A.D. MDLXII

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI SASSARI

Scuola di Dottorato di Ricerca in Scienze Biomediche

Indirizzo in Fisiopatologia Medica
XXVII ciclo

Genetic variants involved in Blood Pressure response to losartan identified by GWAS methodology

Direttore della Scuola:
Prof. Andrea Piana

Responsabile di indirizzo:
Prof. Roberto Manetti

Relatore:
Prof. Nicola Glorioso

Dottoranda:
Dr.ssa Roberta Zaninello

Anno Accademico 2013-2014

INDICE

Sommario delle attività svolte durante il triennio della Scuola di Dottorato in Scienze Biomediche: temi di ricerca sviluppati, risultati scientifici e stato delle pubblicazioni **pag. 3**

1. INTRODUZIONE **pag. 8**

1.1 Farmacogenomica dell'Ipertensione pag. 8
1.2 Diuretici pag. 10
1.3 ACE-inibitori (ACEi) pag. 13
1.4 Beta-Bloccanti pag. 14
1.5 Sartani – Bloccanti del recettore dell'angiotensina II pag. 15

2. SOPHIA STUDY **pag. 18**

3. MATERIALI E METODI **pag. 19**

3.1 Genotipizzazione ed Imputazione pag. 22
3.2 Analisi statistica pag. 23

4. RISULTATI **pag. 25**

4.1 Replicazione dei risultati in coorti indipendenti pag. 27

5. DISCUSSIONE **pag. 28**

6. CONCLUSIONI **pag. 32**

Prospettive future pag. 32

7. FIGURE E TABELLE **pag. 34**

8. BIBLIOGRAFIA **pag. 56**

Sommario delle attività svolte durante il triennio della Scuola di Dottorato in Scienze Biomediche: temi di ricerca sviluppati, risultati scientifici e stato delle pubblicazioni

Il mio lavoro di ricerca nel corso del triennio della Scuola di Dottorato in Scienze Biomediche, indirizzo di Fisiopatologia Medica, si è svolto principalmente su temi inerenti la genetica e la farmacogenomica dell'Ipertensione arteriosa essenziale e l'analisi di fenotipi intermedi quali la massa cardiaca:

1) studio "Hypergenes": pubblicato su Hypertension, 2012
2) farmacogenomica della idroclorotiazide: sottomesso per pubblicazione
3) analisi delle varianti geniche nella regolazione pressoria nell'uomo: sottomesso per pubblicazione
4) farmacogenomica dei beta-bloccanti: in corso di analisi
5) studio SOPHIA - farmacogenomica del losartan: pubblicato su Hypertension, 2013 e su Pharmacogenomics, 2014
6) analisi delle determinanti geniche della massa cardiaca nell'ipertensione arteriosa essenziale: in corso di analisi
7) effetti sesso-specifici di varianti geniche nella regolazione della pressione arteriosa nell'uomo: pubblicato su PLoS ONE 2013 e analisi della omogeneità genetica della popolazione sarda: pubblicato su PLoS ONE 2014.

In particolare:

1) lo studio Hypergenes aveva lo scopo di identificare nuove mutazioni genetiche alla base dell' ipertensione arteriosa essenziale. La ricerca in oggetto, condotta nel contesto di un progetto approvato nel settimo Frame Work della

Commissione Europea, ha concluso la sua prima fase con la pubblicazione, sulla rivista internazionale "Hypertension" nel Febbraio 2012, di un lavoro scientifico, dal titolo *Genome-wide association study using a high-density SNP-array and case-control design identifies a novel hypertension susceptibility locus in the promoter region of eNOS*, del quale sono coautrice. E' stata identificata una mutazione nel promotore del gene "eNOS", che catalizza la sintesi di ossido nitrico dall'endotelio vascolare. L'ossido nitrico è uno dei responsabili della vasodilatazione ed è quindi strettamente correlato con la pressione arteriosa.

2) Per quanto riguarda la farmacogenomica della idroclorotiazide, abbiamo indagato le varianti geniche associate alla risposta pressoria all'idroclorotiazide attraverso un'analisi di associazione genome-wide condotta in due coorti italiane di pazienti ipertesi mai trattati: 343 campioni provenienti dalla Sardegna e 142 da Milano.

Abbiamo identificato alcuni polimorfismi che mappano in due geni coinvolti negli stessi pathways che possono essere rilevanti per l'effetto antiipertensivo dell'idroclorotiazide: nel gene TET2 (Tet Methylcytosine Dioxygenase 2) e nel gene CSMD1 (CUB and Sushi multiple domains protein. Il gene TET2 codifica per una diossigenasi che converte la 5-metilcitosina in 5-idrossimetilcitosina e gioca un ruolo chiave nella demetilazione attiva del DNA. Uno studio recente ha identificato TET2 come un mediatore aldosterone-responsive della trascrizione del gene del canale epiteliale del sodio αENaC nelle cellule interne midollari del dotto collettore.

Una "up-regulation" gene-dipendente dell'attività di αENaC potrebbe portare ad una ritenzione di sodio e di conseguenza ad una espansione di volume, che in ultima analisi interessa la regolazione pressoria.

CSMD1 codifica per una proteina trans-membrana che appartiene alla famiglia delle proteine vacuolari sorting-13 e che recentemente è stata associata con arteriopatia periferica, sindrome metabolica e aumentato rischio di

ipertensione, sebbene il suo preciso ruolo all'inizio e/o durante la malattia debba essere ancora chiarito.

Il manoscritto relativo a questo studio, di cui sono coautrice, dal titolo *TET2 and CSMD1 genes affect systolic blood pressure response to hydrochlorothiazide in never treated essential hypertensives* è attualmente sotto analisi referale da parte di un giornale internazionale con alto fattore di impatto.

Abbiamo contestualmente indagato il time-course della attività reninica plasmatica (PRA) e della pressione arteriosa in risposta alla terapia antiipertensiva con diuretici tiazidici con l'intento di definire la modulazione acuta e cronica del sistema renina-angiotensina in risposta alla terapia antiipertensiva con diuretici tiazidici.

3) In collaborazione con il Whitaker Cardiovascular Institute, Department of Medicine, University School of Medicine di Boston-Massachusetts, abbiamo creato un modello sperimentale convincente che evidenzia ATP1A1 come gene di suscettibilità all'ipertensione nei maschi sardi. ATP1A1 codifica per l'isoforma α1Na,K-ATPasi, l'unica pompa sodica nell'endotelio vascolare e nelle cellule epiteliali tubulari renali. Il sequenziamento del DNA ha evidenziato un polimorfismo inserzione/delezione di 12 timine con una sequenza poli-T (38T vs 26T) nella regione regolatoria- 5' del gene ATP1A1. L'allele inserzione 12T sembra diminuire la suscettibilità all'ipertensione. Per testare l'effetto della diminuzione dell'espressione dell'α1Na,K-ATPasi sulla pressione arteriosa è stato fatto un esperimento in vivo su un campione selezionato di topi maschi che ha confermato le nostre ipotesi. Una diminuzione dell'espressione di ATP1A1 si ritiene diminuisca il riassorbimento di sodio nel rene e di conseguenza dovrebbe diminuire il rischio sodio-associato per l'ipertensione e per la rigidità endoteliale. E' ora da chiarire il ruolo di questo gene nella popolazione generale.

Il manoscritto su questo lavoro, di cui sono coautrice, dal titolo *A Functional 12T-Insertion Polymorphism in the ATP1A1 Promoter Confers*

Decreased Susceptibility to Hypertension in a Male Sardinian Population è stato sottomesso ad un giornale internazionale ad alto fattore di impatto.

4) I beta bloccanti, che hanno un'azione primaria sulla frequenza cardiaca, sono farmaci largamente usati nei pazienti ipertesi ed anche questi, come i diuretici, forniscono una significativa protezione dal danno cardiovascolare, cerebrale e renale associato alla malattia. Nello studio che stiamo attualmente conducendo ci stiamo dedicando alla ricerca dei markers genetici della risposta pressoria all'atenololo.

Abbiamo arruolato 403 pazienti ipertesi, mai trattati, di origine sarda. Il DNA è stato genotipizzato utilizzando l'Illumina HumanOmniExpress BeadChip contenente 700.000 SNPs. L'imputazione sarà eseguita utilizzando Minimac con 1000 Genomes haplotypes come reference (release March 2012).

Il principale obiettivo sarà esaminare l'associazione delle caratteristiche genotipiche con la risposta pressoria sistolica dopo 4 settimane di trattamento con atenololo. E' prevista anche una validazione in coorti di replica indipendenti.

5) lo studio SOPHIA - farmacogenomica del losartan – aveva lo scopo di identificare, attraverso l'individuazione di SNPs, i geni che controllano la risposta pressoria al losartan usando un approccio genome-wide. Tale studio è oggetto della tesi di Dottorato. Relativamente a questo lavoro sono stati pubblicati due manoscritti dei quali sono coautrice: il primo su Hypertension nel 2013 dal titolo *Genomic association analysis identifies multiple loci influencing antihypertensive response to an angiotensin II receptor blocker* (Hypertension. 2013 Jan;61(1)) ed il secondo su Pharmacogenomics nel novembre 2014 dal titolo *Genome-Wide Association Study identifies CAMKID variants involved in Blood Pressure response to losartan: the SOPHIA study* (Pharmacogenomics. 2014 Sep;15(13):1643-1652).

6) Attualmente sto prendendo parte allo sviluppo del protocollo scientifico che ha come obiettivo la definizione della "genetica della massa

cardiaca". Si è visto che solo il 28% circa dei pazienti affetti da Ipertensione arteriosa essenziale presentano massa cardiaca elevata. Questo fenotipo, dunque, sfavorevole nei confronti degli outcome cardio vascolari dei pazienti, è ovviamente almeno in parte determinato da "altro" rispetto al puro "effetto idraulico" della pressione nelle arterie. La raccolta dei dati è stata completata e si sta procedendo alla fase di elaborazione statistica.

7) Ho partecipato inoltre a studi sulla genetica di popolazione basati sulle caratteristiche genetiche della popolazione sarda al fine di documentarne le caratteristiche estremamente favorevoli alla conduzione di studi genetici relativi alle malattie complesse quali l'ipertensione arteriosa, la cardiopatía ischemica, il diabete mellito, etc. I lavori scientifici relativi a tali protocolli dei quali sono coautrice sono stati pubblicati su PLoS One con i seguenti titoli: *Sex-specific effects of NLRP6/AVR and ADM loci on susceptibility to Essential Hypertension in a Sardinian population* (PLoS One. 2013 Oct 11;8(10):e77562) e *Sardinians genetic background explained by Runs Of Homozygosity and genomic regions under positive selection* (PLoS One. 2014 Mar 20;9(3):e91237).

1. INTRODUZIONE

1.1 Farmacogenomica dell'Ipertensione

Per lungo tempo è stato ipotizzato che la variazione tra diversi individui nell'efficacia e negli effetti collaterali di un farmaco sia influenzata da fattori genetici[1]. Nel 1959 Friedrich Vogel ha coniato il termine "Farmacogenomica" appunto per descrivere un ambito scientifico e concettuale nel quale l'effetto dei farmaci così come dei loro effetti collaterali venisse valutato alla luce delle caratteristiche genetiche individuali. La farmacogenomica è stata dunque definita come lo studio del ruolo della genetica nella risposta ai farmaci, considerando che il corredo genetico di un individuo, fenotipicamente espresso nella struttura, nella configurazione e nella concentrazione delle sue proteine, possa alterare l'azione dei farmaci in molti modi.

Esiste una gran varietà di meccanismi che determinano la risposta alla terapia. I "meccanismi farmacocinetici" determinano il livello di farmaco nel sangue ed includono l'assorbimento del farmaco stesso, la sua distribuzione, la sua escrezione ed il suo metabolismo. I "meccanismi farmacodinamici" invece caratterizzano l'interazione del farmaco con il suo "bersaglio" e la conseguente cascata di reazioni a livello cellulare e sistemico. Qualunque variazione genetica che altera la struttura, la configurazione o la quantità di una qualunque delle proteine coinvolte in uno o più di questi meccanismi può contribuire alla variabilità nella risposta alla terapia.

Sono stati fatti molti studi, in questi ultimi 30 anni, sulla farmacogenomica dell'ipertensione arteriosa essenziale.

L'ipertensione arteriosa è una condizione clinica che colpisce il 25-30% della popolazione adulta dei paesi più sviluppati e costituisce un fattore di rischio per malattie cardiovascolari e renali.

E' una malattia complessa influenzata da fattori genetici, ambientali e di lifestyle che interagiscono fra loro[2]. A tutt'oggi ci sono ancora poche

conoscenze sulle componenti genetiche specifiche e sulle loro interazioni che contribuiscono al fenotipo finale.

Nonostante la disponibilità di un discreto numero di farmaci antipertensivi, inoltre, un controllo pressorio inadeguato è comune nei pazienti ipertesi ed è responsabile della gran parte delle malattie cardiovascolari nella popolazione[3]. Si è visto infatti che la monoterapia, vale a dire il trattamento della malattia del paziente con una sola molecola, normalizza la pressione (valori sisto-diastolici < 140/90 mmHg) in non più del 30-40% dei pazienti ipertesi[4] e non ci sono criteri per decidere "a priori"quale delle singole classi di farmaci funzionerà meglio nel singolo paziente[5], con l'unica eccezione di una risposta terapeutica percentualmente maggiore quando i beta-bloccanti vengono somministrati a pazienti con frequenza cardiaca a riposo nella "gamma alta della normalità".

Ci si può ragionevolmente aspettare che la variazione interindividuale nella risposta pressoria ai diversi farmaci sia, almeno in parte, geneticamente determinata.

Lo scopo della farmacogenomica è, dunque, quello di comprendere gli effetti della diversità genetica nella risposta alla terapia ed utilizzare questa informazione per evitare "fallimenti" ed eventi avversi nella somministrazione della terapia stessa.

Molte ricerche classiche di farmacogenomica sono iniziate da osservazioni "casuali" di un'inattesa risposta ad un determinato farmaco, nel senso di una risposta "esagerata" o di una completa mancanza di risposta.

Gli studi classici, basati sulla metodica cosiddetta "per geni candidati", hanno individuato singoli polimorfismi genetici di enzimi coinvolti nel metabolismo dei farmaci, che sono responsabili delle grandi differenze interindividuali nella risposta alla terapia antipertensiva.

La variazione genetica, infatti, è molto comune: si stima che circa 3.000.000 di polimorfismi a singolo nucleotide (SNPs) differiscano tra gli individui.

Un certo numero di polimorfismi nei recettori dei farmaci che regolano la pressione (per esempio i recettori adrenergici – ADRB) e le "vie funzionali" di risposta dei recettori stessi (G-protein beta3 subunit – GNB3, sistema renina-angiotensina-aldosterone – RAAS) si sono rivelati predittivi di risposta al trattamento con farmaci antipertensivi.

I farmaci maggiormente studiati sono stati gli inibitori dell'enzima convertente l'angiotensina (ACEi), i beta bloccanti (BB), i sartani che bloccano il recettore dell'angiotensina II (ARB) e i diuretici tiazidici.

1.2 Diuretici

Fin dalla loro introduzione i diuretici tiazidici sono stati fondamentali nella terapia antipertensiva e sono ancora raccomandati in molti pazienti come farmaco di prima scelta nel trattamento dell'ipertensione arteriosa essenziale (Chobanian e altri, 2003)[6]. Tradizionalmente si ritiene che i farmaci diuretici agiscano incrementando il volume delle urine attraverso la riduzione, più o meno marcata, del riassorbimento di sodio ed acqua in vari livelli del nefrone. I siti di azione dei diuretici variano asseconda della classe farmacologica: tubulo prossimale, ansa di Henle, tubulo contorto distale. Il trattamento con diuretici, indipendentemente dalla classe farmacologica, causa un'iniziale contrazione del volume plasmatico e un decremento dell'output cardiaco, ma, dopo circa un mese di trattamento, l'output cardiaco ritorna ai valori basali così come l'iniziale variazione del volume plasmatico. Si pensa che i diuretici riducano la sensibilità dei vasi sanguigni alle catecolamine riducendo quindi le resistenze vascolari periferiche[5]; in realtà il meccanismo per il quale questi farmaci abbassano la pressione nel lungo termine è ancora in larga parte sconosciuto. A

conferma di ciò, ricordiamo per esempio come la "furosemide", potente diuretico attivo sull'ansa di Henle, abbia un notevole effetto sul volume plasmatico ma nulli o trascurabili effetti sulla pressione arteriosa: ne fa conferma la raccomandazione del loro uso nello schema terapeutico dello "scompenso cardiaco cronico" condizione in larga misura caratterizzata da pressione arteriosa sistemica normale o bassa.

Dati i numerosi effetti fisiopatologici dei diuretici, numerosi geni possono essere verosimili "candidati" nel predire la risposta individuale a questa classe di farmaci. Si è studiata l'associazione di diversi polimorfismi genici con gli effetti clinici dei diuretici tiazidici - la classe di diuretici più usata nella terapia antiipertensiva e raccomandata anche in funzione del loro effetto protettivo nei confronti degli eventi cardiaci, cerebrali, renali, vascolari che caratterizzano i pazienti con ipertensione arteriosa essenziale - e nella maggior parte degli studi si è utilizzata l'idroclorotiazide (HCTZ).

Una delle prime varianti geniche esaminate per risposta alla terapia antipertensiva nei pazienti trattati con diuretici è stato il polimorfismo G460W dell'α–adducina (sostituzione del triptofano con una glicina in posizione 460). L'adducina è una proteina tetramerica che è parte integrante del citoscheletro: le sue variazioni conformazionali, derivanti da variazioni della composizione aminoacidica, determinano variazioni di funzione della NaK-ATPasi con conseguenti variazioni del turnover del sodio attraverso la membrana cellulare. L'adducina contrae anche rapporti di continuità con le proteine di adesione sulla superficie cellulare risultando così uno dei maggiori determinanti del "danno d'organo" che è la complicanza maggiore nei pazienti con ipertensione arteriosa essenziale[7.a].

L'allele 460W dell' α–adducina può essere considerato un gene candidato per l'ipertensione poiché incrementa il riassorbimento tubulare renale di sodio attraverso l'attivazione della pompa Na+, K+-ATPasi.

Si sono comparati pazienti ipertesi omozigoti per l'allele 460G wild-type con pazienti portatori dell'allele mutato in eterozigosi o in omozigosi e si è visto che la riduzione media della pressione dopo somministrazione di diuretico era più del doppio nei pazienti portatori di almeno un allele della variante Trp 460 rispetto agli omozigoti wild-type, poiché l'allele mutato è associato con una maggiore affinità per la pompa Na+-K+ ATPasi (Cusi et al, 1997)[7]. In uno studio seguente (Psaty et al, 2002)[8] l'allele mutato è stato anche associato ad un più basso rischio di infarto del miocardio e di ictus in chi utilizzava diuretici rispetto a chi faceva uso di altre terapie antiipertensive.

Questo polimorfismo dell'α–adducina potrebbe dunque essere utile per identificare i pazienti ipertesi "sodio-sensibili" maggiormente *responsive* alla terapia con diuretici. Va però detto che Turner et al (2003)[9] non hanno trovato alcuna interazione.

Risultati ancora più contrastanti sono stati trovati a carico del gene che codifica l'enzima di conversione dell'angiotensina I in angiorensina II nella variante ACE I/D (inserzione/delezione).

Il polimorfismo dell'ACE insertion/deletion (I/D) nell'introne 16 del gene codificante l'enzima convertente l'angiotensina (ACE) è stato investigato per il suo ruolo nella risposta pressoria ai diuretici (idroclorotiazide 25 mg). Nella studio condotto da Sciarrone et al nel 2003[10] è emersa una significativa associazione: i pazienti con il genotipo I/I hanno mostrato una riduzione pressoria media di circa 10 mmHg, mentre quelli con genotipo D/D di circa 3.8 mmHg. Frazier et al (2004)[11], invece, non hanno riportato alcuna associazione con l'idroclorotiazide, mentre Schwartz et al (1997)[12] avevano trovato una riduzione pressoria maggiore nelle femmine II e nei maschi DD.

Un altro polimorfismo che potrebbe influenzare l'effetto dei diuretici tiazidici è lo SNP 825 C/T (timina al posto di citosina in posizione 825) del gene che codifica per la subunità-β3 della "G-protein".

Le G-protein sono un sottogruppo di proteine appartenenti alla "superfamiglia" delle GTP-asi associate a diversi recettori presenti sulla membrana proteica e la cui funzione è quella di mediare la trasduzione del segnale attraverso la membrana cellulare. L'allele 825T della subunità-β3 della G-protein è stato messo in relazione con una RNA splice variant che risulta nella delezione dei nucleotidi 498-620 dell'esone 9 e in cambiamenti strutturali nella subunità β: i soggetti portatori dell'allele TT hanno mostrato un maggiore calo pressorio in risposta alla terapia (Turner et al, 2001)[13].

1.3 ACE-inibitori (ACEi)

Gli ACEi agiscono principalmente impedendo la conversione dell'angiotensina I in angiotensina II nel plasma e nei tessuti e impedendo la degradazione della bradichinina. Nell'organismo l'angiotensina II ha due compiti principali. Da un lato, è responsabile della sintesi dell'octapeptide (peptide composto da 8 aminoacidi) angiotensina II, che è un vasocostrittore, a partire da un suo precursore inattivo, il decapeptide angiotensina I mediante scissione dei due aminoacidi C-terminali; dall'altro, catalizza la degradazione del mediatore bradichinina in prodotti inattivi. La bradichinina stimola il fattore di rilassamento endoteliale dando vasodilatazione. L'inibizione dell'enzima di conversione dell'angiotensina ha come conseguenza una diminuzione della concentrazione dell'angiotensina II in corrispondenza dei recettori per l'angiotensina (AT1 e AT2). A ciò consegue in primo luogo la caduta del tono dei vasi sanguigni e la diminuzione della pressione arteriosa. Inoltre, la riduzione dei livelli di angiotensina II porta a una diminuzione della liberazione di aldosterone dalla corteccia surrenale e, quindi, influisce sul bilancio idrico.

E' stato esaminato l'effetto del polimorfismo ACE I/D sulla caduta pressoria in diversi studi con risultati contrastanti: alcuni studi hanno evidenziato una maggiore risposta alla terapia nei portatori dell'allele II (Haas et al, 1998[14]; O'Toole et al, 1998[15]).

Altri studi evidenziavano una caduta pressoria maggiore nei portatori dell'allele D (Stavroulakis et al, 2000[16]; Li et al, 2003[17]). In altri studi ancora non si è trovata alcuna differenza tra i portatori dei due diversi alleli (Mondorf et al, 1998[18]; Harrap et al ,2003[19]; Yu et al, 2003[20]).

Uno studio con ACE inibitore sul polimorfismo M235T (Hingorani et al, 1995[21]) dell'angiotensinogeno ha evidenziato una risposta maggiore nei portatori dell'allele T rispetto ai portatori dell'allele M; mentre in altri studi (Dudley et al, 1996[22]; Mondorf et al,1998[18]) non si è osservata alcuna differenza nella risposta alla terapia nei portatori dei due diversi alleli.

1.4 Beta-Bloccanti

I beta-bloccanti sono una classe di farmaci largamente raccomandati nel trattamento dell'ipertensione (Chobanian et al, 2003[6]) per la loro capacità di legarsi ai recettori β-adrenergici, bloccandoli. Il recettore β_1 è un recettore di tipo eccitatorio, importantissimo per l'attività cardiovascolare, è principalmente presente a livello cardiaco e renale: la sua stimolazione genera a livello cardiaco un effetto inotropo e cronotropo positivo mentre a livello renale stimola la secrezione di renina da parte delle cellule juxtaglomerulari.

Alcuni studi condotti con i beta-bloccanti hanno trovato effetti farmacogenetici significativi.

Due studi hanno riportato un'associazione tra il polimorfismo Arg389Gly del recettore adrenergico beta 1 (ADRB1) e la risposta al metoprololo: nel primo (Johnson et al, 2003[23]) i pazienti portatori del genotipo AA presentavano un maggiore abbassamento della pressione diastolica in risposta alla terapia; nel secondo studio (Liu et al, 2003[24]) i portatori del genotipo AA mostravano invece un maggiore abbassamento della sistolica.

Il nostro gruppo di ricerca (Filigheddu et al, 2004[25]) ha invece evidenziato una significativa associazione tra il polimorfismo C825T della subunità β3 della G-protein ed il trattamento con atenololo, ma solo nelle

femmine. Le portatrici del genotipo CC mostravano una maggiore caduta pressoria dopo trattamento rispetto alle eterozigoti e alle potatrici di TT.

In un altro studio abbiamo, invece, considerato gli aplotipi, cioè quei segmenti di DNA contenenti polimorfismi genici non andati incontro a ricombinazione e così legati fra loro da essere ereditati come una singola unità attraverso le generazioni (Daly M J, 2001[26]). Abbiamo valutato l'associazione degli aplotipi dei recettori adrenergici β1 e β2 e della subunità β3 della G-protein con l'ipertensione arteriosa e con la risposta alla terapia con beta bloccanti. In particolare abbiamo considerato gli SNPs dei recettori beta-adrenergici β1 (ADRB1) Ser49Gly e Arg389Gly; β2 (ADRB2) Cys19Arg, Gly16Arg e Gln27Glu e della subunità β3 della G-protein (GNB3) A3882C, G5249A e C825T. Non è emersa nessuna associazione degli aplotipi o dei singoli SNPs con l'ipertensione essenziale. Soltanto nelle femmine gli SNPs e gli aplotipi della subunità β3 della G-protein sono risultati associati con la risposta pressoria alla terapia ($p < 0.05$), confermando un'associazione sesso-specifica e senza evidenziare nessun sostanziale vantaggio dell'analisi degli aplotipi rispetto agli SNPs (Filigheddu et al[27], 2010).

1.5 Sartani – Bloccanti del recettore dell'angiotensina II (ARB)

Gli antagonisti del recettore dell'angiotensina II, conosciuti anche come bloccanti del recettore per l'angiotensina (ARB, dall'inglese *angiotensin receptor blockers*), antagonisti del recettore AT1 o sartani, sono un gruppo di farmaci che modulano il sistema renina-angiotensina.

Alcuni trials clinici[28.29.30] hanno messo in evidenza che, indipendentemente dal controllo sulla pressione arteriosa, questa categoria di farmaci ha sia effetti cerebro-protettivi sia effetti positivi sulla malattia renale in pazienti con diabete di tipo II e microalbuminuria[31] e sull'insufficienza cardiaca congestizia[32, 33].

La mancanza di risultati soddisfacenti con le indagini per "geni candidati" ha portato allo sviluppo di nuove ma ben collaudate tecnologie di "high throughput genotyping", analizzate con sofisticati modelli matematico-statistici.

E' evidente come fosse necessario cambiare completamente approccio indirizzandolo non più alla ricerca di un singolo gene, ma, tramite una genotipizzazione completa, all'osservazione del genoma nella sua interezza. Si è dunque scelto, per perseguire questo obiettivo, l'approccio basato sulla genotipizzazione totale del genoma (Whole Genome Genotyping – WGG). WGG fornisce una rappresentazione uniforme dei loci che consente l'accesso alla quasi totalità degli SNPs del genoma. Questa metodologia si propone di analizzare più di 1 milione di SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) cioè singole variazioni di basi a distanza di circa 2500-3000 paia di basi (bp) lungo tutto il genoma. In questo modo si rende identificabile qualunque variante genica (mutazione) possa insistere in un singolo gene o in una "area genomica" molto ristretta. Inoltre questa tecnologia, oltre che la genotipizzazione, permette una facile valutazione della Variazione del Numero di Copie (Copy Number Variation – CNV) e della Perdita dell'Eterozigosi (Loss Of Heterozygosity – LOH), meccanismi fondamentali nella genetica delle popolazioni e negli studi di associazione. Le CNV, il cui schema in tutto il genoma è stato recentemente descritto, sono definite come un segmento di DNA di 1kb o più che mostra un numero di copie differente rispetto al genoma di riferimento. Questi riarrangiamenti genomici possono trovarsi all'interno di regioni di interesse nella malattia che si sta valutando e possono alterare la regolazione genica: sono dunque probabilmente associate a condizioni trasmesse con carattere mendeliano, ma possono anche influenzare la suscettibilità a sviluppare patologie multifattoriali.

Le analisi genetiche statistiche vengono attuate su grossi file che integrano il genotipo con i dati sul fenotipo e le mappature genetiche tramite

programmi come PLINK, R e StataSE e il risultato dell'analisi può essere facilmente visualizzato con l'applicazione di semplici software già a disposizione della comunità scientifica (per es. Haploview).

Un esempio di studio condotto con un approccio genome-wide è stato lo studio SOPHIA[34] (Study Of Pharmacogenomics in Hypertensive Italian patients treated with the Angiotensin receptor blocker losartan).

2. SOPHIA STUDY

Lo studio SOPHIA[34] - farmacogenomica del losartan – è stato condotto in via collaborativa su base nazionale dal nostro gruppo di lavoro, che ha svolto anche la funzione di "gruppo coordinatore" dei 20 centri di ricerca che hanno partecipato alla raccolta dei campioni. Il losartan è un farmaco che agisce bloccando il recettore di tipo 1 dell'Angiotensina II.

Il protocollo di studio aveva lo scopo di identificare, attraverso l'individuazione di SNPs, i geni che controllano la risposta pressoria al losartan usando un approccio genome-wide.

Lo studio è stato approvato dal Comitato Etico dell'Università di Sassari e supportato dai Comitati Etici locali e tutti i pazienti hanno firmato un consenso informato alla partecipazione allo studio.

Tutte le procedure dello studio sono state eseguite in accordo con la dichiarazione di Helsinki e con le linee guida nazionali ed internazionali riguardanti il trattamento dell'ipertensione arteriosa.

3. MATERIALI E METODI

Sono stati arruolati 722 soggetti ipertesi con età compresa tra 18 e 59 anni, provenienti da tutta Italia, mai trattati farmacologicamente (n=616) o in wash-out terapeutico da almeno 6 mesi (n=106), che mostravano alla visita di screening (week -8) una pressione arteriosa sistolica (SBP) da 140 a 179 mmHg e diastolica (DBP) da 90 a 109 mmHg.

A ciascuna visita la pressione veniva misurata in posizione seduta dopo 5 minuti di riposo, per tre volte consecutive ad un intervallo di 1 minuto tra le letture, usando un misuratore elettronico certificato (OMRON 705IT).

Gli stessi range di pressione dovevano essere confermati dopo 4 settimane (week -4) e al termine del periodo di run-in (week 0).

Sono stati esclusi i pazienti che presentavano ipertensione severa/maligna o secondaria, malattia renale evidenziata da un livello di creatinina sierica > 2 mg/dl o epatica con attività alanina/aspartato amino transferasi superiore al doppio del limite superiore comparato ai valori normali, trapianto di rene o con un solo rene funzionante, rischio cardiovascolare ≥ 20% (secondo il Framingham risk score), storia di aritmie cardiache, scompenso di cuore, malattia cardiaca ischemica; malattie endocrine, respiratorie o immunitarie clinicamente evidenti, disturbi metabolici, gravidanza o allattamento, uso di farmaci contraccettivi, storia di angioedema, disturbi elettrolitici, dipendenza da droghe o alcool, disordini mentali.

Durante il periodo di run-in i pazienti seguivano un programma dietetico che forniva 100-140 mEq di sodio e 50-70 mEq di potassio al giorno per minimizzare le differenze di lifestyle, poiché è ormai assodato che questi due elementi influenzano i fenotipi intermedi come l'attività reninica plasmatica (PRA) e l'aldosterone plasmatico.

Al termine di un periodo di osservazione di 8 settimane, in base ai criteri di inclusione ed esclusione, sono stati arruolati 539 pazienti ai quali sono stati

prescritti 50 mg/day di losartan per 4 settimane; i restanti 183 pazienti si sono normalizzati durante le 8 settimane di run-in.

Durante le 4 settimane di trattamento con losartan, 21 pazienti hanno lasciato lo studio per scarsa compliance e 24 per effetti collaterali (n=15 per tosse e n=9 per disfunzione sessuale), lasciando così 494 pazienti per la genotipizzazione e la successiva analisi.

A digiuno, al tempo 0, sono stati raccolti campioni di sangue per l'estrazione del DNA e per il dosaggio della PRA e dell'aldosterone, dell'insulina e del glucosio, e del peptide natriuretico cerebrale (BNP).

Sono stati misurati il siero e il potassio sierici e sono state raccolte le urine delle 24 ore alla week -8 e alla week 0 per determinare il sodio e il potassio urinario e la microalbuminuria.

Sono stati misurati anche i parametri di laboratorio per confermare la diagnosi di ipertensione essenziale[6,35].

Al termine dello studio abbiamo comparato i risultati della farmacogenomica del losartan a quelli di uno studio sulla farmacogenomica dell'idroclorotiazide (HCTZ) condotto su 558 pazienti.

Lo studio HCTZ è formalmente identico allo studio SOPHIA, eccetto che per l'uso di idroclorotiazide come farmaco. Nei Centri di Sassari e di Milano sono stati reclutati pazienti ipertesi dal 1997, secondo il protocollo del Gruppo di Studio di Farmacogenomica della Società Italiana di Ipertensione[36,37]. Il protocollo HCTZ è stato approvato dai comitati Etici di entrambi i Centri. Pazienti con ipertensione media-moderata, mai trattati, sono stati scrinati dopo aver firmato il consenso informato.

Il campione finale HCTZ era formato da 399 pazienti di Sassari e 159 di Milano[38].

La Figura 1 mostra l'intero patients flow dalla settimana -8 (inizio dello screening) alla settimana +4 (fine dello studio) e gli steps del quality control pre-analisi per le due coorti: SOPHIA e HCTZ.

Per la replicazione dell'associazione, abbiamo successivamente testato gli SNPs con il miglior p-value in due campioni indipendenti di ipertesi di origine europea provenienti dagli studi GERA2[39] e GENRES[40].

Per quanto riguarda la coorte dello studio Genetic Epidemiology of Responses to Antihypertensives (GERA2) i dati e i campioni sono stati raccolti tra il 1997 e il 2007. L'ARB era il candesartan ed è stato somministrato a 300 pazienti bianchi con ipertensione primaria non complicata, stadio 1-2, di età compresa tra i 30 e i 59.9 anni (Rochester MN), in wash-out terapeutico da almeno 4 settimane. Se una pressione arteriosa diastolica ≥ 90 mmHg era raggiunta in modo stabile, ai pazienti venivano somministrati 16 mg al giorno di candesartan per due settimane, seguiti da 32 mg al giorno per ulteriori 4 settimane. Come fenotipo è stato considerato il delta pressorio (BP registrata alla fine del trattamento meno BP registrata al termine del periodo di run-in).

I dati e i campioni dello studio GENRES sono stati raccolti tra il 1999 e il 2004. Lo studio era in doppio-cieco, controllato con placebo, randomizzato e cross-over con 4 settimane di monoterapie con 4 farmaci antiipertensivi (losartan, bisoprololo, amlodipina e idroclorotiazide). 313 uomini finlandesi moderatamente ipertesi, di età compresa tra i 35 e 60 anni sono stati arruolati. I criteri di inclusione erano pressione arteriosa diastolica ≥ 95 mmHg in misurazioni ripetute o l'uso di farmaci antipertensivi. Ciascun paziente ha ricevuto 50 mg di losartan, 5 mg di bisoprololo, 25 mg di idroclorotiazide e 5 mg di amlodipina al giorno, ciascuno in monoterapia, in ordine random per 4 settimane. Le pressioni arteriose ambulatoriali e delle 24 ore sono state registrate al termine di ciascun periodo di trattamento. Le misurazioni ambulatoriali sono state eseguite per tre volte consecutive, con intervalli di 1 minuto, dopo 30 minuti di riposo in posizione seduta, usando un apparecchio oscillometrico semi-automatico. Per le analisi è stata utilizzata la media delle ultime due misurazioni. Le misurazioni delle pressioni ambulatoriali erano disponibili per 216 soggetti durante la terapia con losartan. Per questa coorte di

replica sono stati utilizzati i dati delle pressioni ambulatoriali per uniformità con i dati di SOPHIA.

3.1 Genotipizzazione ed Imputazione

Il DNA è stato estratto da sangue periferico con procedure standard.

I campioni SOPHIA ed HCTZ sono stati genotipizzati utilizzando l'Illumina Human1M-Duo array (Illumina Inc, San Diego, CA, USA) nell'ambito del Progetto Hypergenes[41] o l'Illumina HumanOmniExpress array nell'ambito del progetto InterOmics (http://www.interomics.eu/).

La totalità dei dati grezzi è stata analizzata con l'Illumina Software Genome Studio per chiamata genomica, usando l'Illumina reference cluster file. La soglia di call rate per il DNA è stata fissata a 0.95 e i DNA con un call rate ≤ 0.95 sono stati esclusi dal data set finale. Per ciascun DNA, i dati ricavati dal cromosoma X sono stati usati per controllare l'eventuale discordanza con il sesso dichiarato.

L'imputazione genome-wide è stata eseguita con MACH[42], usando come referenza l'HapMap CEU haplotypes (release 22). Nel data set sono stati inclusi gli SNPs con call rate > 99% e minor frequenza allelica (MAF) >1%. Gli SNPs imputati con bassa qualità (Rsq<0.3 o MAF <3%) non sono stati usati nell'analisi di associazione.

Abbiamo anche imputato la regione vicina al gene CAMK1D utilizzando MACH con 1000 Genomes haplotypes (release Marzo 2012) come referenza, per arricchire ulteriormente questo locus con un più alto numero di genotipi.

3.2 Analisi statistica

Il fenotipo che costituiva l'endpoint primario era il cambiamento della pressione sistolica dopo 4 settimane di trattamento (ΔSBP4) con losartan, che è la differenza tra la pressione arteriosa sistolica (SBP) alla fine del trattamento e la SBP al termine del periodo di run-in, ossia il giorno precedente la prima somministrazione del farmaco.

Tutte le analisi per il controllo di qualità (QC) sono state eseguite in accordo con il protocollo proposto da Anderson et al[43].

Nell'ambito dello studio SOPHIA 494 pazienti sono stati genotipizzati. Dopo il controllo di qualità 39 campioni che avevano un call rate < 0.95 sono stati esclusi, così come 16 soggetti con sex mismatch (differenza tra il genere riportato nei dati clinici e quello stimato con i sex SNPs genotipizzati).

Utilizzando genome-wide IBD estimation program (PLINK version 1.7[44]) sono stati identificati ed esclusi dall'analisi 6 duplicati e 18 soggetti imparentati (10 componenti della medesima famiglia, 5 fratelli/sorelle e 3 parenti di secondo grado).

La stratificazione della popolazione è stata valutata attraverso l'analisi per componenti principali (PCA) utilizzando 1M SNPs e il pacchetto EIGENSOFT (versione 3.0)[45,46]. Sono stati rimossi 19 outliers, definiti come gli individui che eccedono di 6 deviazioni standard dalla media dell'intero campione per ciascuna delle componenti principali.

I risultati delle prime due PC sono descritti in Figura 2. Il plot mostra chiaramente i soggetti che si raggruppano in base alla loro origine geografica. Per ciascun trattamento farmacologico i campioni sono rappresentati come macro-gruppi (Italia continentale e Sardegna).

Sono state selezionate le prime 10 PC per includerle come covariate nel modello di regressione lineare.

Un individuo è stato filtrato per una proporzione ridotta di genotipi eterozigoti e 23 per dati fenotipici incompleti.

Dopo controllo di qualità, dunque, il campione finale era costituito da 372 soggetti: 280 maschi e 92 femmine.

Gli SNPs con una MAF < 3% e con un call rate < 99% sono stati eliminati, lasciando 1.705.664 SNPs per l'analisi.

Dopo i test di associazione, i cluster plots di tutti gli SNPs genotipizzati, associati con una $P \leq 10^{-5}$, sono stati esaminati manualmente per controllare l'accuratezza del lavoro di genotipizzazione.

Per valutare l'associazione tra il genotipo e il fenotipo abbiamo eseguito una regressione lineare sul ΔSBP4 sotto modello additivo con aggiustamento per sesso, età, SBP basale e per componenti principali genetiche, come implementato in PLINK.

I best findings della risposta pressoria sistolica al losartan ($P \leq 10^{-5}$) sono stati testati per l'associazione con la risposta pressoria diastolica (ΔDBP4), eseguendo un'analisi di regressione lineare sotto un modello additivo usando sesso, età, SBP basale e le componenti principali genetiche come covariate.

Per verificare che i markers identificati fossero specifici per il losartan, abbiamo valutato il loro ruolo predittivo sul ΔSBP4 usando un campione indipendente di 558 pazienti ipertesi naïve trattati con 25 mg di HCTZ al giorno per 4 settimane.

Abbiamo eseguito un'analisi di regressione lineare sotto un modello additivo usando sesso, età, SBP basale e le componenti principali genetiche come covariate.

Le analisi di interazione SNPxTrattamento sono state condotte sotto un modello genetico additivo utilizzando l'analisi quantitativa trait interaction (GxE) come implementato in PLINK. Le analisi sui ΔSBP4 residui sono state aggiustate per sesso, età, SBP basale e PCs.

Per replicare i nostri risultati abbiamo testato l'associazione in due campioni indipendenti di ipertesi di origine europea provenienti dagli studi GERA2 e GENRES.

4. RISULTATI

La tabella 1 riporta le caratteristiche del campione studiato, composto da 372 pazienti.

I partecipanti dello studio SOPHIA erano bianchi caucasici, provenienti dall'Italia continentale e dalla Sardegna, il 24.7% erano donne (n=92). L'età media era di 45.7 anni (SD±7.4), la pressione sistolica media (SBP) era di 148.9 mmHg (SD±7.1), quella diastolica media (DBP) di 96.5 mmHg (SD±3.7).

Dopo controllo di qualità, dunque, dei 494 campioni genotipizzati, erano disponibili per l'analisi 372 individui e 1.705.664 SNPs.

Un'analisi per tratto quantitativo, con ΔSBP4 (aggiustato per PCs genetiche, sesso età e SBP basale) come variabile dipendente (Figure 3 e 4), ha identificato uno SNP (rs10752271) che ha raggiunto la soglia di significatività genome-wide. Inoltre, il q-q plot ha mostrato alcuni SNPs con $P \leq 10^{-5}$ che deviavano al di sopra della diagonale (che è la linea di riferimento della distribuzione). Il numero di SNPs con $P \leq 10^{-5}$ era 130 (Tabella 2, Figura 4).

In particolare, un cluster di quattro SNPs (rs10752271, rs10906202, rs4747995 e rs10737061), che mappano nel gene (size=480kb) della proteina chinasi ID calcio/calmodulina-dipendente (CAMK1D) era associato in modo altamente significativo con il ΔSBP4 (Tabella 2). Precisamente, lo SNP imputato rs10752271 nell'introne 2 ha raggiunto la soglia di Bonferroni ($P=1.2x10^{-8}$), con un effect size di -5.5±0.94 mmHg (G risk allele frequency = 0.10, Figura 5). Rs10906202, imputato, e rs4747995, genotipizzato, nell'introne 3, sono in linkage disequilibrium (LD) con rs10752271, mentre l'rs10737061 genotipizzato non è in LD con rs 10752271, pur mappando approssimativamente 600 bp a monte. Tutti questi SNPs hanno mostrato un p value ed un effect size solo leggermente più basso (Tabella 2).

Data la sua associazione altamente significativa con il ΔSBP4, ci siamo concentrati su CAMK1D. Abbiamo finemente mappato la regione del gene mediante imputazione con 1000 Genome haplotypes e abbiamo testato gli ulteriori genotipi per associazione con la risposta al losartan. Abbiamo identificato un altro polimorfismo, rs10737062, non in LD con rs10752271, nell'introne 3, associato con ΔSBP4 con un effect size di -5.54±0.96, $P=1.8x10^{-8}$ (G risk allele frequency = 0.11, Figura 5). Questo SNP non era presente nel reference panel di HapMap utilizzato nella precedente imputazione.

Rs10752271 era anche associato al cambiamento individuale nella pressione arteriosa diastolica dopo 4 settimane di trattamento attivo, ΔDBP4, ($P=2x10^{-5}$; effect size = -3.5±0.71). Risultati simili sono stati osservati per gli altri SNPs in CAMK1D (Tabella 3).

Tra i 131 SNPs con un $P \leq 10^{-5}$ associati al ΔSBP4, 121 erano anche associati al ΔDBP4 (Tabella 3).

Per confermare la specificità di questi markers per il losartan, abbiamo testato la loro associazione con il ΔSBP4 in pazienti trattati con idroclorotiazide (HCTZ).

La Tabella 1 riporta le caratteristiche del campione HCTZ. All'interno della coorte HCTZ abbiamo analizzato 558 ipertesi (28.1% donne). Tutti i partecipanti erano bianchi caucasici provenienti dall'Italia continentale e dalla Sardegna. I campioni della coorte losartan e quelli HCTZ erano simili per BMI e sodio urinario. Il potassio urinario, invece, era significativamente più alto nei pazienti trattati con losartan; la pressione basale era più alta nella coorte HCTZ, mentre l'età era più bassa in quella losartan.

Tra i 131 best SNPs per losartan, soltanto 10 erano marginalmente associati con la risposta pressoria ad HCTZ (Tabella 4). In particolare rs10752271e rs10737062 non mostravano una associazione significativa con la risposta pressoria ad HCTZ (P=0.15, effect size = -1.6±1.1 e P=0.48, effect size

= -0.8±1.1 rispettivamente) (Figura 6, Tabella 4). Abbiamo inoltre confermato la specificità della risposta pressoria al losartan eseguendo un'analisi di interazione SNP x treatment che è risultata significativa per entrambi gli SNPs (rs10752271 P=0.01 e rs10737062 P=0.005) (Figura 6).

4.1 Replicazione dei risultati in coorti indipendenti

Abbiamo testato per la replicazione lo SNP rs10752271 in due campioni indipendenti di ipertesi provenienti dagli studi GERA2[39] e GENRES[40]. GERA2 aveva studiato l'effetto del candesartan su 198 pazienti utilizzando un modello additivo di regressione lineare aggiustato per età e sesso; GENRES studiava l'effetto del losartan su 216 maschi utilizzando un modello simile di regressione lineare ovviamente omettendo il sesso come covariata. In GERA2, rs10752271 non era associato alla risposta pressoria al candesartan (P=0.9, effect size = -0.3±2.55), mentre in GENRES l'associazione era confermata con un effect size simile (P=0.04, effect size = -5.3±2.5) (Tabella 5, Figura 7).

I genotipi per rs10737062 non erano disponibili per la replica in nessuno dei due studi poiché l'imputazione è stata eseguita con HapMap come referenza.

5. DISCUSSIONE

Lo studio SOPHIA è una valutazione farmacogenomica genome-wide della risposta pressoria al losartan.

Abbiamo identificato 131 SNPs con $P \leq 10^{-5}$ usando un'analisi di regressione lineare con ΔSBP4 come variabile dipendente. Inoltre 121 di questi 131 SNPs sono anche associati con ΔDBP4. La specificità degli SNPs è stata verificata utilizzando un campione indipendente trattato con HCTZ.

Il top hit rs10752271 nel gene CAMK1D mostra un effect size di – 5.5±0.94 e una $P = 1.2 \times 10^{-8}$. Questo risultato è supportato da un cluster di SNPs in debole LD gli uni con gli altri (Figura 5).

La replica *in silico* nello studio GENRES[40], in cui è stato utilizzato losartan come ARB, ha confermato l'associazione di rs10752271 con un effect size simile dell'allele di rischio G (Figura 7).

CAMK1D codifica per una proteina chinasi 1D (CaMK-I) Calcio/Calmodulina dipendente. CaMK-I è espresso nella nella zona glomerulare della corteccia surrenale dove l'angiotensina II e il potassio determinano un aumento del calcio nel citosol che, a sua volta, attiva CaMK-I. Questa a sua volta aumenta la trascrizione del gene CYP11B2 e la produzione di aldosterone attraverso la modulazione dell'attività dei fattori target di trascrizione, come NURR1, ATF1, ATF2 e CREB[47].

L'importanza del calcio nel determinare la secrezione acuta e cronica dell'aldosterone nella zona glomerulosa della corteccia surrenale, che agisce largamente attraverso l'attivazione di CaMK, è stata consistentemente dimostrata[48,49].

CaMK-I può anche regolare la trascrizione del gene attraverso la fosforilazione di vari substrati[50].

E' interessante notare che l'incremento del calcio intracellulare nella zona glomerulosa della corteccia surrenale è stato mostrato recentemente essere

un pathway usuale nell'attivazione della trascrizione di CYP11B2 nell'iperaldosteronismo sporadico e familiare[51,52]. Il ruolo centrale dell'aumentata produzione di aldosterone nella patogenesi dell'ipertensione essenziale è stato evidenziato nel Framingham Offspring Study, dove i livelli di aldosterone erano direttamente associati con un incremento della pressione arteriosa e con lo sviluppo di ipertensione, indipendentemente dall'assunzione di sodio e di altri potenziali fattori confondenti[53].

Una caratteristica rilevante della coorte SOPHIA è che include ipertesi essenziali mai trattati reclutati di recente. E' stato eseguito un completo check up clinico, di laboratorio e strumentale per definire la diagnosi di "ipertensione essenziale" durante un periodo di run-in di 8 settimane con una dieta controllata: solo quei pazienti nei quali la pressione arteriosa rimaneva ≥140/90 mmHg alla fine di questo periodo sono stati inclusi nello studio. Questo dovrebbe minimizzare l'inclusione di "falsi ipertesi" nella coorte in studio. La condizione di "ipertesi mai trattati" è stata considerata tassativa: come già ben accertato anni fa[54], una sospensione del trattamento fino a 12 mesi dopo l'ultima assunzione potrebbe essere richiesta per riportare la pressione ai livelli pre-trattamento. Inoltre, gli effetti dei farmaci precedenti continuano ad agire a differenti livelli dell'organizzazione biologica, rendendo quindi discutibili i risultati di uno studio di farmacogenomica nel caso di una coorte composta da pazienti trattati in precedenza. Ritengo che queste considerazioni siano un punto chiave nel disegno e nella conduzione di uno studio di farmacogenomica: gli ipertesi mai trattati sono piuttosto difficili da trovare e sono stati necessari parecchi anni per assemblare la nostra coorte. Tutto ciò è stato espresso in dettaglio in altri lavori[55].

Per la replica abbiamo utilizzato gli studi GERA2 e GENRES, che hanno applicato differenti criteri di inclusione per il reclutamento dei pazienti riguardo al periodo di run-in, alla pressione basale e al trattamento antipertensivo

precedente. Nonostante queste differenze, abbiamo potuto replicare l'effect size del nostro miglior risultato in GENRES.

Precedenti studi hanno utilizzato una strategia "per geni candidati" per identificare gli SNPs che predicono la risposta pressoria ai bloccanti del recettore per l'angiotensina II (ARBs). Sono stati ottenuti risultati contrastanti per il polimorfismo inserzione/delezione (I/D) nel gene dell'ACE (enzima convertente l'angiotensina). Alcuni studi hanno trovato l'allele I associato ad una maggiore diminuzione della pressione[56], altri non sono stati in grado di confermare questo risultato[57,58].

Pazienti ipertesi essenziali che portano l'allele C del polimorfismo -344 T/C nel gene dell'Aldosterone Sintasi (CYP11B2) sono risultati rispondere agli ARB con un maggiore abbassamento pressorio[59]: ciò, però, non è stato confermato nel presente studio (P= 0.67).

Lo studio GENRES ha valutato l'impatto sulla risposta pressoria ambulatoriale al losartan e agli altri farmaci antiipertensivi di 19 loci identificati in precedenti studi GWA nell'ipertensione essenziale. Uno SNP intronico in STK39 (rs6749447) è stato trovato associato con la risposta pressoria al losartan durante il monitoraggio nelle 24 ore (24h ABP) (P=0.0005/0.0002 per SBP e DBP rispettivamente)[60]. Noi non abbiamo confermato questo SNP (p=0.86) e non abbiamo trovato altri SNPs associati in STK39.

In uno studio GWA, dove i good responders al candesartan sono stati comparati ai poor responders, Turner *et al*[39] hanno descritto rs11649420, nella subunità gamma del gene del canale del sodio amiloride-sensibile (SCNN1G), come fortemente associato alla risposta al farmaco. La probabilità di una buona risposta pressoria al candesartan per il genotipo GG del polimorfismo rs11649420 era tre volte maggiore del genotipo combinato AA+AG, e la probabilità di una buona risposta pressoria all'HCTZ era due volte inferiore rispetto al gruppo AA+GG.

Noi non abbiamo potuto validare questo risultato né confrontando good e poor responders[61] né con un'analisi di regressione lineare con ΔSBP come variabile dipendente. Non abbiamo trovato nessun altro SNP associato in SCNN1G.

Recentemente, uno studio GWA su una coorte giapponese, condotto con un disegno simile a quello utilizzato nello studio GENRES, ha evidenziato un'associazione marginale con ABCC9 (canale del potassio ATP-sensibile)[62]. Noi non abbiamo replicato questi risultati.

Come già scritto in una lettera pubblicata su Hypertension[61], riguardante la mancata replica da parte del nostro gruppo dei risultati di Turner, ritengo fondamentale negli studi di farmacogenomica porre grande attenzione alle metodiche di reclutamento delle coorti di studio e alle tecniche di genotipizzazione e di elaborazione statistica utilizzate. E' necessario, inoltre, creare grandi consorzi che condividano i disegni dei diversi studi per poter ottenere solidi risultati riproducibili.

6. CONCLUSIONI

Utilizzando un approccio genome-wide, nel contesto dello studio SOPHIA, abbiamo identificato il gene CAMK1D come un nuovo locus associato con la risposta pressoria al losartan (rs10752271): questo dato è stato confermato nella coorte dello studio GENRES. A causa della sua specifica associazione con losartan, questo locus potrebbe rappresentare un nuovo strumento per una caratterizzazione genetica della risposta ad un trattamento antiipertensivo da parte di pazienti ipertesi .

Il nostro studio presenta alcuni limiti. Innanzitutto, siamo consapevoli del limitato numero di SNPs a livello GWA, probabilmente dovuto alla dimensione del campione relativamente contenuta, non comparabile a più potenti studi GWA, tuttavia in linea con altri studi di farmacogenomica. Inoltre abbiamo identificato rs10752271 come SNP associato alla risposta pressoria al losartan in due popolazioni caucasiche: sono però necessarie ulteriori verifiche in gruppi etnici differenti.

Prospettive future

C'è una grande variabilità nella risposta ai farmaci antipertensivi e i dati disponibili per la scelta del trattamento sono limitati. Il nostro studio ha identificato un nuovo marker genetico verosimilmente associato al trattamento con losartan. Questo risultato richiede ulteriori indagini per chiarire il meccanismo attraverso il quale il gene identificato influenza la risposta pressoria al losartan. L'applicabilità nella pratica clinica è vincolata alla sua conferma in altre coorti di pazienti con ipertensione arteriosa essenziale ed alla completa descrizione della sua mappa funzionale attraverso la quale migliorare le nostre conoscenze sia nell'ipertensione arteriosa sia nella farmacogenomica cardiovascolare.

NOTA: il lavoro scientifico oggetto di questa tesi è stato pubblicato sul giornale Pharmacogenomics nel novembre 2014 con il seguente titolo: *Genome-Wide Association Study identifies CAMKID variants involved in Blood Pressure response to losartan: the SOPHIA study* (Pharmacogenomics. 2014 Sep;15(13):1643-1652).

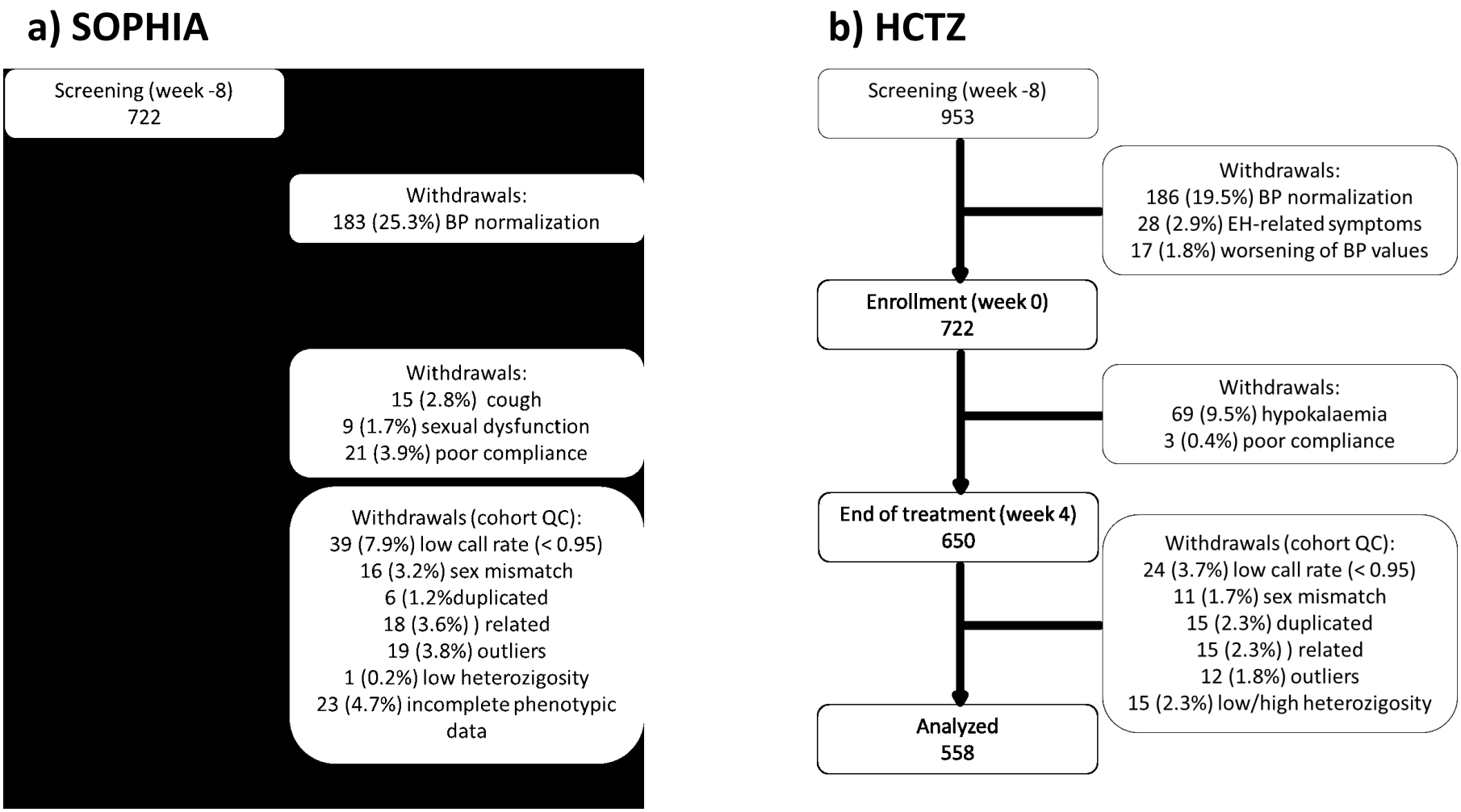

Figura 1: Diagramma di flusso dei partecipanti degli studi a) Sophia e b) HCTZ.
EH, ipertensione essenziale; BP pressione arteriosa; QC, controllo di qualità

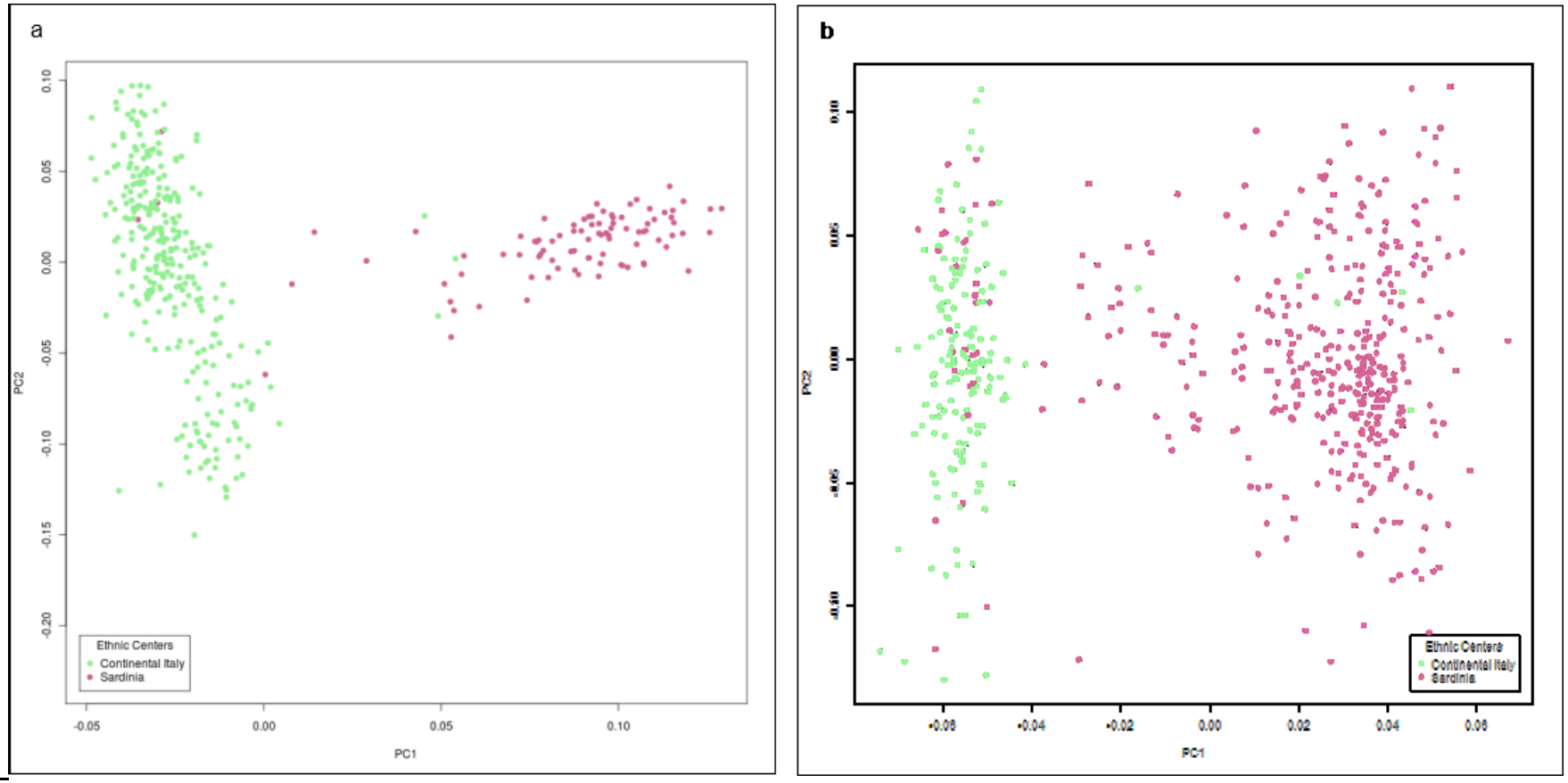

Figura 2. Plot delle componenti principali delle coorti a) SOPHIA e b) HCTZ.
Le coorti sono rappresentate come macro-gruppi: Italia continentale in verde e Sardegna in viola.

Tabella 1: Caratteristiche dei partecipanti per Trattamento

Characteristic	Losartan (n= 372)	HCTZ (n=558)	P value
Men/women	280/92	401/157	n.s
Age, y	45.7±7.4	48.3±8.8	<0.0001
BMI baseline, kg/m^2	26.9±2.9	27.2±3.8	n.s
Pretreatment SBP, mmHg	148.9±7.1	157.1±12.7	<0.0001
Pretreatment DBP, mmHg	96.5±3.7	102.3±7.7	<0.0001
ΔSBP, mmHg	-11.8±9.1	-14.6±13.1	0.0004
ΔDBP, mmHg	-8.8±6.2	-9.4±8.9	n.s
Serum potassium mmol/L	4.2±0.4	4.2±0.4	0.05
Urine sodium, mEq/24h	147.5±53.9	152.8±53.6	n.s
Urine potassium, mEq/24h	62.5±25.5	57.2±18.4	0.0003

La tabella mostra le caratteristiche dei gruppi per trattamento farmacologico (media±SD). BMI, indice di massa corporea; SBP, pressione arteriosa sistolica; DBP, pressione arteriosa diastolica; ΔSBP, differenza tra SBP alla fine del trattamento e SBP alla fine del periodo di run-in; ΔDBP differenza tra DBP alla fine del trattamento e DBP alla fine del periodo di run-in; p value della comparazione tra i due gruppi di trattamento. Le comparazioni tra i gruppi di medie e frequenze sono state eseguite con ANOVA o con il chi-quadro test, a seconda della necessità.

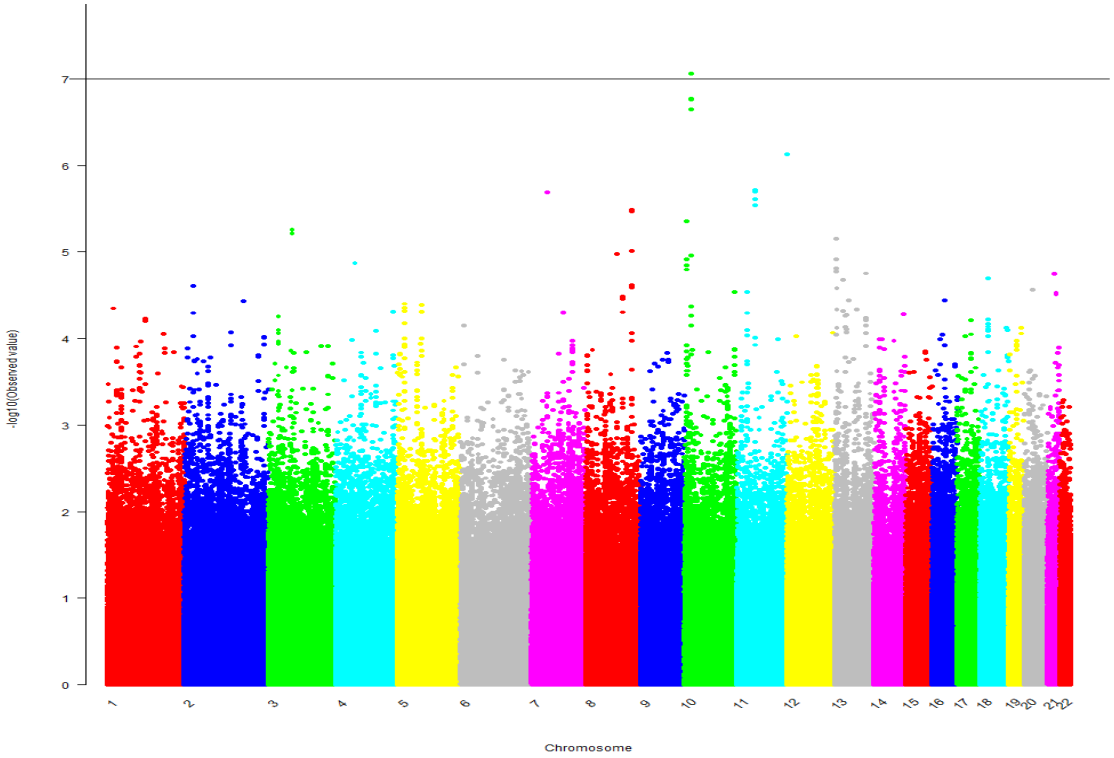

Figura 3. Manhattan plot del test statistico di regressione lineare per singolo SNP per ΔSBP4. L'analisi di regressione è stata aggiustata per sesso, età, pressione sistolica basale e componenti principali. I risultati sono riportati come –log10 (P value) per posizione genomica.

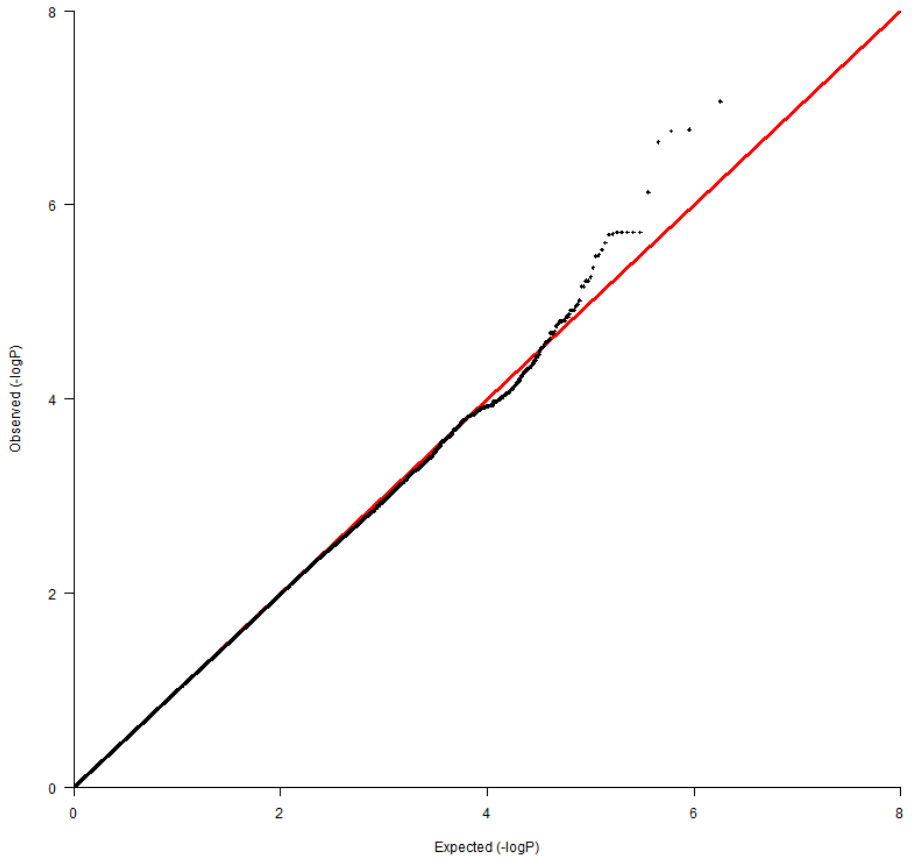

Figura 4. Quantile-quantile plot dei p-values dei polimorfismi a singolo nucleotide emersi dall'analisi di associazione genome wide della risposta pressoria sistolica (ΔSBP4) al losartan.

Tabella 2. Risultati dell'associazione genome-wide per la risposta pressoria sistolica al losartan associate agli SNPs con P value <10^{-4}. Tutti gli SNPs imputati hanno una qualità di imputazione (Rsq) >0.8. Per recuperare maggiori informazione sugli SNPs e sul loro contesto genomico (il gene più vicino) abbiamo usato l'hg18 (NCBI 36) assembly. P indica i p values di associazione; SE, errore standard; Chr, cromosoma; SNP, polimorfismo a singolo nucleotide; bp, paia di basi.

SNP	Chr	Position (bp)	Gene	Location	Risk Allele	Risk Allele Frequency	Beta	SE	P
rs10752271	10	12744197	CAMK1D	Intron	G	0.103	-5.5	0.9494	1.20E-08
rs10906202	10	12758742	CAMK1D	Intron	T	0.1022	-5.121	0.9595	1.68E-07
rs4747995	10	12751740	CAMK1D	Intron	T	0.1014	-5.145	0.9652	1.74E-07
rs10737061	10	12743504	CAMK1D	Intron	G	0.1384	-4.486	0.8495	2.25E-07
rs6590748	11	133927963	LOC283177	Flanking-3	A	0.03091	-8.243	1.635	7.41E-07
rs1996509	11	43627650	MIR129-2	Flanking-3	C	0.96631	-8.304	1.715	1.91E-06
rs10742684	11	43626579	MIR129-2	Flanking-3	T	0.96631	-8.304	1.715	1.91E-06
rs11823509	11	43624844	MIR129-2	Flanking-3	G	0.96631	-8.304	1.715	1.91E-06
rs10768969	11	43619682	MIR129-2	Flanking-3	T	0.96505	-8.138	1.681	1.92E-06
rs7940743	11	43621246	MIR129-2	Flanking-3	G	0.96505	-8.138	1.681	1.92E-06
rs11820704	11	43610540	MIR129-2	Flanking-3	C	0.96496	-8.138	1.684	2.00E-06
rs6979778	7	37334927	ELMO1	Intron	G	0.3176	-3.05	0.6315	2.03E-06
rs6485440	11	43643261	MIR129-2	Flanking-3	A	0.96371	-7.955	1.661	2.46E-06
rs7935875	11	43649694	MIR129-2	Flanking-3	G	0.97019	-8.712	1.832	2.90E-06
rs7835298	8	124621484	FBXO32	Intron	G	0.6425	-2.84	0.6007	3.27E-06
rs2280919	8	124620960	FBXO32	Intron	G	0.6398	-2.839	0.6015	3.39E-06
rs1872757	10	3835365	KLF6	Flanking-5	C	0.08468	-5.006	1.074	4.42E-06
rs9834596	3	65009461	MIR548AN	Flanking-3	G	0.1976	-3.783	0.8202	5.55E-06
rs7432993	3	65013579	MIR548AN	Flanking-3	C	0.1962	-3.779	0.8227	6.05E-06
rs11131000	3	65011849	MIR548AN	Flanking-3	C	0.1962	-3.779	0.8227	6.05E-06
rs11616254	13	23270375	MIPEP	Intron	A	0.8757	-4.302	0.9428	6.97E-06
rs17079355	13	23269526	MIPEP	Intron	T	0.8757	-4.302	0.9428	6.97E-06
rs9297664	8	123867665	ZHX2	Intron	G	0.93414	-5.559	1.238	9.68E-06
rs7824502	8	83108320			G	0.2849	-2.947	0.6594	1.05E-05
rs7094047	10	12782600	CAMK1D	Intron	G	0.1129	-4.258	0.9547	1.10E-05
rs17337271	13	23250220	MIPEP	Intron	G	0.8747	-4.172	0.9398	1.21E-05
rs5006151	10	3827766	KLF6	Flanking-5	T	0.08514	-4.86	1.095	1.22E-05
rs5006152	10	3827781	KLF6	Flanking-5	T	0.08514	-4.86	1.095	1.22E-05
rs5006153	10	3827807	KLF6	Flanking-5	G	0.08625	-4.787	1.087	1.42E-05
rs5006154	10	3827857	KLF6	Flanking-5	G	0.08625	-4.787	1.087	1.42E-05
rs17337965	13	23279149	MIPEP	Intron	T	0.875	-4.128	0.9421	1.55E-05
rs10507333	13	23267776	MIPEP	Intron	G	0.875	-4.128	0.9421	1.55E-05
rs1872756	10	3828216	KLF6	Flanking-5	T	0.08871	-4.624	1.057	1.60E-05
rs11592875	10	3831480	KLF6	Flanking-5	T	0.08871	-4.624	1.057	1.60E-05
rs11597036	10	3831337	KLF6	Flanking-5	A	0.08871	-4.624	1.057	1.60E-05
rs7995933	13	23295177	MIPEP	Intron	T	0.871	-4.071	0.9329	1.67E-05

rs17268170	13	94654287	ABCC4	Intron	T	0.08468	-4.921	1.131	1.77E-05
rs2833264	21	31376432	KRTAP19-8	Flanking-5	C	0.6492	-2.811	0.6463	1.78E-05
rs7236668	18	23270253			C	0.8199	-3.358	0.7772	2.02E-05
rs9566404	13	38635163			T	0.05914	-5.47	1.268	2.09E-05
rs4245391	13	38632410			T	0.05914	-5.47	1.268	2.09E-05
rs9548649	13	38639292			G	0.05914	-5.47	1.268	2.09E-05
rs1999543	13	38631834			T	0.05914	-5.47	1.268	2.09E-05
rs2294090	8	124614328	FBXO32	Intron	G	0.6237	-2.619	0.6119	2.41E-05
rs10204085	2	20518430	RHOB	Flanking-3	G	0.96774	-7.596	1.778	2.48E-05
rs9650083	8	123860964	ZHX2	Flanking-5	G	0.93548	-5.346	1.254	2.57E-05
rs13261590	8	123863165	ZHX2	5'-utr	C	0.93548	-5.346	1.254	2.57E-05
rs17339485	13	23332951	MIPEP	Intron	G	0.8743	-3.851	0.904	2.61E-05
rs2077520	20	17669518	BANF2	Flanking-3	G	0.2473	-2.988	0.7028	2.72E-05
rs6484016	11	24129346			G	0.721	-2.889	0.6815	2.87E-05
rs2766047	10	129011077	DOCK1	Intron	A	0.6024	-2.602	0.6143	2.90E-05
rs7008395	8	99560087	STK3	Intron	C	0.93145	-5.349	1.271	3.27E-05
rs16897031	8	99552567	STK3	Intron	G	0.9328	-5.366	1.28	3.50E-05
rs17227068	16	52606706	FTO	Intron	G	0.94489	-5.768	1.378	3.59E-05
rs17825519	16	52614254	FTO	Intron	T	0.94489	-5.768	1.378	3.59E-05
rs9536429	13	52958882			C	0.1909	-3.211	0.7676	3.62E-05
rs17539351	2	169474806	G6PC2	Flanking-3	T	0.07527	-4.688	1.122	3.70E-05
rs6889873	5	16409288	ZNF622	Flanking-3	C	0.7298	-2.882	0.6926	3.97E-05
rs7720712	5	68254626			T	0.1761	-3.303	0.7947	4.05E-05
rs13436110	5	68253745			G	0.1761	-3.303	0.7947	4.05E-05
rs7906212	10	12686538	CAMK1D	Intron	T	0.08266	-4.277	1.032	4.28E-05
rs16868493	5	16413635	ZNF622	Flanking-3	T	0.7358	-2.893	0.6996	4.43E-05
rs12410065	1	18652133	IGSF21	Flanking-3	T	0.04839	-6.16	1.491	4.48E-05
rs17089328	13	71873252			A	0.875	-3.787	0.9182	4.62E-05
rs11551114	13	23334475	MIPEP	Coding	G	0.879	-3.868	0.9381	4.65E-05
rs2151455	13	38641112			C	0.05795	-5.26	1.277	4.76E-05
rs12521138	5	16398675			T	0.7325	-2.853	0.6936	4.85E-05
rs6888082	5	68250572			T	0.1761	-3.235	0.7868	4.88E-05
rs2119684	4	180272013			A	0.8078	-3.3	0.8028	4.90E-05
rs11986338	8	99522380	KCNS2	Flanking-3	C	0.93011	-5.1	1.242	4.95E-05
rs12538853	7	91011516			C	0.90591	-4.285	1.044	5.00E-05
rs2403900	11	24119117			A	0.6895	-2.687	0.6549	5.06E-05
rs731172	2	20532053	RHOB	Flanking-3	C	0.9664	-7.191	1.753	5.06E-05
rs234597	14	96150975	PAPOLA	Flanking-3	C	0.2298	-2.983	0.7283	5.20E-05
rs12430353	13	47118513			G	0.2932	-2.905	0.7098	5.28E-05
rs10906210	10	12781750	CAMK1D	Intron	A	0.1492	-3.584	0.8773	5.44E-05
rs10492660	13	42387323	EPSTI1	Intron	T	0.5605	-2.525	0.6181	5.45E-05
rs2596625	3	24183978	THRB	Intron	T	0.8589	-3.56	0.8725	5.55E-05
rs1564351	13	94635723	ABCC4	Intron	G	0.08602	-4.588	1.127	5.79E-05

rs10857825	1	110845750	CYMP	Flanking-3	T	0.03226	-7.114	1.749	5.85E-05
rs12959715	18	23272335			C	0.3095	-2.691	0.6625	6.01E-05
rs17189390	13	94642127	ABCC4	Intron	T	0.08468	-4.605	1.135	6.11E-05
rs806943	17	48713797			A	0.03629	-6.837	1.686	6.15E-05
rs12239305	1	110847851	CYMP	Flanking-3	T	0.03235	-7.08	1.748	6.27E-05
rs12517749	5	16363026			C	0.7284	-2.785	0.6897	6.61E-05
rs3849093	5	16379795			A	0.7284	-2.785	0.6897	6.61E-05
rs1467231	18	23280181			G	0.3113	-2.666	0.6611	6.76E-05
rs1467232	18	23281214			C	0.3113	-2.666	0.6611	6.76E-05
rs1467233	18	23281358			T	0.3113	-2.666	0.6611	6.76E-05
rs11755624	6	6753761			C	0.94355	-4.956	1.232	7.02E-05
rs17268129	13	94642858	ABCC4	Intron	T	0.08602	-4.538	1.129	7.09E-05
rs10906199	10	12747804	CAMK1D	Intron	C	0.2191	-2.851	0.7093	7.12E-05
rs7229677	18	23280888			C	0.3091	-2.667	0.6645	7.29E-05
rs9594831	13	42386448	EPSTI1	Intron	G	0.4234	-2.482	0.6185	7.31E-05
rs2702592	18	69790381			T	0.1667	-3.297	0.8225	7.45E-05
rs17339599	13	23335812	MIPEP	Intron	C	0.8723	-3.562	0.8887	7.45E-05
rs2287688	19	52471101	PRR24	Flanking-3	T	0.6626	-2.581	0.6447	7.58E-05
rs4804036	19	52459483	CCDC9	Intron	G	0.6626	-2.581	0.6447	7.58E-05
rs12955575	18	23281629			A	0.3118	-2.641	0.6611	7.84E-05
rs11619568	13	47103343			G	0.2917	-2.843	0.7118	7.89E-05
rs7938053	11	24124710			C	0.7245	-2.741	0.6863	7.92E-05
rs1954959	18	71462758			A	0.6116	-2.742	0.687	7.99E-05
rs2596621	3	24169503	THRB	Intron	T	0.8564	-3.456	0.8663	8.04E-05
rs9304507	18	23274733			C	0.3073	-2.654	0.6656	8.09E-05
rs898091	4	124059514	NUDT6	Intron	G	0.1142	-3.753	0.9419	8.19E-05
rs4953873	2	133595044	NCKAP5	Intron	A	0.1559	-3.349	0.8427	8.54E-05
rs3795846	2	133591601	NCKAP5	Intron	C	0.1559	-3.349	0.8427	8.54E-05
rs13393417	2	133591982	NCKAP5	Intron	T	0.1559	-3.349	0.8427	8.54E-05
rs2148436	13	47102079			G	0.2919	-2.847	0.7164	8.55E-05
rs11059721	12	127549782	TMEM132C	Intron	T	0.1331	-3.506	0.8824	8.56E-05
rs7009772	8	123870264	ZHX2	Intron	C	0.6546	-2.583	0.6508	8.70E-05
rs4148487	13	94637204	ABCC4	Intron	T	0.08333	-4.549	1.146	8.72E-05
rs1470661	3	24172277	THRB	Intron	G	0.8562	-3.387	0.8532	8.72E-05
GA016578	19	52470697			C	0.664	-2.583	0.6507	8.74E-05
rs6428028	1	188933317	LOC440704	Intron	G	0.06452	-4.702	1.186	8.90E-05
rs8065859	17	48698066			T	0.03226	-7.079	1.786	8.92E-05
rs17079354	13	23269225	MIPEP	Intron	T	0.8723	-3.67	0.9268	9.05E-05
rs7206770	16	31537650	CSDAP1	Flanking-5	A	0.3185	-2.626	0.6634	9.08E-05
rs7105602	11	24089229			A	0.7204	-2.662	0.6725	9.14E-05
rs11830109	12	25508367	IFLTD1	Flanking-3	G	0.2876	-2.705	0.6848	9.41E-05
rs10502493	18	23281928			T	0.3078	-2.629	0.6656	9.42E-05
rs12467895	2	20528250	RHOB	Flanking-3	C	0.97043	-7.371	1.866	9.43E-05

rs1443346	17	24943651	GIT1	Flanking-5	C	0.91263	-4.105	1.04	9.44E-05
rs16824231	2	228496966	DAW1	3'-utr	T	0.9207	-4.493	1.138	9.48E-05
rs10498224	2	228497825	DAW1	Flanking-3	T	0.9207	-4.493	1.138	9.48E-05
rs16824212	2	228491654	DAW1	Intron	G	0.9207	-4.493	1.138	9.48E-05
rs16824214	2	228491691	DAW1	Intron	G	0.9207	-4.493	1.138	9.48E-05
rs16824223	2	228492849	DAW1	Intron	C	0.9207	-4.493	1.138	9.48E-05
rs10501303	11	43650592	MIR129-2	Flanking-3	G	0.94758	-5.476	1.389	9.71E-05
rs16824237	2	228505698	DAW1	Flanking-3	C	0.92049	-4.49	1.14	9.86E-05
rs17706248	5	16438915	ZNF622	Flanking-3	C	0.7863	-2.908	0.7383	9.88E-05

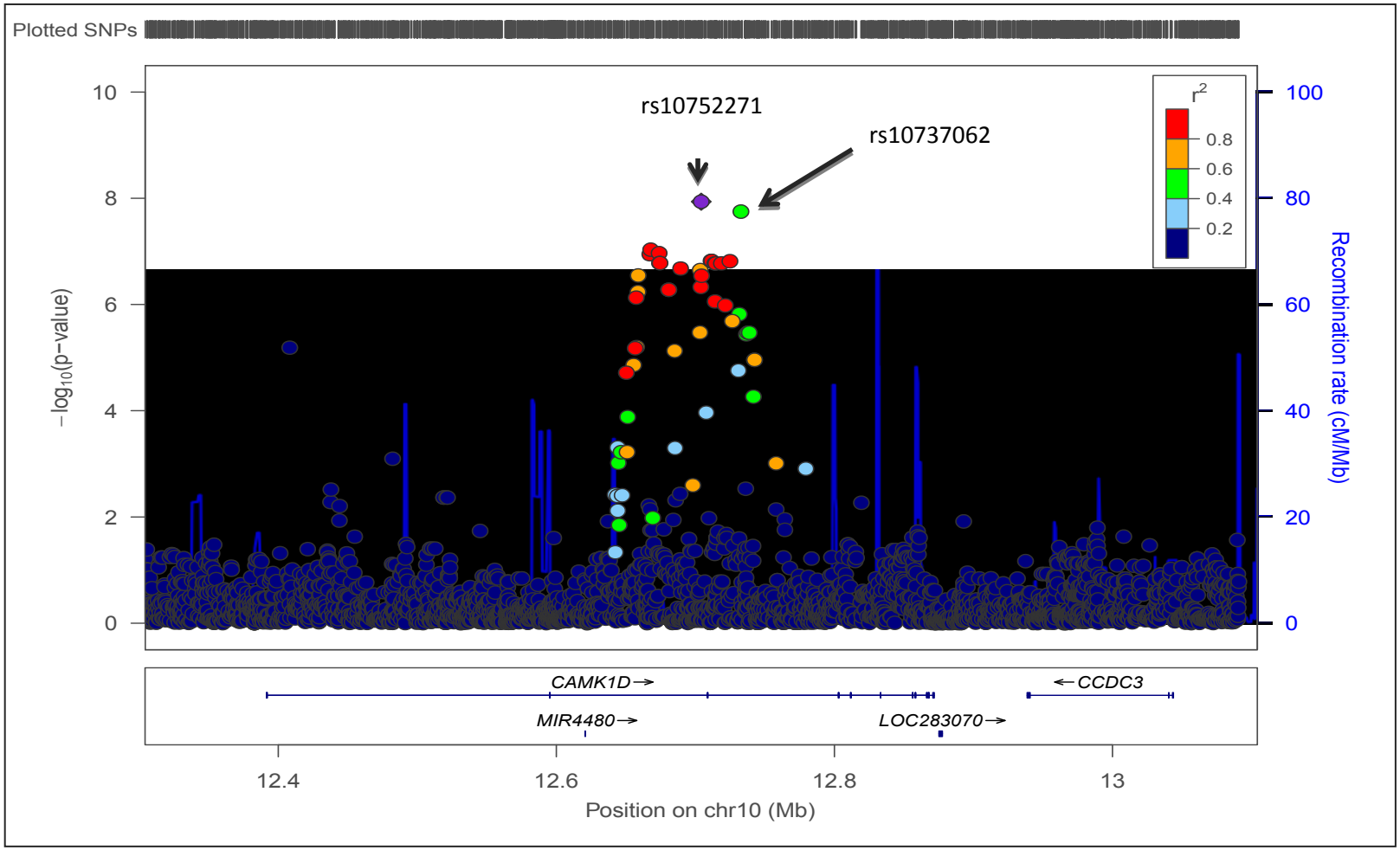

Figura 5. Local Manhattan plot per la regione del gene CAMK1D (Calcium/Calmodulin-dependent Protein Kinase ID). Ciascun pallino rappresenta un polimorfismo a singolo nucleotide (SNP), l'asse delle y è -log10 del p value di associazione per la risposta al losartan, e l'asse delle x rappresenta la posizione fisica sul cromosoma (build 37, hg19). I pallini sono colorati diversamente a seconda del linkage disequilibrium (LD; r2) tra lo SNP considerato e il best SNP rs1075271 (quadratino viola).

Tabella 3

Markers Information							LOS _SBP4			LOS _DBP4		
SNP	Chr	Position (bp)	Gene	Location	Risk Allele	Risk Allele Frequency	Beta	SE	P	Beta	SE	P
rs10752271	10	12744197	CAMK1D	Intron	G	0.103	-5.5	0.9494	1.20E-08	-3.049	0.7053	2.01E-05
rs10906202	10	12758742	CAMK1D	Intron	T	0.1022	-5.121	0.9595	1.68E-07	-3.079	0.7042	1.62E-05
rs4747995	10	12751740	CAMK1D	Intron	T	0.1014	-5.145	0.9652	1.74E-07	-3.071	0.7078	1.87E-05
rs10737061	10	12743504	CAMK1D	Intron	G	0.1384	-4.486	0.8495	2.25E-07	-2.542	0.626	6.03E-05
rs6590748	11	133927963	LOC283177	Flanking-3	A	0.03091	-8.243	1.635	7.41E-07	-4.807	1.2	7.52E-05
rs11823509	11	43624844	MIR129-2	Flanking-3	G	0.96631	-8.304	1.715	1.91E-06	-5.133	1.248	4.84E-05
rs10742684	11	43626579	MIR129-2	Flanking-3	T	0.96631	-8.304	1.715	1.91E-06	-5.133	1.248	4.84E-05
rs1996509	11	43627650	MIR129-2	Flanking-3	C	0.96631	-8.304	1.715	1.91E-06	-5.133	1.248	4.84E-05
rs10768969	11	43619682	MIR129-2	Flanking-3	T	0.96505	-8.138	1.681	1.92E-06	-5.004	1.224	5.37E-05
rs7940743	11	43621246	MIR129-2	Flanking-3	G	0.96505	-8.138	1.681	1.92E-06	-5.004	1.224	5.37E-05
rs11820704	11	43610540	MIR129-2	Flanking-3	C	0.96496	-8.138	1.684	2.00E-06	-4.983	1.224	5.77E-05
rs6979778	7	37334927	ELMO1	Intron	G	0.3176	-3.05	0.6315	2.03E-06	-1.255	0.4701	7.95E-03
rs6485440	11	43643261	MIR129-2	Flanking-3	A	0.96371	-7.955	1.661	2.46E-06	-4.685	1.209	1.26E-04
rs7935875	11	43649694	MIR129-2	Flanking-3	G	0.97019	-8.712	1.832	2.90E-06	-5.62	1.33	3.06E-05
rs7835298	8	124621484	FBXO32	Intron	G	0.6425	-2.84	0.6007	3.27E-06	-1.805	0.4387	4.82E-05
rs2280919	8	124620960	FBXO32	Intron	G	0.6398	-2.839	0.6015	3.39E-06	-1.861	0.4388	2.83E-05
rs1872757	10	3835365	KLF6	Flanking-5	C	0.08468	-5.006	1.074	4.42E-06	-2.989	0.785	1.65E-04
rs9834596	3	65009461	MIR548AN	Flanking-3	G	0.1976	-3.783	0.8202	5.55E-06	-1.357	0.603	2.51E-02
rs7432993	3	65013579	MIR548AN	Flanking-3	C	0.1962	-3.779	0.8227	6.05E-06	-1.339	0.6053	2.76E-02
rs11131000	3	65011849	MIR548AN	Flanking-3	C	0.1962	-3.779	0.8227	6.05E-06	-1.339	0.6053	2.76E-02
rs17079355	13	23269526	MIPEP	Intron	T	0.8757	-4.302	0.9428	6.97E-06	-2.182	0.6963	1.87E-03

rs11616254	13	23270375	MIPEP	Intron	A	0.8757	-4.302	0.9428	6.97E-06	-2.182	0.6963	1.87E-03
rs9297664	8	123867665	ZHX2	Intron	G	0.93414	-5.559	1.238	9.68E-06	-1.87	0.9149	4.17E-02
rs7824502	8	83108320			G	0.2849	-2.947	0.6594	1.05E-05	-2.009	0.4799	3.58E-05
rs7094047	10	12782600	CAMK1D	Intron	G	0.1129	-4.258	0.9547	1.10E-05	-2.464	0.6983	4.72E-04
rs17337271	13	23250220	MIPEP	Intron	G	0.8747	-4.172	0.9398	1.21E-05	-2.181	0.6911	1.74E-03
rs5006151	10	3827766	KLF6	Flanking-5	T	0.08514	-4.86	1.095	1.22E-05	-2.953	0.7994	2.55E-04
rs5006152	10	3827781	KLF6	Flanking-5	T	0.08514	-4.86	1.095	1.22E-05	-2.953	0.7994	2.55E-04
rs5006154	10	3827857	KLF6	Flanking-5	G	0.08625	-4.787	1.087	1.42E-05	-2.938	0.7931	2.46E-04
rs5006153	10	3827807	KLF6	Flanking-5	G	0.08625	-4.787	1.087	1.42E-05	-2.938	0.7931	2.46E-04
rs17337965	13	23279149	MIPEP	Intron	T	0.875	-4.128	0.9421	1.55E-05	-2.159	0.6913	1.94E-03
rs10507333	13	23267776	MIPEP	Intron	G	0.875	-4.128	0.9421	1.55E-05	-2.159	0.6913	1.94E-03
rs1872756	10	3828216	KLF6	Flanking-5	T	0.08871	-4.624	1.057	1.60E-05	-2.659	0.7724	6.44E-04
rs11597036	10	3831337	KLF6	Flanking-5	A	0.08871	-4.624	1.057	1.60E-05	-2.659	0.7724	6.44E-04
rs11592875	10	3831480	KLF6	Flanking-5	T	0.08871	-4.624	1.057	1.60E-05	-2.659	0.7724	6.44E-04
rs7995933	13	23295177	MIPEP	Intron	T	0.871	-4.071	0.9329	1.67E-05	-2.197	0.684	1.44E-03
rs17268170	13	94654287	ABCC4	Intron	T	0.08468	-4.921	1.131	1.77E-05	-2.726	0.8248	1.04E-03
rs2833264	21	31376432	KRTAP19-8	Flanking-5	C	0.6492	-2.811	0.6463	1.78E-05	-1.486	0.475	1.91E-03
rs7236668	18	23270253			C	0.8199	-3.358	0.7772	2.02E-05	-0.8403	0.5758	1.45E-01
rs9548649	13	38639292			G	0.05914	-5.47	1.268	2.09E-05	-3.403	0.9246	2.69E-04
rs4245391	13	38632410			T	0.05914	-5.47	1.268	2.09E-05	-3.403	0.9246	2.69E-04
rs9566404	13	38635163			T	0.05914	-5.47	1.268	2.09E-05	-3.403	0.9246	2.69E-04
rs1999543	13	38631834			T	0.05914	-5.47	1.268	2.09E-05	-3.403	0.9246	2.69E-04
rs2294090	8	124614328	FBXO32	Intron	G	0.6237	-2.619	0.6119	2.41E-05	-1.774	0.4448	8.09E-05
rs10204085	2	20518430	RHOB	Flanking-3	G	0.96774	-7.596	1.778	2.48E-05	-4.16	1.298	1.47E-03
rs13261590	8	123863165	ZHX2	5'-utr	C	0.93548	-5.346	1.254	2.57E-05	-1.889	0.9236	4.16E-02
rs9650083	8	123860964	ZHX2	Flanking-5	G	0.93548	-5.346	1.254	2.57E-05	-1.889	0.9236	4.16E-02
rs17339485	13	23332951	MIPEP	Intron	G	0.8743	-3.851	0.904	2.61E-05	-2.296	0.6604	5.71E-04

rs2077520	20	17669518	BANF2	Flanking-3	G	0.2473	-2.988	0.7028	2.72E-05	-1.4	0.5165	7.06E-03
rs6484016	11	24129346			G	0.721	-2.889	0.6815	2.87E-05	-1.731	0.4986	5.82E-04
rs2766047	10	129011077	DOCK1	Intron	A	0.6024	-2.602	0.6143	2.90E-05	-0.6639	0.4553	1.46E-01
rs7008395	8	99560087	STK3	Intron	C	0.93145	-5.349	1.271	3.27E-05	-2.921	0.924	1.71E-03
rs16897031	8	99552567	STK3	Intron	G	0.9328	-5.366	1.28	3.50E-05	-2.92	0.9305	1.84E-03
rs17227068	16	52606706	FTO	Intron	G	0.94489	-5.768	1.378	3.59E-05	-3.282	1.014	1.32E-03
rs17825519	16	52614254	FTO	Intron	T	0.94489	-5.768	1.378	3.59E-05	-3.282	1.014	1.32E-03
rs9536429	13	52958882			C	0.1909	-3.211	0.7676	3.62E-05	-1.068	0.5668	6.04E-02
rs17539351	2	169474806	G6PC2	Flanking-3	T	0.07527	-4.688	1.122	3.70E-05	-2.342	0.8248	4.78E-03
rs6889873	5	16409288	ZNF622	Flanking-3	C	0.7298	-2.882	0.6926	3.97E-05	-1.151	0.511	2.49E-02
rs13436110	5	68253745			G	0.1761	-3.303	0.7947	4.05E-05	-2.937	0.5718	4.63E-07
rs7720712	5	68254626			T	0.1761	-3.303	0.7947	4.05E-05	-2.937	0.5718	4.63E-07
rs7906212	10	12686538	CAMK1D	Intron	T	0.08266	-4.277	1.032	4.28E-05	-2.528	0.7506	8.42E-04
rs16868493	5	16413635	ZNF622	Flanking-3	T	0.7358	-2.893	0.6996	4.43E-05	-1.252	0.5155	1.57E-02
rs12410065	1	18652133	IGSF21	Flanking-3	T	0.04839	-6.16	1.491	4.48E-05	-4.033	1.082	2.24E-04
rs17089328	13	71873252			A	0.875	-3.787	0.9182	4.62E-05	-2.498	0.6671	2.11E-04
rs11551114	13	23334475	MIPEP	Coding	G	0.879	-3.868	0.9381	4.65E-05	-2.405	0.6837	4.92E-04
rs2151455	13	38641112			C	0.05795	-5.26	1.277	4.76E-05	-3.212	0.93	6.19E-04
rs12521138	5	16398675			T	0.7325	-2.853	0.6936	4.85E-05	-1.197	0.5112	1.98E-02
rs6888082	5	68250572			T	0.1761	-3.235	0.7868	4.88E-05	-2.838	0.5668	8.67E-07
rs2119684	4	180272013			A	0.8078	-3.3	0.8028	4.90E-05	-1.836	0.5872	1.92E-03
rs11986338	8	99522380	KCNS2	Flanking-3	C	0.93011	-5.1	1.242	4.95E-05	-2.855	0.9023	1.69E-03
rs12538853	7	91011516			C	0.90591	-4.285	1.044	5.00E-05	-2.024	0.7664	8.63E-03
rs2403900	11	24119117			A	0.6895	-2.687	0.6549	5.06E-05	-1.676	0.4772	5.02E-04
rs731172	2	20532053	RHOB	Flanking-3	C	0.9664	-7.191	1.753	5.06E-05	-3.982	1.278	1.99E-03
rs234597	14	96150975	PAPOLA	Flanking-3	C	0.2298	-2.983	0.7283	5.20E-05	-1.695	0.5323	1.57E-03
rs12430353	13	47118513			G	0.2932	-2.905	0.7098	5.28E-05	-2.022	0.5166	1.09E-04

rs10906210	10	12781750	CAMK1D	Intron	A	0.1492	-3.584	0.8773	5.44E-05	-1.395	0.6441	3.10E-02
rs10492660	13	42387323	EPSTI1	Intron	T	0.5605	-2.525	0.6181	5.45E-05	-1.591	0.4499	4.61E-04
rs2596625	3	24183978	THRB	Intron	T	0.8589	-3.56	0.8725	5.55E-05	-0.5726	0.6463	3.76E-01
rs1564351	13	94635723	ABCC4	Intron	G	0.08602	-4.588	1.127	5.79E-05	-2.901	0.8184	4.45E-04
rs10857825	1	110845750	CYMP	Flanking-3	T	0.03226	-7.114	1.749	5.85E-05	-2.616	1.289	4.31E-02
rs12959715	18	23272335			C	0.3095	-2.691	0.6625	6.01E-05	-1.153	0.4865	1.84E-02
rs17189390	13	94642127	ABCC4	Intron	T	0.08468	-4.605	1.135	6.11E-05	-2.769	0.8251	8.75E-04
rs806943	17	48713797			A	0.03629	-6.837	1.686	6.15E-05	-1.706	1.239	1.70E-01
rs12239305	1	110847851	CYMP	Flanking-3	T	0.03235	-7.08	1.748	6.27E-05	-2.611	1.29	4.38E-02
rs12517749	5	16363026			C	0.7284	-2.785	0.6897	6.61E-05	-1.113	0.512	3.03E-02
rs3849093	5	16379795			A	0.7284	-2.785	0.6897	6.61E-05	-1.113	0.512	3.03E-02
rs1467231	18	23280181			G	0.3113	-2.666	0.6611	6.76E-05	-1.106	0.4857	2.34E-02
rs1467232	18	23281214			C	0.3113	-2.666	0.6611	6.76E-05	-1.106	0.4857	2.34E-02
rs1467233	18	23281358			T	0.3113	-2.666	0.6611	6.76E-05	-1.106	0.4857	2.34E-02
rs11755624	6	6753761			C	0.94355	-4.956	1.232	7.02E-05	-2.468	0.9024	6.54E-03
rs17268129	13	94642858	ABCC4	Intron	T	0.08602	-4.538	1.129	7.09E-05	-2.714	0.8206	1.04E-03
rs10906199	10	12747804	CAMK1D	Intron	C	0.2191	-2.851	0.7093	7.12E-05	-1.62	0.5211	2.02E-03
rs7229677	18	23280888			C	0.3091	-2.667	0.6645	7.29E-05	-1.123	0.4885	2.21E-02
rs9594831	13	42386448	EPSTI1	Intron	G	0.4234	-2.482	0.6185	7.31E-05	-1.112	0.4545	1.49E-02
rs2702592	18	69790381			T	0.1667	-3.297	0.8225	7.45E-05	-2.447	0.5953	4.90E-05
rs17339599	13	23335812	MIPEP	Intron	C	0.8723	-3.562	0.8887	7.45E-05	-2.335	0.6463	3.46E-04
rs2287688	19	52471101	PRR24	Flanking-3	T	0.6626	-2.581	0.6447	7.58E-05	-1.411	0.4694	2.83E-03
rs4804036	19	52459483	CCDC9	Intron	G	0.6626	-2.581	0.6447	7.58E-05	-1.411	0.4694	2.83E-03
rs12955575	18	23281629			A	0.3118	-2.641	0.6611	7.84E-05	-1.086	0.4861	2.61E-02
rs11619568	13	47103343			G	0.2917	-2.843	0.7118	7.89E-05	-1.985	0.5181	1.50E-04
rs7938053	11	24124710			C	0.7245	-2.741	0.6863	7.92E-05	-1.762	0.5004	4.85E-04
rs1954959	18	71462758			A	0.6116	-2.742	0.687	7.99E-05	-0.7015	0.5091	1.69E-01

rs2596621	3	24169503	THRB	Intron	T	0.8564	-3.456	0.8663	8.04E-05	-1.05	0.6387	1.01E-01
rs9304507	18	23274733			C	0.3073	-2.654	0.6656	8.09E-05	-1.088	0.4889	2.67E-02
rs898091	4	124059514	NUDT6	Intron	G	0.1142	-3.753	0.9419	8.19E-05	-2.223	0.6895	1.38E-03
rs13393417	2	133591982	NCKAP5	Intron	T	0.1559	-3.349	0.8427	8.54E-05	-1.018	0.6239	1.04E-01
rs4953873	2	133595044	NCKAP5	Intron	A	0.1559	-3.349	0.8427	8.54E-05	-1.018	0.6239	1.04E-01
rs3795846	2	133591601	NCKAP5	Intron	C	0.1559	-3.349	0.8427	8.54E-05	-1.018	0.6239	1.04E-01
rs2148436	13	47102079			G	0.2919	-2.847	0.7164	8.55E-05	-1.994	0.5215	1.56E-04
rs11059721	12	127549782	TMEM132C	Intron	T	0.1331	-3.506	0.8824	8.56E-05	-2.136	0.6439	1.00E-03
rs7009772	8	123870264	ZHX2	Intron	C	0.6546	-2.583	0.6508	8.70E-05	-1.749	0.474	2.60E-04
rs4148487	13	94637204	ABCC4	Intron	T	0.08333	-4.549	1.146	8.72E-05	-2.726	0.8327	1.17E-03
rs1470661	3	24172277	THRB	Intron	G	0.8562	-3.387	0.8532	8.72E-05	-0.9319	0.6304	1.40E-01
GA016578	19	52470697			C	0.664	-2.583	0.6507	8.74E-05	-1.398	0.4745	3.43E-03
rs6428028	1	188933317	LOC440704	Intron	G	0.06452	-4.702	1.186	8.90E-05	-2.372	0.8688	6.65E-03
rs8065859	17	48698066			T	0.03226	-7.079	1.786	8.92E-05	-2.003	1.313	1.28E-01
rs17079354	13	23269225	MIPEP	Intron	T	0.8723	-3.67	0.9268	9.05E-05	-1.986	0.6779	3.61E-03
rs7206770	16	31537650	CSDAP1	Flanking-5	A	0.3185	-2.626	0.6634	9.08E-05	-1.365	0.4844	5.11E-03
rs7105602	11	24089229			A	0.7204	-2.662	0.6725	9.14E-05	-1.782	0.49	3.15E-04
rs11830109	12	25508367	IFLTD1	Flanking-3	G	0.2876	-2.705	0.6848	9.41E-05	-1.043	0.5027	3.88E-02
rs10502493	18	23281928			T	0.3078	-2.629	0.6656	9.42E-05	-1.067	0.4892	2.98E-02
rs12467895	2	20528250	RHOB	Flanking-3	C	0.97043	-7.371	1.866	9.43E-05	-3.968	1.362	3.80E-03
rs1443346	17	24943651	GIT1	Flanking-5	C	0.91263	-4.105	1.04	9.44E-05	-2.495	0.7547	1.05E-03
rs16824231	2	228496966	DAW1	3'-utr	T	0.9207	-4.493	1.138	9.48E-05	-2.747	0.8305	1.04E-03
rs10498224	2	228497825	DAW1	Flanking-3	T	0.9207	-4.493	1.138	9.48E-05	-2.747	0.8305	1.04E-03
rs16824212	2	228491654	DAW1	Intron	G	0.9207	-4.493	1.138	9.48E-05	-2.747	0.8305	1.04E-03
rs16824214	2	228491691	DAW1	Intron	G	0.9207	-4.493	1.138	9.48E-05	-2.747	0.8305	1.04E-03
rs16824223	2	228492849	DAW1	Intron	C	0.9207	-4.493	1.138	9.48E-05	-2.747	0.8305	1.04E-03

Tabella 4

Markers Information							LOSARTAN			HCTZ		
SNP	Chr	Position	Risk Allele	Risk Allele Freq	Gene	Location	Beta	SE	P	Beta	SE	P
rs10752271	10	12744197	G	0.103	CAMK1D	Intron	-5.5	0.9494	1.20E-08	-1.575	1.101	1.53E-01
rs10906202	10	12758742	T	0.1022	CAMK1D	Intron	-5.121	0.9595	1.68E-07	-1.575	1.101	1.53E-01
rs4747995	10	12751740	T	0.1014	CAMK1D	Intron	-5.145	0.9652	1.74E-07	-1.575	1.101	1.53E-01
rs10737061	10	12743504	G	0.1384	CAMK1D	Intron	-4.486	0.8495	2.25E-07	-1.757	0.9633	6.88E-02
rs6590748	11	133927963	A	0.03091	LOC283177	Flanking-3	-8.243	1.635	7.41E-07	-2.734	2.847	3.37E-01
rs11823509	11	43624844	G	0.96631	MIR129-2	Flanking-3	-8.304	1.715	1.91E-06	2.517	2.454	3.06E-01
rs10742684	11	43626579	T	0.96631	MIR129-2	Flanking-3	-8.304	1.715	1.91E-06	2.517	2.454	3.06E-01
rs1996509	11	43627650	C	0.96631	MIR129-2	Flanking-3	-8.304	1.715	1.91E-06	2.517	2.454	3.06E-01
rs10768969	11	43619682	T	0.96505	MIR129-2	Flanking-3	-8.138	1.681	1.92E-06	2.781	2.414	2.50E-01
rs7940743	11	43621246	G	0.96505	MIR129-2	Flanking-3	-8.138	1.681	1.92E-06	2.517	2.454	3.06E-01
rs11820704	11	43610540	C	0.96496	MIR129-2	Flanking-3	-8.138	1.684	2.00E-06	2.781	2.414	2.50E-01
rs6979778	7	37334927	G	0.3176	ELMO1	Intron	-3.05	0.6315	2.03E-06	0.2947	0.7351	6.89E-01
rs6485440	11	43643261	A	0.96371	MIR129-2	Flanking-3	-7.955	1.661	2.46E-06	2.517	2.454	3.06E-01
rs7935875	11	43649694	G	0.97019	MIR129-2	Flanking-3	-8.712	1.832	2.90E-06	2.517	2.454	3.06E-01
rs7835298	8	124621484	G	0.6425	FBXO32	Intron	-2.84	0.6007	3.27E-06	-0.06438	0.7481	9.32E-01
rs2280919	8	124620960	G	0.6398	FBXO32	Intron	-2.839	0.6015	3.39E-06	-0.08557	0.7454	9.09E-01
rs1872757	10	3835365	C	0.08468	KLF6	Flanking-5	-5.006	1.074	4.42E-06	0.9202	1.229	4.54E-01
rs9834596	3	65009461	G	0.1976	MIR548AN	Flanking-3	-3.783	0.8202	5.55E-06	-	-	-
rs7432993	3	65013579	C	0.1962	MIR548AN	Flanking-3	-3.779	0.8227	6.05E-06	0.7531	0.9737	4.40E-01
rs11131000	3	65011849	C	0.1962	MIR548AN	Flanking-3	-3.779	0.8227	6.05E-06	0.6484	0.9722	5.05E-01

rs17079355	13	23269526	T	0.8757	MIPEP	Intron	-4.302	0.9428	6.97E-06	-1.077	1.069	3.15E-01
rs11616254	13	23270375	A	0.8757	MIPEP	Intron	-4.302	0.9428	6.97E-06	-1.077	1.069	3.15E-01
rs9297664	8	123867665	G	0.93414	ZHX2	Intron	-5.559	1.238	9.68E-06	-0.1902	1.369	8.90E-01
rs7824502	8	83108320	G	0.2849			-2.947	0.6594	1.05E-05	-0.6417	0.7784	4.10E-01
rs7094047	10	12782600	G	0.1129	CAMK1D	Intron	-4.258	0.9547	1.10E-05	-0.9405	1.074	3.82E-01
rs17337271	13	23250220	G	0.8747	MIPEP	Intron	-4.172	0.9398	1.21E-05	-0.9256	1.07	3.87E-01
rs5006151	10	3827766	T	0.08514	KLF6	Flanking-5	-4.86	1.095	1.22E-05	1.064	1.211	3.80E-01
rs5006152	10	3827781	T	0.08514	KLF6	Flanking-5	-4.86	1.095	1.22E-05	1.064	1.211	3.80E-01
rs5006154	10	3827857	G	0.08625	KLF6	Flanking-5	-4.787	1.087	1.42E-05	1.064	1.211	3.80E-01
rs5006153	10	3827807	G	0.08625	KLF6	Flanking-5	-4.787	1.087	1.42E-05	1.064	1.211	3.80E-01
rs17337965	13	23279149	T	0.875	MIPEP	Intron	-4.128	0.9421	1.55E-05	-1.085	1.065	3.09E-01
rs10507333	13	23267776	G	0.875	MIPEP	Intron	-4.128	0.9421	1.55E-05	-1.077	1.069	3.15E-01
rs1872756	10	3828216	T	0.08871	KLF6	Flanking-5	-4.624	1.057	1.60E-05	1.064	1.211	3.80E-01
rs11597036	10	3831337	A	0.08871	KLF6	Flanking-5	-4.624	1.057	1.60E-05	1.017	1.215	4.03E-01
rs11592875	10	3831480	T	0.08871	KLF6	Flanking-5	-4.624	1.057	1.60E-05	1.017	1.215	4.03E-01
rs7995933	13	23295177	T	0.871	MIPEP	Intron	-4.071	0.9329	1.67E-05	-0.9037	1.055	3.92E-01
rs17268170	13	94654287	T	0.08468	ABCC4	Intron	-4.921	1.131	1.77E-05	-2.291	1.233	6.36E-02
rs2833264	21	31376432	C	0.6492	KRTAP19-8	Flanking-5	-2.811	0.6463	1.78E-05	0.2665	0.7797	7.33E-01
rs7236668	18	23270253	C	0.8199			-3.358	0.7772	2.02E-05	0.4738	0.9522	6.19E-01
rs9548649	13	38639292	G	0.05914			-5.47	1.268	2.09E-05	0.6826	1.417	6.30E-01
rs4245391	13	38632410	T	0.05914			-5.47	1.268	2.09E-05	0.5455	1.426	7.02E-01
rs9566404	13	38635163	T	0.05914			-5.47	1.268	2.09E-05	0.5455	1.426	7.02E-01
rs1999543	13	38631834	T	0.05914			-5.47	1.268	2.09E-05	0.5455	1.426	7.02E-01
rs2294090	8	124614328	G	0.6237	FBXO32	Intron	-2.619	0.6119	2.41E-05	-1.045	0.7318	1.54E-01
rs10204085	2	20518430	G	0.96774	RHOB	Flanking-3	-7.596	1.778	2.48E-05	1.703	1.875	3.64E-01
rs13261590	8	123863165	C	0.93548	ZHX2	5'-utr	-5.346	1.254	2.57E-05	0.7605	1.417	5.92E-01
rs9650083	8	123860964	G	0.93548	ZHX2	Flanking-5	-5.346	1.254	2.57E-05	0.7605	1.417	5.92E-01

rs17339485	13	23332951	G	0.8743	MIPEP	Intron	-3.851	0.904	2.61E-05	-0.5934	1.043	5.70E-01
rs2077520	20	17669518	G	0.2473	BANF2	Flanking-3	-2.988	0.7028	2.72E-05	-0.6284	0.7964	4.30E-01
rs6484016	11	24129346	G	0.721			-2.889	0.6815	2.87E-05	-0.2732	0.7199	7.05E-01
rs2766047	10	129011077	A	0.6024	DOCK1	Intron	-2.602	0.6143	2.90E-05	0.2547	0.6904	7.12E-01
rs7008395	8	99560087	C	0.93145	STK3	Intron	-5.349	1.271	3.27E-05	0.7973	1.78	6.54E-01
rs16897031	8	99552567	G	0.9328	STK3	Intron	-5.366	1.28	3.50E-05	0.7973	1.78	6.54E-01
rs17227068	16	52606706	G	0.94489	FTO	Intron	-5.768	1.378	3.59E-05	0.6103	1.555	6.95E-01
rs17825519	16	52614254	T	0.94489	FTO	Intron	-5.768	1.378	3.59E-05	0.5232	1.543	7.35E-01
rs9536429	13	52958882	C	0.1909			-3.211	0.7676	3.62E-05	1.284	0.908	1.58E-01
rs17539351	2	169474806	T	0.07527	G6PC2	Flanking-3	-4.688	1.122	3.70E-05	1.006	1.161	3.87E-01
rs6889873	5	16409288	C	0.7298	ZNF622	Flanking-3	-2.882	0.6926	3.97E-05	-0.5	0.7686	5.16E-01
rs13436110	5	68253745	G	0.1761			-3.303	0.7947	4.05E-05	0.3623	0.9679	7.08E-01
rs7720712	5	68254626	T	0.1761			-3.303	0.7947	4.05E-05	0.3011	0.9669	7.56E-01
rs7906212	10	12686538	T	0.08266	CAMK1D	Intron	-4.277	1.032	4.28E-05	-2.167	1.211	7.41E-02
rs16868493	5	16413635	T	0.7358	ZNF622	Flanking-3	-2.893	0.6996	4.43E-05	-0.3586	0.7716	6.42E-01
rs12410065	1	18652133	T	0.04839	IGSF21	Flanking-3	-6.16	1.491	4.48E-05	-1.088	1.688	5.20E-01
rs17089328	13	71873252	A	0.875			-3.787	0.9182	4.62E-05	0.3312	0.9889	7.38E-01
rs11551114	13	23334475	G	0.879	MIPEP	Coding	-3.868	0.9381	4.65E-05	-	-	-
rs2151455	13	38641112	C	0.05795			-5.26	1.277	4.76E-05	0.9268	1.447	5.22E-01
rs12521138	5	16398675	T	0.7325			-2.853	0.6936	4.85E-05	-0.3706	0.7683	6.30E-01
rs6888082	5	68250572	T	0.1761			-3.235	0.7868	4.88E-05	0.3898	0.9591	6.85E-01
rs2119684	4	180272013	A	0.8078			-3.3	0.8028	4.90E-05	-0.08787	0.9046	9.23E-01
rs11986338	8	99522380	C	0.93011	KCNS2	Flanking-3	-5.1	1.242	4.95E-05	0.6984	1.719	6.85E-01
rs12538853	7	91011516	C	0.90591			-4.285	1.044	5.00E-05	-0.221	1.359	8.71E-01
rs731172	2	20532053	C	0.9664	RHOB	Flanking-3	-7.191	1.753	5.06E-05	1.703	1.875	3.64E-01
rs2403900	11	24119117	A	0.6895			-2.687	0.6549	5.06E-05	-0.4169	0.7169	5.61E-01
rs234597	14	96150975	C	0.2298	PAPOLA	Flanking-3	-2.983	0.7283	5.20E-05	-1.082	0.8102	1.82E-01

rs12430353	13	47118513	G	0.2932			-2.905	0.7098	5.28E-05	0.02273	0.7387	9.76E-01
rs10906210	10	12781750	A	0.1492	CAMK1D	Intron	-3.584	0.8773	5.44E-05	-1.696	1.037	1.03E-01
rs10492660	13	42387323	T	0.5605	EPSTI1	Intron	-2.525	0.6181	5.45E-05	-0.9921	0.6912	1.52E-01
rs2596625	3	24183978	T	0.8589	THRB	Intron	-3.56	0.8725	5.55E-05	-0.1067	0.8862	9.04E-01
rs1564351	13	94635723	G	0.08602	ABCC4	Intron	-4.588	1.127	5.79E-05	-2.149	1.255	8.73E-02
rs10857825	1	110845750	T	0.03226	CYMP	Flanking-3	-7.114	1.749	5.85E-05	-3.06	1.892	1.06E-01
rs12959715	18	23272335	C	0.3095			-2.691	0.6625	6.01E-05	-0.4449	0.7331	5.44E-01
rs17189390	13	94642127	T	0.08468	ABCC4	Intron	-4.605	1.135	6.11E-05	-2.149	1.255	8.73E-02
rs806943	17	48713797	A	0.03629			-6.837	1.686	6.15E-05	0.44	1.611	7.85E-01
rs12239305	1	110847851	T	0.03235	CYMP	Flanking-3	-7.08	1.748	6.27E-05	-3.06	1.892	1.06E-01
rs12517749	5	16363026	C	0.7284			-2.785	0.6897	6.61E-05	-0.5	0.7686	5.16E-01
rs3849093	5	16379795	A	0.7284			-2.785	0.6897	6.61E-05	-0.5	0.7686	5.16E-01
rs1467231	18	23280181	G	0.3113			-2.666	0.6611	6.76E-05	-0.3499	0.7344	6.34E-01
rs1467232	18	23281214	C	0.3113			-2.666	0.6611	6.76E-05	-0.3499	0.7344	6.34E-01
rs1467233	18	23281358	T	0.3113			-2.666	0.6611	6.76E-05	-0.3499	0.7344	6.34E-01
rs11755624	6	6753761	C	0.94355			-4.956	1.232	7.02E-05	-1.75	1.529	2.53E-01
rs17268129	13	94642858	T	0.08602	ABCC4	Intron	-4.538	1.129	7.09E-05	-2.226	1.234	7.18E-02
rs10906199	10	12747804	C	0.2191	CAMK1D	Intron	-2.851	0.7093	7.12E-05	-1.761	0.7989	2.79E-02
rs7229677	18	23280888	C	0.3091			-2.667	0.6645	7.29E-05	-0.3499	0.7344	6.34E-01
rs9594831	13	42386448	G	0.4234	EPSTI1	Intron	-2.482	0.6185	7.31E-05	0.9311	0.6902	1.78E-01
rs17339599	13	23335812	C	0.8723	MIPEP	Intron	-3.562	0.8887	7.45E-05	-0.5934	1.043	5.70E-01
rs2702592	18	69790381	T	0.1667			-3.297	0.8225	7.45E-05	0.3384	0.9176	7.12E-01
rs2287688	19	52471101	T	0.6626	PRR24	Flanking-3	-2.581	0.6447	7.58E-05	1.713	0.7614	2.48E-02
rs4804036	19	52459483	G	0.6626	CCDC9	Intron	-2.581	0.6447	7.58E-05	1.713	0.7614	2.48E-02
rs12955575	18	23281629	A	0.3118			-2.641	0.6611	7.84E-05	-0.3499	0.7344	6.34E-01
rs11619568	13	47103343	G	0.2917			-2.843	0.7118	7.89E-05	0.02273	0.7387	9.76E-01
rs7938053	11	24124710	C	0.7245			-2.741	0.6863	7.92E-05	-0.3136	0.7179	6.62E-01

rs1954959	18	71462758	A	0.6116			-2.742	0.687	7.99E-05	0.6585	0.7455	3.78E-01
rs2596621	3	24169503	T	0.8564	THRB	Intron	-3.456	0.8663	8.04E-05	0.03607	0.8976	9.68E-01
rs9304507	18	23274733	C	0.3073			-2.654	0.6656	8.09E-05	-0.4596	0.7362	5.33E-01
rs898091	4	124059514	G	0.1142	NUDT6	Intron	-3.753	0.9419	8.19E-05	0.2737	1.101	8.04E-01
rs13393417	2	133591982	T	0.1559	NCKAP5	Intron	-3.349	0.8427	8.54E-05	-0.328	0.9236	7.23E-01
rs4953873	2	133595044	A	0.1559	NCKAP5	Intron	-3.349	0.8427	8.54E-05	-0.328	0.9236	7.23E-01
rs3795846	2	133591601	C	0.1559	NCKAP5	Intron	-3.349	0.8427	8.54E-05	-0.328	0.9236	7.23E-01
rs2148436	13	47102079	G	0.2919			-2.847	0.7164	8.55E-05	0.02273	0.7387	9.76E-01
rs11059721	12	127549782	T	0.1331	TMEM132C	Intron	-3.506	0.8824	8.56E-05	-2.194	0.9711	2.43E-02
rs7009772	8	123870264	C	0.6546	ZHX2	Intron	-2.583	0.6508	8.70E-05	0.191	0.7193	7.91E-01
rs4148487	13	94637204	T	0.08333	ABCC4	Intron	-4.549	1.146	8.72E-05	-2.149	1.255	8.73E-02
rs1470661	3	24172277	G	0.8562	THRB	Intron	-3.387	0.8532	8.72E-05	0.03607	0.8976	9.68E-01
GA016578	19	52470697	C	0.664			-2.583	0.6507	8.74E-05	-	-	-
rs6428028	1	188933317	G	0.06452	LOC440704	Intron	-4.702	1.186	8.90E-05	2.039	1.67	2.23E-01
rs8065859	17	48698066	T	0.03226			-7.079	1.786	8.92E-05	0.5734	1.635	7.26E-01
rs17079354	13	23269225	T	0.8723	MIPEP	Intron	-3.67	0.9268	9.05E-05	-1.077	1.069	3.15E-01
rs7206770	16	31537650	A	0.3185	CSDAP1	Flanking-5	-2.626	0.6634	9.08E-05	0.2619	0.7123	7.13E-01
rs7105602	11	24089229	A	0.7204			-2.662	0.6725	9.14E-05	-0.4167	0.7284	5.68E-01
rs11830109	12	25508367	G	0.2876	IFLTD1	Flanking-3	-2.705	0.6848	9.41E-05	-0.6756	0.7832	3.89E-01
rs10502493	18	23281928	T	0.3078			-2.629	0.6656	9.42E-05	-0.4596	0.7362	5.33E-01
rs12467895	2	20528250	C	0.97043	RHOB	Flanking-3	-7.371	1.866	9.43E-05	1.703	1.875	3.64E-01
rs1443346	17	24943651	C	0.91263	GIT1	Flanking-5	-4.105	1.04	9.44E-05	-	-	-
rs16824231	2	228496966	T	0.9207	DAW1	3'-utr	-4.493	1.138	9.48E-05	-4.097	1.418	4.01E-03
rs10498224	2	228497825	T	0.9207	DAW1	Flanking-3	-4.493	1.138	9.48E-05	-4.097	1.418	4.01E-03
rs16824212	2	228491654	G	0.9207	DAW1	Intron	-4.493	1.138	9.48E-05	-4.097	1.418	4.01E-03
rs16824214	2	228491691	G	0.9207	DAW1	Intron	-4.493	1.138	9.48E-05	-4.097	1.418	4.01E-03

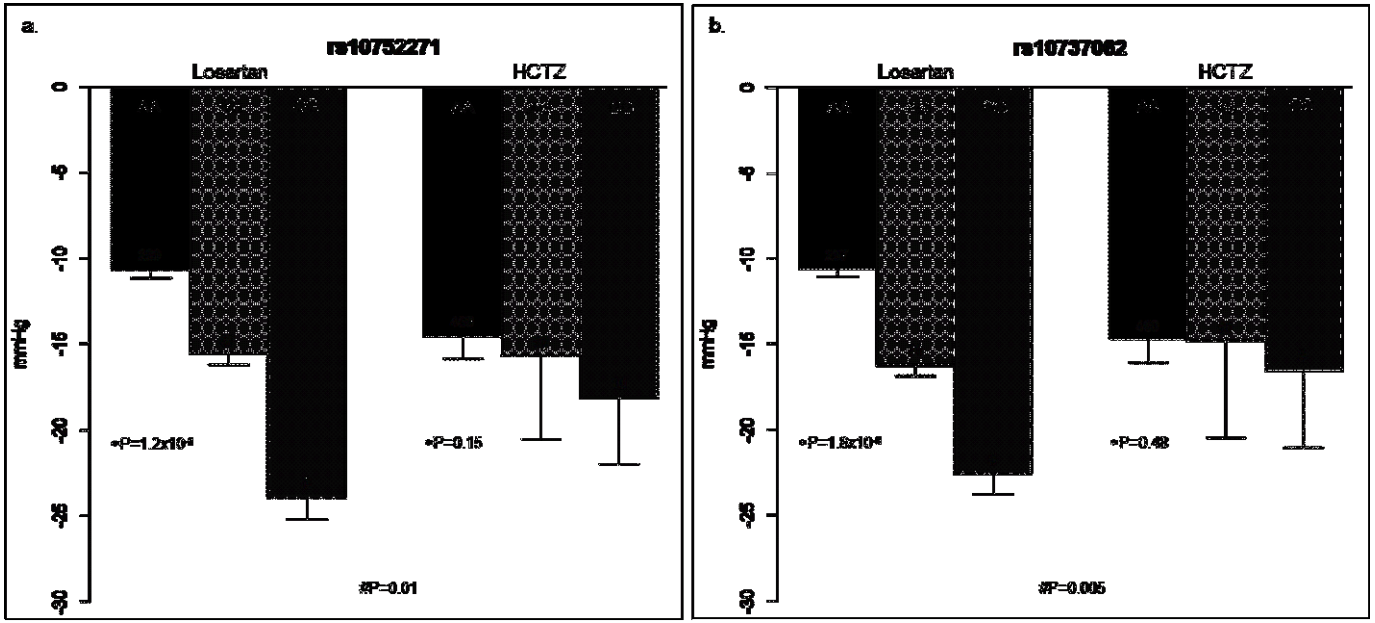

Figura 6. Media della risposta pressoria sistolica al losartan e all'HCTZ relativa al rs10752271 (pannello a) e rs10737062 (pannello b). In ciascuna colonna sono indicati il numero di individui per genotipo.*Analisi di regressione lineare che compara i genotipi in ciascun trattamento; # Analisi di interazione SNPxTreatment che compara losartan e **HCTZ.**

Tabella 5: Risultati di replicazione *in-silico*
La tabella mostra I risultati di associazione di rs10752271 (BETA, SE e P values) per gli studi SOPHIA, GERA2 e GENRES.

Studies	Beta	SE	P
SOPHIA	-5.5	0.94	1.20E-08
GENRES	-5.3	2.5	0.04
GERA2	-0.35	1.97	0.9

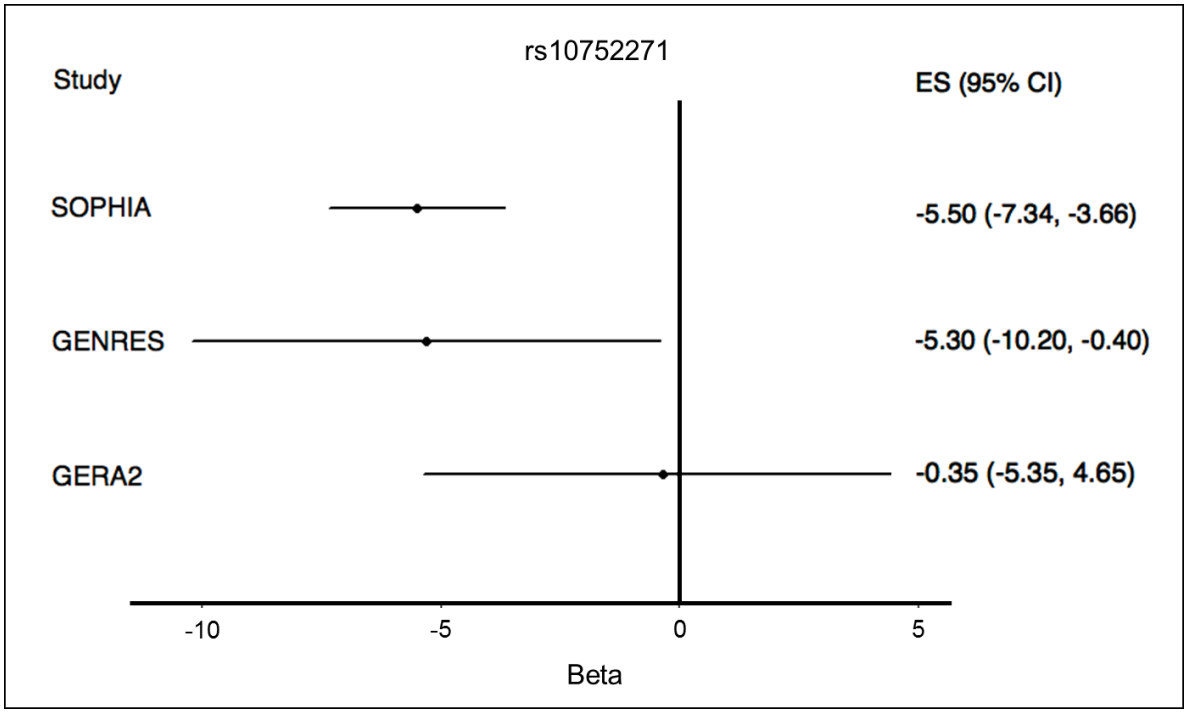

Figura 7: **Effect size della risposta pressoria negli studi SOPHIA , GENRES e GERA2.** I quadratini e le linee orizzontali corrispondono agli effects (beta) e al 95% del CI di ciascuno studio.

BIBLIOGRAFIA

1 Turner ST, Schwartz GL, Chapman AB, Hall WD and Boerwinkle E. Antihypertensive pharmacogenetics: getting the righy drug into the right patient. *Journal of Hypertension 2001*. 19:1-11

2 Ward R. Familial aggregation and genetic epidemiology of blood pressure. In: Laragh JH, Brenner BM, eds. *Hypertension: Pathophysiology, Diagnosis and Management* 81-100 (1990).

3 Schelleman H, Stricker BH, De Boer A, Kroon AA, Verschuren MW, Van Duijn CM, Psaty BM, Klungel OH. Drug-gene interactions between genetic polymorphisms and antihypertensive therapy. Drugs. 2004;64(16):1801-16. Review.

4 Dickerson JE, Hingorani AD, Ashby MJ, Palmer CR, Brown MJ. Optimisation of treatment by crossover rotation of four major classes. Lancet antihypertensive 353(9169), 2008-13 (1999).

5 Arnett DK, Claas SA, Glasser SP. Pharmacogenetics of antihypertensive treatment. Vascul Pharmacol. 2006 Feb;44(2):107-18. Epub 2005 Dec 13. Review.

6 Chobanian AV, Bakris GL, Black HR et al. National Heart, Lung, and Blood Institute Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure; National High Blood Pressure Education Program Coordinating Committee. The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure: the JNC 7 report. JAMA 289(19), 2560-72 (2003).

7.a Bianchi G, Cusi D. Association and linkage analysis of alpha-adducin polymorphism: is the glass half full or half empty? Am J Hypertens. 2000 Jun;13(6 Pt 1):739-43.

7 Cusi, D., Barlassina, C., Azzani, T., Casari, G., Citterio, L., Devoto, M., Glorioso, N., Lanzani, C., Manunta, P., Righetti, M., Rivera, R., Stella, P., Troffa, C., Zagato, L., Bianchi, G., 1997. Polymorphisms of alpha-adducin and salt sensitivity in patients with essential hypertension. Lancet 349 (9062), 1353– 1357.

8 Psaty, B.M., Smith, N.L., Heckbert, S.R., Vos, H.L., Lemaitre, R.N., Reiner, A.P., Siscovick, D.S., Bis, J., Lumley, T., Longstreth Jr., W.T., Rosendaal, F.R., 2002. Diuretic therapy, the alpha-adducin gene variant, and the risk of myocardial infarction or stroke in persons with treated hypertension. JAMA 287 (13), 1680– 1689.

9 Turner, S.T., Chapman, A.B., Schwartz, G.L., Boerwinkle, E., 2003. Effects of endothelial nitric oxide synthase, alpha-adducin, and other candidate gene polymorphisms on blood pressure response to hydrochlorothiazide. Am. J. Hypertens. 16 (10), 834– 849.

10 Sciarrone, M.T., Stella, P., Barlassina, C., Manunta, P., Lanzani, C., Bianchi, G., Cusi, D., 2003. ACE and alpha-adducin polymorphism as markers of individual response to diuretic therapy. Hypertension 41 (3), 398– 403.

11 Frazier, L., Turner, S.T., Schwartz, G.L., Chapman, A.B., Boerwinkle, E., 2004. Multilocus effects of the renin-angiotensin-aldosterone system genes on blood pressure response to a thiazide diuretic. Pharmacogenomics J. 4 (1), 17–23.

12 Schwartz, S.M., Siscovick, D.S., Malinow, M.R., Rosendaal, F.R., Beverly, R.K., Hess, D.L., Psaty, B.M., Longstreth Jr., W.T., Koepsell, T.D., Raghunathan, T.E., Reitsma, P.H., 1997. Myocardial infarction in young women in relation to plasma total homocysteine, folate, and a common variant in the methylenetetrahydrofolate reductase gene. Circulation 96 (2), 412–417.

13 Turner, S.T., Schwartz, G.L., Chapman, A.B., Boerwinkle, E., 2001. C825T polymorphism of the G protein beta(3)-subunit and antihypertensive response to a thiazide diuretic. Hypertension 37 (2 Part 2), 739– 743.

14 Haas, M., Yilmaz, N., Schmidt, A., Neyer, U., Arneitz, K., Stummvoll, H.K., Wallner, M., Auinger, M., Arias, I., Schneider, B., Mayer, G., 1998. Angiotensin-converting enzyme gene polymorphism determines the antiproteinuric and systemic hemodynamic effect of enalapril in patients with proteinuric renal disease. Austrian Study Group of the Effects of Enalapril Treatment in Proteinuric Renal Disease. Kidney Blood Press. Res. 21 (1), 66–69.

15 O'Toole, L., Stewart, M., Padfield, P., Channer, K., 1998. Effect of the insertion/deletion polymorphism of the angiotensin-converting enzyme gene on response to angiotensin-converting enzyme inhibitors in patients with heart failure. J. Cardiovasc. Pharmacol. 32 (6), 988– 994.

16 Stavroulakis, G.A., Makris, T.K., Krespi, P.G., Hatzizacharias, A.N., Gialeraki, A.E., Anastasiadis, G., Triposkiadis, P., Kyriakidis, M., 2000. Predicting response to chronic antihypertensive treatment with fosinopril: the role of angiotensin-converting enzyme gene polymorphism. Cardiovasc. Drugs Ther. 14 (4), 427– 432.

17 Li, X., Du, Y., Huang, X., 2003. Correlation of angiotensin-converting enzyme gene polymorphism with effect of antihypertensive therapy by Angiotensin-converting enzyme inhibitor. J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther. 8 (1), 25–30.

18 Mondorf, U.F., Russ, A., Wiesemann, A., Herrero, M., Oremek, G., Lenz, T., 1998. Contribution of angiotensin I converting enzyme gene polymorphism and angiotensinogen gene polymorphism to blood pressure regulation in essential hypertension. Am. J. Hypertens. 11 (2), 174– 183.

19 Harrap, S.B., Tzourio, C., Cambien, F., Poirier, O., Raoux, S., Chalmers, J., Chapman, N., Colman, S., Leguennec, S., MacMahon, S., Neal, B., Ohkubo, T., Woodward, M., 2003. The ACE gene I/D polymorphism is not associated with the blood pressure and cardiovascular benefits of ACE inhibition. Hypertension 42 (3), 297– 303.

20 Yu, H., Zhang, Y., Liu, G., 2003. Relationship between polymorphism of the angiotensin-converting enzyme gene and the response to angiotensinconverting enzyme inhibition in hypertensive patients. Hypertens. Res. 26 (11), 881– 886.

21 Hingorani, A.D., Jia, H., Stevens, P.A., Hopper, R., Dickerson, J.E., Brown, M.J., 1995. Renin– angiotensin system gene polymorphisms influence blood pressure and the response to angiotensin converting enzyme inhibition. J. Hypertens. 13 (12 Pt 2), 1602–1609.

22 Dudley, C., Keavney, B., Casadei, B., Conway, J., Bird, R., Ratcliffe, P., 1996. Prediction of patient responses to antihypertensive drugs using genetic polymorphisms: investigation of renin-angiotensin system genes. J. Hypertens. 14 (2), 259– 262.

23 Johnson, J.A., Zineh, I., Puckett, B.J., McGorray, S.P., Yarandi, H.N., Pauly, D.F., 2003. Beta 1-adrenergic receptor polymorphisms and antihypertensive response to metoprolol. Clin. Pharmacol. Ther. 74 (1), 44– 52.

24 Liu, J., Liu, Z.Q., Tan, Z.R., Chen, X.P., Wang, L.S., Zhou, G., Zhou, H.H., 2003. Gly389Arg polymorphism of beta1-adrenergic receptor is associated with the cardiovascular response to metoprolol. Clin. Pharmacol. Ther. 74 (4), 372–379.

25 Filigheddu, F., Reid, J.E., Troffa, C., PinnaParpaglia, P., Argiolas, G., Testa, A., Skolnick, M., Glorioso, N., 2004. Genetic polymorphisms of the betaadrenergic system: association with essential hypertension and response to beta-blockade. Pharmacogenomics J. 4 (3), 154–160.

26 Daly MJ, Rioux JD, Schaffner SF, Hudson TJ, Lander ES. High-resolution haplotype structure in the human genome. Nat Genet. 2001 Oct;29(2):229-32.

27 Filigheddu F, Argiolas G, Degortes S, Zaninello R, Frau F, Pitzoi S, Bulla E, Bulla P, Troffa C, Glorioso N. Haplotypes of the adrenergic system predict the blood pressure response to beta-blockers in women with essential hypertension. Pharmacogenomics. 2010 Mar;11(3):319-25

28 Lindholm LH, Ibsen H, Dahlöf B, Devereux RB, Beevers G, de Faire U, Fyhrquist F, Julius S, Kjeldsen SE, Kristiansson K, Lederballe-Pedersen O, Nieminen MS, Omvik P, Oparil S, Wedel H, Aurup P, Edelman J, Snapinn S; LIFE Study Group. Cardiovascular morbidity and mortality in patients with diabetes in the Losartan Intervention For Endpoint reduction in hypertension study (LIFE): a randomised trial against atenolol. Lancet. 2002 Mar 23;359(9311):1004-10.

29 Lithell H, Hansson L, Skoog I, Elmfeldt D, Hofman A, Olofsson B, Trenkwalder P, Zanchetti A; SCOPE Study Group. The Study on Cognition and Prognosis in the Elderly (SCOPE): principal results of a randomized double-blind intervention trial. J Hypertens. 2003 May;21(5):875-86.

30 Schrader J, Kulschewski A, Dendorfer A .Inhibition of the renin-angiotensin system and the prevention of stroke. Am J Cardiovasc Drugs. 2007;7(1):25-37.

31 Thomas MC, Atkins RC. Blood pressure lowering for the prevention and treatment of diabetic kidney disease. Drugs. 2006;66(17):2213-34. Review.

32 Pitt B, Poole-Wilson PA, Segal R, Martinez FA, Dickstein K, Camm AJ, Konstam MA, Riegger G, Klinger GH, Neaton J, Sharma D, Thiyagarajan B. Effect of losartan compared with captopril on mortality in patients with symptomatic heart failure: randomised trial--the Losartan Heart Failure Survival Study ELITE II. Lancet. 2000 May 6;355(9215):1582-7.

33 Cohn JN, Tognoni G; Valsartan Heart Failure Trial Investigators. A randomized trial of the angiotensin-receptor blocker valsartan in chronic heart failure. N Engl J Med. 2001 Dec 6; 345(23): 1667-75.

34 Glorioso N, Argiolas G, Filigheddu F, Troffa C, Cocco F, Bulla E, Bulla P, Zaninello R, Degortes S, Pitzoi S, Frau F, Fadda S, Pinna Parpaglia P, Bernini G, Bardini M, Fallo F, Malatino L, Regolisti G, Ferri C, Cusi D, Sciacqua A, Perticone F, Degli Esposti E, Baraccani C, Parati G, Veglio F, Mulatero P, Williams TA, Macciardi F, Stancanelli B; Study Group on Cardiovascular Pharmacogenomics of Italian Society of Hypertension. Conceptual basis and methodology of the SOPHIA study. Pharmacogenomics. 2007 Nov;8(11):1497-509.

35 European Society of Hypertension-European Society of Cardiology Guidelines Committee. 2003 European Society of Hypertension-European Society of Cardiology guidelines for the management of arterial hypertension. J Hypertens 21(6), 1011-53 (2003).

36 Williams TA, Mulatero P, Filigheddu F, et al. Role of HSD11B2 polymorphisms in essential hypertension and the diuretic response to thiazides. Kidney Int 67(2), 631-7 (2005).

37 Turner ST, Boerwinkle E, O'Connell JR, et al. Genomic Association Analysis of Common Variants Influencing Antihypertensive Response to hydrochlorothiazide. Hypertension Jun 10 (2013).

38 Lanzani C, Citterio L, Glorioso N et al. Adducin- and ouabain-related gene variants predict the antihypertensive activity of rostafuroxin, part 2: clinical studies. Sci Transl Med 2(59), 59ra87 (2010).

39 Turner ST, Bailey KR, Schwartz GL, Chapman AB, Chai HS, Boerwinkle E. Genomic association analysis identifies multiple loci influencing antihypertensive response to an angiotensin II receptor blocker. Hypertension 59(6), 1204-11 (2012).

40 Hiltunen TP, Suonsyrjä T, Hannila-Handelberg T et al. Predictors of antihypertensive drug responses: initial data from a placebo-controlled, randomized, cross-over study with four antihypertensive drugs (The GENRES Study). Am J Hypertens 20(3), 311-8 (2007).

41 Salvi E, Kutalik Z, Glorioso N, Benaglio P, Frau F, Kuznetsova T, Arima H, Hoggart C, Tichet J, Nikitin YP, Conti C, Seidlerova J, Tikhonoff V, Stolarz-Skrzypek K, Johnson T, Devos N, Zagato L, Guarrera S, Zaninello R, Calabria A, Stancanelli B, Troffa C, Thijs L, Rizzi F, Simonova G, Lupoli S, Argiolas G, Braga D, D'Alessio MC, Ortu MF, Ricceri F, Mercurio M, Descombes P, Marconi M, Chalmers J, Harrap S, Filipovsky J, Bochud M, Iacoviello L, Ellis J, Stanton AV, Laan M, Padmanabhan S, Dominiczak AF, Samani NJ, Melander O, Jeunemaitre X, Manunta P, Shabo A, Vineis P, Cappuccio FP, Caulfield MJ,

Matullo G, Rivolta C, Munroe PB, Barlassina C, Staessen JA, Beckmann JS, Cusi D. Genomewide association study using a high-density single nucleotide polymorphism array and case-control design identifies a novel essential hypertension susceptibility locus in the promoter region of endothelial NO synthase. Hypertension. 2012 Feb;59(2):248-55.

42 Li Y, Willer CJ, Ding J, Scheet P, Abecasis GR. MaCH: using sequence and genotype data to estimate haplotypes and unobserved genotypes. Genet Epidemiol 34(8), 816-34 (2010).

43 Anderson CA, Pettersson FH, Clarke GM, Cardon LR, Morris AP, Zondervan KT. Data quality control in genetic case-control association studies. *Nat Protoc* 5(9), 1564-73 (2010).

44 Purcell S, Neale B, Todd-Brown K, Thomas L, Ferreira MA, Bender D, Maller J, Sklar P, de Bakker PI, Daly MJ, Sham PC. PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. Am J Hum Genet 81(3), 559-75 (2007).

45 Price AL, Patterson NJ, Plenge RM, Weinblatt ME, Shadick NA, Reich D. Principal components analysis corrects for stratification in genome-wide association studies. Nat Genet 38(8), 904-9 (2006).

46 Patterson N, Price AL, Reich D: Population structure and eigenanalysis. PLoS Genet 2, 2074-2093 (2006).

47 Hattangady NG, Olala LO, Bollag WB, Rainey WE. Acute and chronic regulation of aldosterone production. Mol Cell Endocrinol 350, 151-62 (2012).

48 Condon JC, Pezzi V, Drummond BM, Yin S, Rainey WE. Calmodulin-dependent kinase I regulates adrenal cell expression of aldosterone synthase. Endocrinology 143(9), 3651-7 (2002).

49 Spät A, Hunyady L. Control of aldosterone secretion: a model for convergence in cellular signaling pathways. Physiol Rev 84, 489-539 (2004).

50 Sakagami H, Kamata A, Nishimura H et al. Prominent expression and activity-dependent nuclear translocation of Ca2+/calmodulin-dependent protein kinase Idelta in hippocampal neurons. Eur J Neurosci 22(11), 2697-707 (2005).

51 Mulatero P, Monticone S, Rainey WE, Veglio F, Williams TA. Role of KCNJ5 in familial and sporadic primary aldosteronism. Nat Rev Endocrinol 9, 104-12 (2013).

52 Beuschlein F, Boulkroun S, Osswald A et al. Somatic mutations in ATP1A1 and ATP2B3 lead to aldosterone-producing adenomas and secondary hypertension. Nat Genet 45, 440-4 (2013).

53 Vasan RS, Evans JC, Larson MG et al. Serum aldosterone and the incidence of hypertension in nonhypertensive persons. N Engl J Med 351(1), 33-41 (2004).

54 Medical Research Council Working Party on Mild Hypertension. Course of blood pressure in mild hypertensives after withdrawal of long term antihypertensive treatment: Medical Research Council Working Party on Mild Hypertension. Br Med J 11, 988-92 (1986).

55 Filigheddu F, Troffa C, Glorioso N. Pharmacogenomics of essential hypertension: are we going the right way?. Cardiovasc Hematol Agents Med Chem 4(1), 7-15 (2006).

56 Kurland L, Melhus H, Karlsson J et al. Angiotensin converting enzyme gene polymorphism predicts blood pressure response to angiotensin II receptor type 1 antagonist treatment in hypertensive patients. J Hypertens 19(10), 1783-7 (2001).

57 Nordestgaard BG, Kontula K, Benn M et al. Effect of ACE insertion/deletion and 12 other polymorphisms on clinical outcomes and response to treatment in the LIFE study. Pharmacogenet Genomics 20(2), 77-85 (2010).

58 Suonsyrjä T, Hannila-Handelberg T, Fodstad H, Donner K, Kontula K, Hiltunen TP. Renin-angiotensin system and alpha-adducin gene polymorphisms and their relation to responses to antihypertensive drugs: results from the GENRES study. Am J Hypertens 22(2), 169-75 (2009).

59 Ortlepp JR, Hanrath P, Mevissen V, Kiel G, Borggrefe M, Hoffmann R. Variants of the CYP11B2 gene predict response to therapy with candesartan. Eur J Pharmacol 445(1-2), 151-2 (2002).

60 Donner KM, Hiltunen TP, Hannila-Handelberg T, Suonsyrj ä T, Kontula K. STK39 variation predicts ambulatory blood pressure response to losartan in hypertensive men. Hypertension Res 35, 107 (2012).

61 Frau F, Citterio L, Ortu MF, Zaninello R. Genomic association analysis identifies multiple loci influencing antihypertensive response to an angiotensin II receptor blocker. Hypertension 61, e5 (2013).

62 Kamide K, Asayama K, Katsuya T et al. Genome-wide response to antihypertensive medication using home blood pressure measurements: a pilot study nested within the HOMED-BP study. Pharmacogenomics 14, 1709-21 (2013).