come non venivano registrate differenze nelle abitudini alimentari o nel livello di ansia tra i due gruppi. Sebbene condotto su una popolazione ridotta, in un unico centro, con approccio non blinded, ed esclusivamente tra soggetti bianchi non-ispatici, questo studio conferma come l'utilizzo dei GRS potrebbe rappresentare uno strumento importante nel percorso di decisione della terapia insieme al paziente.

Un ulteriore esempio di GWAS in ambito di prevenzione cardiovascolare, e quindi finalizzato ad una medicina di precisione, è rappresentato dal nostro recente GWAS condotto sulla popolazione di soggetti diabetici, ad elevato rischio cardiovascolare, del trial clinico ACCORD (Action to Control Cardiovascular Risk in Diabetes). Questo studio, condotto in collaborazione tra diverse università americane (Joslin Diabetes Center-Harvard Medical School, University of Virginia e University of North Carolina) nasceva dalla pubblicazione nel 2008 dei sorprendenti risultati dell'ACCORD (21), confermati anche nei trial ADVANCE e VADT(22), che il trattamento glicemico intensivo (target HbA1c

<6%) vs un trattamento glicemico standard (target HbA1c 7-7,9%) non fosse in grado di ridurre l'incidenza di eventi cardiovascolari maggiori (mortalità cardiovascolare e infarto o ictus non fatali). Non solo non veniva confermato quanto chiaramente suggerito dai dati epidemiologici riguardanti l'associazione inversa tra HbA1c ed eventi cardiovascolari maggiori (23, 24), ma ancor più sorprendentemente, lo studio ACCORD fu interrotto anticipatamente per il riscontro di un significativo incremento del rischio di mortalità totale e cardiovascolare (HR 1,22; 95% IC 1,01-1,46 e HR 1,35; 95% IC 1,04-1,76, rispettivamente) associato a trattamento glicemico intensivo (nonostante riduzione del rischio di infarto miocardico non fatale, HR 0,76; 95% IC 0,62-0,92).

L'obiettivo dello studio GWAS era quindi di analizzare l'influenza del background genetico in questi sorprendenti risultati e quindi di identificare quei soggetti a maggior rischio di complicanze (mortalità cardiovascolare). L'analisi di circa 7 milioni di varianti genetiche comuni (SNP con frequenza allelica maggiore del 5% nella popolazione studiata, di origine europea), ha permesso di identificare 2 segnali distinti, a livello del cromosoma 10 e 5, che indicavano la presenza di 2 SNP associati ad aumentato rischio di mortalità cardiovascolare durante il trattamento glicemico intensivo ($P < 5 \times 10^{-8}$). La combinazione di queste 2 varianti (in un GRS composto dalla somma degli alleli di rischio in ogni SNP, quindi in un range variabile da 0 a 4), ha permesso di individuare quei soggetti, portatori di almeno 2 alleli di rischio, che se trattati con controllo glicemico intensivo erano esposti ad elevato rischio di mortalità cardiovascolare (HR 3,08; 95% IC 1,82-5,21) senza trarre nessun beneficio in termine di riduzione di infarto miocardico non fatale (HR 0,96; 95% IC 0,67-1,36). Al

contrario i soggetti non portatori di alleli di rischio (GRS=0) traevano un doppio vantaggio, con una riduzione del 75% del rischio di mortalità cardiovascolare (HR 0,24; 95% IC 0,07-0,86) e di quasi il 50% per eventi coronarici non fatali (HR 0,56; 95% IC 0,35-0,90). L'associazione tra bassi livelli di HbA1c e GRS sulla mortalità cardiovascolare, è stata poi confermata anche in setting osservazionali nello studio ORIGIN e in una coorte del Joslin Diabetes Center (20). Infine l'integrazione con i dati del progetto GtEx, condotto in una popolazione diversa, che combinava genomica e trascrittomica (ossia analisi GWAS associate a misurazioni dei livelli di espressione di migliaia di mRNA in diversi tessuti), ha confermato che queste varianti non-codificanti si associavano a diversi livelli di espressione di geni specifici (*MGMT* per la variante sul cromosoma 10 e *NSA2* per la variante sul cromosoma 5). Il possibile ruolo di questi geni nello sviluppo dell'aterogenesi nei pazienti con diabete di tipo 2 sarà oggetto di ulteriori indagini. Anche in questo caso quindi, l'applicazione della genomica in un grande trial clinico, oltre a suggerire possibili strategie per una medicina di precisione, ha permesso di evidenziare nuovi possibili pathway (e quindi target) fisiopatologici.

Infine, gli studi GWAS possono essere integrati anche ad approcci di tipo "gene candidato". Ad esempio, il nostro gruppo ha recentemente riportato come l'utilizzo di una singola variante gain-of-function di *LPL* (codificante per la lipasi lipoproteica) fosse in grado di identificare i soggetti con minore (i portatori della mutazione) o maggiore (i non portatori) beneficio da terapia con fenofibrato nel trial clinico ACCORD-Lipid (26). In questo caso l'ipotesi a priori era supportata da due importanti aspetti:

- 1) l'azione farmacodinamica del farmaco studiato: il fenofibrato ha infatti un tar-

get farmacologico ben definito, PPAR-alpha, il cui pathway di azione è studiato da anni, ed include la stimolazione dell'attività di LPL;

- 2) l'importanza clinica della variante analizzata: infatti un recente studio di Exome-wide analysis (caratterizzato dallo studio di varianti codificanti, responsabili di mutazioni in grado di influenzare la struttura e funzione delle proteine) aveva identificato, attraverso lo studio di quasi 200 mila soggetti, che questa variante di *LPL* si associava a ridotti valori di trigliceridi e minor rischio cardiovascolare (25).

In conclusione, questi esempi mostrano chiaramente come l'impiego della genomica e delle nuove tecnologie

“omiche” possa rappresentare uno strumento essenziale verso un approccio più personalizzato, appunto definito come medicina di precisione, nella prevenzione cardiovascolare. Le informazioni, e il livello di evidenza che abbiamo in mano in questo momento, sono tuttavia ancora insufficienti per avviare il loro utilizzo nella pratica clinica odierna.

Tuttavia, con l'aumentare della numerosità delle popolazioni analizzate negli studi GWAS e la loro miglior fenotipizzazione, insieme alla validazione di questi risultati in studi indipendenti tra loro e idealmente tramite trial clinici guidati dal background genetico è lecito aspettarsi riscontri pratici di questi studi in tempi rapidi.

RIASSUNTO

Gli studi di associazione a livello genomico rappresentano una grande opportunità per la ricerca medica e per la pratica clinica, che va dalla scoperta di nuovi possibili bersagli terapeutici all'identificazione di soggetti con risposta favorevole (o dannosa) ai farmaci. In questa recensione, evidenziamo alcuni esempi che aprono la strada ad un approccio di medicina di precisione nella prevenzione cardiovascolare: ad es. l'uso di informazioni genetiche per individuare soggetti con una migliore risposta alla terapia con statine, e un'analisi genomica che identifichi i portatori di varianti responsabili di una maggiore mortalità cardiovascolare durante il controllo glicemico intensivo nel diabete di tipo 2. Mentre sono giustificati ulteriori studi prima che questi risultati si traducano nella pratica clinica, è ragionevole pensare di non dover attendere ancora a lungo simili approcci di medicina di precisione.

Parole chiave: *GWAS (Genome-wide association), Medicina di precisione, Prevenzione cardiovascolare, Risposta ai farmaci, Mutazioni alleliche.*

Bibliografia

1. Helgadottir A, Thorleifsson G, Manolescu A, Gretarsdottir S, Blondal T, Jonasdottir A, et al. A common variant on chromosome 9p21 affects the risk of myocardial infarction. *Science*. 2007; 316: 1491-3.
2. McPherson R, Pertsemlidis A, Kavaslar N, Stewart A, Roberts R, Cox DR, et al. A common allele on chromosome 9 associated with coronary heart disease. *Science*. 2007; 316: 1488-91.
3. Samani NJ, Erdmann J, Hall AS, Hengstenberg C, Mangino M, et al. Genomewide association analysis of coronary artery disease. *The New England journal of medicine*. 2007; 357: 443-53.
4. Manolio TA. Genomewide association studies and assessment of the risk of disease. *The New England journal of medicine*. 2010; 363: 166-76.
5. Nikpay M, Goel A, Won HH, Hall LM, Willenborg C, Kanoni S, et al. A comprehensive 1,000 Genomes-based genome-wide association meta-analysis of coronary artery disease. *Nature genetics*. 2015; 47: 1121-30.
6. CARDIoGRAMplusC4D-Consortium, Deloukas P, Kanoni S, Willenborg C, Farrall M, Assimes TL, et al. Large-scale association analysis identifies new risk loci for coronary artery disease. *Nature genetics*. 2013; 45: 25-33.
7. Global Lipids Genetics C, Willer CJ, Schmidt EM, Sengupta S, Peloso GM, Gustafsson S, et

- al. Discovery and refinement of loci associated with lipid levels. *Nature genetics*. 2013; 45: 1274-83.
8. Warren HR, Evangelou E, Cabrera CP, Gao H, Ren M, Mifsud B, et al. Genome-wide association analysis identifies novel blood pressure loci and offers biological insights into cardiovascular risk. *Nature genetics*. 2017; 49: 403-15.
 9. Kessler T, Vilne B, Schunkert H. The impact of genome-wide association studies on the pathophysiology and therapy of cardiovascular disease. *EMBO Mol Med*. 2016; 8: 688-701.
 10. Barrett JC, Dunham I, Birney E. Using human genetics to make new medicines. *Nat Rev Genet*. 2015; 16: 561-2.
 11. Assimes TL, Salfati EL, Del Gobbo LC. Leveraging information from genetic risk scores of coronary atherosclerosis. *Current opinion in lipidology*. 2017; 28: 104-12.
 12. Natarajan P, O'Donnell CJ. Reducing Cardiovascular Risk Using Genomic Information in the Era of Precision Medicine. *Circulation*. 2016; 133: 1155-9.
 13. Piepoli MF, Hoes AW, Agewall S, Albus C, Brotons C, Catapano AL, et al. 2016 European Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice: The Sixth Joint Task Force of the European Society of Cardiology and Other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice (constituted by representatives of 10 societies and by invited experts) Developed with the special contribution of the European Association for Cardiovascular Prevention & Rehabilitation (EACPR). *European Heart Journal*. 2016; 37: 2315-81.
 14. Thanassoulis G, Peloso GM, Pencina MJ, Hoffmann U, Fox CS, Cupples LA, et al. A genetic risk score is associated with incident cardiovascular disease and coronary artery calcium: the Framingham Heart Study. *Circ Cardiovasc Genet*. 2012; 5: 113-21.
 15. Bjornsson E, Gudbjartsson DF, Helgadottir A, Gudnason T, Gudbjartsson T, Eyjolfsson K, et al. Common sequence variants associated with coronary artery disease correlate with the extent of coronary atherosclerosis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2015; 35: 1526-31.
 16. Krarup NT, Borglykke A, Allin KH, Sandholt CH, Justesen JM, Andersson EA, et al. A genetic risk score of 45 coronary artery disease risk variants associates with increased risk of myocardial infarction in 6041 Danish individuals. *Atherosclerosis*. 2015; 240: 305-10.
 17. Morris RW, Cooper JA, Shah T, Wong A, Drenos F, Engmann J, et al. Marginal role for 53 common genetic variants in cardiovascular disease prediction. *Heart*. 2016; 102: 1640-7.
 18. Mega JL, Stitzel NO, Smith JG, Chasman DI, Caulfield MJ, Devlin JJ, et al. Genetic risk, coronary heart disease events, and the clinical benefit of statin therapy: an analysis of primary and secondary prevention trials. *Lancet*. 2015; 385: 2264-71.
 19. Kullo IJ, Jouni H, Austin EE, Brown SA, Kruiselsbrink TM, Isseh IN, et al. Incorporating a Genetic Risk Score Into Coronary Heart Disease Risk Estimates: Effect on Low-Density Lipoprotein Cholesterol Levels (the MI-GENES Clinical Trial). *Circulation*. 2016; 133: 1181-8.
 20. Shah HS, Gao H, Morieri ML, Skupien J, Marvel S, Pare G, et al. Genetic Predictors of Cardiovascular Mortality During Intensive Glycemic Control in Type 2 Diabetes: Findings From the ACCORD Clinical Trial. *Diabetes care*. 2016; 39: 1915-24.
 21. Action to Control Cardiovascular Risk in Diabetes Study G, Gerstein HC, Miller ME, Byington RP, Goff DC, Jr., Bigger JT, et al. Effects of intensive glucose lowering in type 2 diabetes. *The New England journal of medicine*. 2008; 358: 2545-59.
 22. Skyler JS, Bergenstal R, Bonow RO, Buse J, Deedwania P, Gale EA, et al. Intensive glycemic control and the prevention of cardiovascular events: implications of the ACCORD, ADVANCE, and VA Diabetes Trials: a position statement of the American Diabetes Association and a Scientific Statement of the American College of Cardiology Foundation and the American Heart Association. *J Am Coll Cardiol*. 2009; 53: 298-304.
 23. Selvin E, Marinopoulos S, Berkenblit G, Rami T, Brancati FL, Powe NR, et al. Meta-analysis: glycosylated hemoglobin and cardiovascular disease in diabetes mellitus. *Ann Intern Med*. 2004; 141: 421-31.
 24. Stettler C, Allemann S, Juni P, Cull CA, Holman RR, Egger M, et al. Glycemic control and macrovascular disease in types 1 and 2 diabetes mellitus: Meta-analysis of randomized trials. *American heart journal*. 2006; 152: 27-38.
 25. Myocardial Infarction G, Investigators CAEC, Stitzel NO, Stirrups KE, Masca NG, Erdmann J, et al. Coding Variation in ANGPTL4, LPL, and SVEP1 and the Risk of Coronary Disease. *The New England journal of medicine*. 2016; 374: 1134-44.
 26. Morieri ML, Shah H, Doria A, the Action to Control Cardiovascular Risk in Diabetes Genetic Study G. Variants in ANGPTL4 and the Risk of Coronary Artery Disease. *The New England journal of medicine*. 2016; 375: 2304-5.