



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SASSARI

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE BIOMEDICHE

Direttore della Scuola: Prof. Andrea Fausto Piana

INDIRIZZO IN FISIOPATOLOGIA MEDICA

XXVII CICLO

“Genetic variants involved in Blood Pressure response to hydrochlorothiazide identified by GWAS methodology.”

Direttore:

Prof. Andrea Fausto Piana

Tutor:

Prof. Nicola Glorioso

Tesi di dottorato di:

Dr.ssa Daniela Antonella Piras

Anno Accademico 2014 - 2015

La presente tesi è stata prodotta nell'ambito della Scuola di Dottorato in Scienze Biomediche dell'Università degli Studi di Sassari, a.a. 2014/2015 – XXVII ciclo, con il supporto di una borsa di studio finanziata con le risorse del P.O.R. SARDEGNA F.S.E. 2007-2013 - Obiettivo competitività regionale e occupazione, Asse IV Capitale umano, Linea di Attività I.3.1.

Sommario

ABSTRACT.....	3
Sommario delle attività svolte durante il triennio della Scuola di Dottorato in Scienze Biomediche: temi di ricerca sviluppati, risultati scientifici e stato delle pubblicazioni.....	4
1. INTRODUZIONE.....	9
1.1 Cosa è l'ipertensione.....	9
1.2 Terapia non farmacologica.....	10
1.3 Vari categorie di farmaci antiipertensivi.....	12
1.3.1 Beta-Bloccanti.....	13
1.3.2 α -bloccanti.....	14
1.3.3 ACE-inibitori (ACEi).....	14
1.3.4 Bloccanti del recettore dell'angiotensina II (ARB): "Sartani".....	15
1.3.5 Calcio-antagonisti.....	16
1.3.6 Antagonisti recettoriali dei mineralcorticoidi.....	16
1.3.7 Diuretici.....	17
1.3.7.1 Diuretici tiazidici.....	18
1.4 Farmacogenomica.....	19
1.4.1 Farmacogenomica dell'ipertensione.....	21
2. OBIETTIVO DELLO STUDIO HCTZ.....	22
3. MATERIALI E METODI.....	24
3.1 Protocollo di studio della coorte di Sassari (PHSS).....	24
3.2 Protocollo di studio della coorte di Milano.....	26
3.3 Campione losartan.....	27
3.4 Coorti di replica.....	28
3.4.1 Studio GENRES.....	28
3.4.2 Studio GERA1.....	29
3.4.3 Studio NORDIL.....	29
3.4.4 Studio PEAR.....	31
3.4.5 Studio CSN-StayOnDiur.....	32
3.5 Genotipizzazione e imputazione.....	33
3.6 Analisi statistica.....	34
4. RISULTATI.....	37
5. DISCUSSIONE.....	40
6. CONCLUSIONI.....	44
7. TABELLE.....	45
8. FIGURE.....	72
9. BIBLIOGRAFIA.....	80
RINGRAZIAMENTI.....	86

ABSTRACT

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

Aim:

To identify new loci regulating blood pressure response to thiazide diuretics (HCTZ) with a genome wide association analysis, thus optimizing therapeutic advantages and minimizing side effects.

Methods:

Treatment started after a 8 week run-in period under standardized dietary regimen to qualify patients as “essential hypertensives”. Never treated mild-to-moderate hypertensive patients were studied in two Italian cohorts: n=343 patients in Sardinia and 142 in Milano. A genome-wide association study and imputation were performed: variants associated with blood pressure response to HCTZ over an 8-weeks follow up period were analysed. The specificity of our findings was confirmed in an independent cohort of never treated essential hypertensives treated with Losartan.

Results:

We identified 141 SNPs and 130 SNPs showing a significant association with for Δ SBP8 for Δ DBP8 (p-value $\leq 10^{-5}$). Six SNPs showed the best association with Δ SBP8 and five SNPs with Δ DBP8, respectively. TET2 and CSMD1 gene variants showed the best effect on Δ SBP after 8 weeks of HCTZ treatment. No association was found in Losartan sample. We looked for replication in other studies (GENRES, GERA1, NORDIL, PEAR and CSN-StayOnDiur).

Conclusions:

TET2 and CSMD1 affect SBP response to HCTZ. TET2, may affect the transcription of α ENaC gene thus acting as an aldosterone-responsive mediator. CSMD1 gene was associated with increased risk of hypertension: its putative role in BP regulation remains to be clarified.

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 articolato principalmente su quattro argomenti:

- 1) Studio SOPHIA - farmacogenomica del losartan: pubblicato su *Pharmacogenomics*, 2014);
- 2) Analisi funzionale del polimorfismo 12 T inserzione/delezione nel promotore di ATP1A1 che conferisce una diminuita suscettibilità all'ipertensione in una popolazione di maschi sardi (pubblicato su *PLoS One*, 2015);
- 3) Farmacogenomica dei beta-bloccanti (manoscritto in preparazione);
- 4) Analisi delle determinanti geniche della massa cardiaca nell'ipertensione arteriosa essenziale (manoscritto in preparazione);
- 5) Farmacogenomica dell'idroclorotiazide: identificazione dei geni TET2 e CSMD1 che influenzano la risposta della pressione arteriosa sistolica all'idroclorotiazide nei pazienti ipertesi essenziali mai trattati (pubblicato su *Journal of Hypertension*, 2015);

In particolare:

1) Studio SOPHIA.

Lo studio SOPHIA aveva lo scopo di identificare, attraverso l'individuazione di SNPs (polimorfismi a singolo nucleotide), i geni che controllano la risposta pressoria al losartan usando un approccio genome-wide. Sono stati arruolati 722 pazienti 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 sei 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. Dopo un periodo di run-in di otto settimane, i pazienti sono stati trattati con 50 mg/day di losartan per 4 settimane. Abbiamo identificato 131 SNPs con $P \leq 10^{-5}$ usando un'analisi di regressione lineare con ΔSBP_4 (variazione della pressione arteriosa sistolica dopo 4 settimane di trattamento) come variabile dipendente. Inoltre 121 SNPs di questi 131 SNPs sono anche associati con ΔDBP_4 (variazione della pressione arteriosa diastolica dopo 4 settimane di trattamento). La specificità degli SNPs è stata verificata utilizzando un campione indipendente trattato con HCTZ (idroclorotiazide). 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, utilizzata come coorte di replica. CAMK1D codifica per una proteina chinasi 1D (CaMK-I) Calcio/Calmodulina dipendente. CaMK-I è espresso 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 CREB47.

Relativamente a questo lavoro sono coautrice del manoscritto pubblicato su Pharmacogenomics nel novembre 2014 dal titolo: *Genome-Wide Association Study identifies CAMK1D variants involved in Blood Pressure response to losartan: the SOPHIA study* (Pharmacogenomics. 2014 Sep;15(13):1643-1652).

2) Analisi funzionale del polimorfismo 12 T inserzione/delezione nel promotore di ATP1A1 che conferisce una diminuita suscettibilità all'ipertensione in una popolazione di maschi sardi.

Abbiamo collaborato con il gruppo di ricerca del professor Nelson Ruiz-Opazo (Boston University School of Medicine, Boston, MA, USA) riguardo l'analisi del gene ATP1A1 nell'ipertensione arteriosa essenziale.

ATP1A1 codifica per la subunità $\alpha 1$ della NaK-ATPasi (pompa del sodio situata nell'endotelio vascolare e nelle cellule epiteliali del tubulo renale): quest'ultima regola il gradiente salino su cui vanno poi ad agire gli altri trasportatori transmembrana del Na. Precedentemente, il nostro gruppo di ricerca aveva già evidenziato come mutazioni geniche di proteine del citoscheletro cellulare modulano sia la velocità di funzionamento della NaK-ATPasi sia il ciclo di endocitosi-esocitosi che regola sia il numero sia la persistenza delle unità di NaK-ATPasi sulla membrana cellulare. Il manoscritto trattante 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 pubblicato su PLoS One, 2015 Jan 23;10(1): e0116724. Il sequenziamento del DNA ha evidenziato un polimorfismo di inserzione/delezione lungo 12 timine nella regione regolatrice del gene ATP1A1 associata nei maschi sardi ad una diminuzione della pressione sistolica di 12,1 mmHg e di quella diastolica di 6,6 mmHg. La variazione genica da noi evidenziata conferirebbe quindi una minore suscettibilità – o maggior resistenza – allo sviluppo dell'ipertensione arteriosa nei maschi adulti.

3) Farmacogenomica dei beta-bloccanti.

L'atenololo è ampiamente utilizzato nel controllo dell'ipertensione arteriosa, dato che fornisce un'importante protezione dai danni cardiovascolari, cerebrali e renali che accompagnano la malattia. L'obiettivo del nostro studio è quello di cercare varianti geniche associate alla risposta della pressione arteriosa ai beta bloccanti in pazienti con ipertensione essenziale trattati con 50 mg di atenololo al giorno per 4 settimane. Sono stati arruolati 435 pazienti e di questi è stato estratto il DNA con procedure standard. Sono stati genotipizzati 82 pazienti utilizzando l'Illumina Human1M-Duo array (Illumina Inc, San Diego, CA, USA) mentre per 353 pazienti è stato utilizzato l'array Illumina Human OmniExpress. Una volta che sono stati sottoposti al controllo di qualità, seguendo il protocollo di Anderson CA et al., il campione era costituito da 403 pazienti (189 maschi e 214 femmine). Abbiamo effettuato le analisi di associazione, ed abbiamo eliminato gli SNPs che

mappano in regioni deserte o in linkage disequilibrium: abbiamo identificato 6 SNPs associati con Δ SBP4, 8 SNPs con Δ DBP8 e 6 SNPs associati con Δ HR4.

E' prevista anche una validazione in coorti di replica indipendenti.

La raccolta dei dati e l'analisi statistica è stata completata e si sta procedendo alla stesura del lavoro scientifico da inviare ad un giornale scientifico internazionale ad alto fattore di impatto.

4) Analisi delle determinanti geniche della massa cardiaca nell'ipertensione arteriosa essenziale.

Diversi studi hanno evidenziato che la massa ventricolare sinistra è influenzata da fattori genetici. Sono stati condotti diversi studi di associazione Genome-wide (GWA), che studi di linkage (GWLS) su diverse popolazioni per identificare i geni che influiscono sulla massa ventricolare sinistra, ma gran parte di ciò che riguarda l'ereditarietà rimane ad oggi ancora sconosciuto.

Abbiamo effettuato un'analisi di associazione genome-wide (GWA) in una coorte italiana di soggetti ipertesi mai trattati con ipertensione essenziale lieve-moderata, per ricercare varianti genetiche predittive del tratto fenotipico della massa ventricolare sinistra. Sono stati reclutati 1040 pazienti recentemente diagnosticati per ipertensione essenziale, mai trattati farmacologicamente.

Dopo aver effettuato un'analisi di regressione lineare abbiamo identificato 85 SNPs con un p-value $<10^{-5}$. In particolare, alcuni geni nei quali mappavano i nostri migliori SNPs, sono stati precedentemente descritti come aventi un ruolo nella patogenesi della cardiopatia ipertrofica, come, ad esempio, ROCK1, IGF1, CACNA1D, FGFR1, TRAF5, SOX5 e KSR2. La raccolta dei dati e l'analisi statistica è stata completata e si sta procedendo alla stesura del lavoro scientifico da inviare ad un giornale scientifico internazionale ad alto fattore di impatto.

5) Farmacogenomica dell'idroclorotiazide: identificazione dei geni TET2 e CSMD1 che influenzano la risposta della pressione arteriosa sistolica all'idroclorotiazide nei pazienti ipertesi essenziali mai trattati.

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. Tale studio è oggetto della mia tesi di Dottorato.

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 stato pubblicato su Journal of Hypertension, 2015 Jun;33(6):1301-9.

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.

1. INTRODUZIONE

1.1 Cosa è l'ipertensione

Per ipertensione arteriosa si intende una condizione clinica morbosa caratterizzata da un aumento anomalo stabile, e non legato a normali variazioni fisiologiche, dei livelli di pressione arteriosa. Tale aumento riguarda più frequentemente sia la pressione sistolica, sia la pressione diastolica, ma esistono forme di ipertensione caratterizzate da un aumento solo della pressione sistolica (ipertensione sistolica isolata), condizione più frequente negli anziani, o più raramente solo della diastolica [1].

L'ipertensione è definita da un valore di pressione arteriosa sistolica ≥ 140 mmHg e pressione arteriosa diastolica ≥ 90 mmHg. A seconda dei valori di pressione sistolica e diastolica esistono varie categorie di ipertensione (tabella 1) [2].

Category	Systolic		Diastolic
Optimal	<120	and	<80
Normal	120–129	and/or	80–84
High normal	130–139	and/or	85–89
Grade 1 hypertension	140–159	and/or	90–99
Grade 2 hypertension	160–179	and/or	100–109
Grade 3 hypertension	≥ 180	and/or	≥ 110
Isolated systolic hypertension	≥ 140	and	<90

Tabella 1 Classificazione della pressione arteriosa

L'ipertensione arteriosa è una condizione clinica che colpisce il 20-30% della popolazione adulta dei paesi più sviluppati e costituisce uno dei principali fattori di rischio per malattie cardiovascolari e renali. L'ipertensione è considerata una malattia multifattoriale influenzata sia da fattori genetici che ambientali che interagiscono fra loro [3 e 4]. A tutt'oggi ci sono ancora poche conoscenze sulle componenti genetiche specifiche e sulle loro interazioni che contribuiscono al fenotipo finale.

La pressione arteriosa è un tratto quantitativo che mostra variazioni continue. La causa dell'incrementata pressione è sconosciuta nel 95% dei casi e viene definita ipertensione essenziale (o primaria). Per il rimanente 5%, dove le cause che contribuiscono all'ipertensione sono state identificate, come malattie renali acute o croniche, malattie della tiroide ecc., si parla di ipertensione secondaria [5].

Studi randomizzati sulla terapia antipertensiva non mostrano differenze clinicamente rilevanti tra le classi di farmaci, per quanto riguarda la capacità di abbassare la pressione sanguigna (BP), in modo che la scelta del "giusto farmaco nel singolo paziente" rimane sostanzialmente empirica [2].

Per questo motivo va aumentando sempre più il consenso sulla necessità di valutare l'impatto clinico delle varianti geniche per quanto riguarda la risposta dei farmaci antipertensivi. Varianti geniche che influenzano la pressione sanguigna sono destinati a svolgere un ruolo importante nella risposta BP dei farmaci antipertensivi [6].

1.2 Terapia non farmacologica.

L'approccio non farmacologico, consiste nell'introdurre modificazioni realistiche e sostenibili nello stile di vita. L'adozione di un salutare stile di vita è essenziale per la prevenzione dell'ipertensione arteriosa ed è parte indispensabile del suo trattamento.

Queste modifiche prevedono:

- Cambiamenti delle abitudini alimentari;
- Riduzione del peso corporeo (se necessario);
- Esercizio fisico regolare;
- Abolizione del fumo;
- Riduzione del consumo di alcolici, se è eccessivo;
- Controllo dello stress.

Cambiamenti delle abitudini alimentari.

Fondamentale per diminuire la pressione arteriosa è il cambiamento di alcune abitudini alimentari.

Le principali sono:

- Riduzione dell'apporto di sodio nell'alimentazione;
- Incremento di apporto alimentare di frutta e verdura;
- Riduzione dei grassi totali alimentari.

DIETA DASH: è l'acronimo di Dietary Approaches to Stop Hypertension, una particolare strategia alimentare appositamente studiata per la cura dell'ipertensione [7]. I punti cardine di questa dieta sono diversi e comprendono l'assunzione di pasti ricchi di frutta, verdura e potassio, poveri di grassi saturi e colesterolo [8].

E' consigliabile una dieta con ridotto apporto di colesterolo e di grassi saturi perché questa restrizione riduce la frequenza di complicanze di tipo arteriosclerotico. L'introito giornaliero di sodio dovrebbe essere ridotto a 2,4 g al giorno [9].

Riduzione del peso corporeo.

A tutti gli ipertesi sovrappeso deve essere consigliata una riduzione dell'apporto calorico [9]. La perdita di peso di circa 4,5 Kg riduce e previene l'ipertensione arteriosa in un gran numero di pazienti sovrappeso, sebbene l'ideale sarebbe essere normopeso (BMI compreso tra 18.5-24,99) [10].

Esercizio fisico.

E' consigliato fare attività fisica aerobica che dovrebbe essere svolta più volte alla settimana, nei limiti imposti dalle condizioni cardiovascolari dei singoli soggetti. L'esercizio è utile non solo per

controllare il peso, ma anche perché l'allenamento determina di per sé una riduzione della pressione arteriosa [11].

Assunzione di alcol.

E' opportuno limitare l'assunzione di alcol a non più di 30 ml di etanolo al giorno per gli uomini e 15 ml per le donne e per gli individui a basso peso corporeo [12].

Evitare il fumo e le droghe.

L'elemento più importante, dal punto di vista preventivo, è quello di convincere i fumatori a smettere. Mentre gli ipertesi dovrebbero smettere di fumare al fine di ridurre il rischio cardiovascolare [9].

Controllo dello stress.

Anche se di solito è impossibile eliminare tutti gli stress endogeni ed esogeni, è tuttavia necessario che i pazienti affetti da ipertensione arteriosa essenziale imparino a dominare per lo meno parzialmente gli stress emotivi. Qualunque emozione, infatti, altera i parametri vitali: l'incremento della pressione arteriosa derivante da stress emotivo, e quindi per definizione transitorio, non permette di porre la diagnosi di "ipertensione arteriosa essenziale" che, quindi, sarebbe formulata erroneamente con la conseguenza della prescrizione di terapie farmacologiche inappropriate.

1.3 Vari categorie di farmaci antiipertensivi

Le principali classi di farmaci antiipertensivi sono:

- 1) beta-bloccanti;
- 2) α -bloccanti;
- 3) ACE-inibitori (ACEi);

- 4) Antagonisti recettoriali dell'angiotensina, (o sartani che bloccano l'angiotensina II (ARB));
- 5) Calcio antagonisti;
- 6) Diuretici;
- 7) Antagonisti recettoriali dei mineralcorticoidi.

1.3.1 Beta-Bloccanti

I beta-bloccanti determinano il blocco del rilascio di renina mediato dall'innervazione adrenergica a livello delle cellule renali iuxtaglomerulari e questa azione può essere molto importante per quanto riguarda la riduzione della pressione arteriosa. I beta-bloccanti sono una classe di farmaci capaci di legarsi ai recettori β -adrenergici (che mediano alcuni degli effetti della noradrenalina e dell'adrenalina), bloccandoli [13].

I recettori β_1 sono situati soprattutto nel cuore e nei reni, mentre i recettori β_2 nella muscolatura liscia dei bronchi. I beta-bloccanti si suddividono in non selettivi, che bloccano indifferentemente i recettori sia β_1 sia β_2 (per es., propranololo, nadololo, timololo), bloccanti selettivi del recettore β_1 (per es., atenololo, metoprololo, esmololo) e bloccanti del recettore β_2 (non utilizzati in terapia).

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.

1.3.2 α -bloccanti

Questi farmaci non vengono utilizzati come prima scelta terapeutica perché il loro impiego si è ridotto dopo la scoperta di una loro associazione con un incremento degli eventi cardio vascolari, soprattutto scompenso di cuore. Tuttavia sono utili come terapia aggiuntiva per i pazienti con ipertensione resistente e per quelli che richiedono una terapia antipertensiva multifarmacologica. La fentolamina e la fenossibenzamina bloccano l'azione della noradrenalina a livello dei recettori α -adrenergici. Essi bloccano i recettori sia pre- α_2 che post α_1 e la prima azione è responsabile dello sviluppo del fenomeno della tolleranza. La prazosina, la terazosina e la doxazosina sono più efficaci in quanto bloccano selettivamente i recettori a postsinaptici (α_1).

Rimanendo attiva l'azione presinaptica, si ha soppressione della noradrenalina e solo di rado si instaura tolleranza. Questi tre farmaci possono determinare una marcata ipotensione da prima dose [14].

1.3.3 ACE-inibitori (ACEi)

Gli ACE-inibitori sono farmaci che inibiscono l'enzima ACE (enzima di conversione dell'angiotensina I) impedendo così la conversione dell'angiotensina I in angiotensina II nel plasma e nei tessuti.

Gli ACE-inibitori sono utili non solo perché inibiscono la produzione di un potente vasocostrittore (l'angiotensina II), ma perché rallentano la degradazione di un potente vasodilatatore (la bradichinina); alterano inoltre la biosintesi delle prostaglandine e possono modificare la reattività del sistema nervoso adrenergico.

L'enzima ACE 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.

1.3.4 Bloccanti del recettore dell'angiotensina II (ARB): “Sartani”

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.

I Sartani (o sartanici) inibiscono competitivamente il legame dell'angiotensina II al recettore AT1. L'angiotensina II è un peptide multifunzionale ad azione vasocostrittrice, tra i principali responsabili della regolazione della pressione arteriosa [13]. Appartengono a questa classe di farmaci il losartan, il valsartan, il candesartan, l'irbesartan, l'eprosartan, il telmisartan.

L'utilità, l'efficacia e la tollerabilità degli antagonisti recettoriali dell'angiotensina sono simili a quelli degli ACE-inibitori, ma essi sembrano provocare minori effetti collaterali come la tosse eccessiva o l'angioedema.

1.3.5 Calcio-antagonisti

Il calcio è necessario per la contrazione del cuore e dei vasi sanguigni. Per poter dare inizio ai processi che portano alla contrazione, il calcio deve entrare all'interno delle cellule.

I Calcio-antagonisti sono farmaci in grado di interferire con il passaggio del calcio attraverso le membrane cellulari, inibendo così il meccanismo di contrazione delle cellule muscolari cardiache e delle fibre muscolari lisce.

Come risultato, i vasi sanguigni si rilasciano e quindi la pressione diminuisce; migliora anche l'ossigenazione e si riduce il carico di lavoro del cuore.

I Calcio-antagonisti sono anche utili nel trattamento dell'angina pectoris grazie al loro effetto isotropo negativo, mentre vanno somministrati con precauzione ai pazienti ipertesi con insufficienza cardiaca. Appartengono a questa classe di farmaci: la nifedipina, il verapamil, il diltiazem, la nimodipina.

1.3.6 Antagonisti recettoriali dei mineralcorticoidi

Oltre i classici effetti ormonali sul rene, con ritenzione sodica ed escrezione di potassio, l'aldosterone, come ormone paracrino, è in grado di agire localmente non solo sul rene, ma anche a livello del cuore e dei vasi sanguigni, contribuendo alla fibrosi e all'incremento di massa miocardica. Gli antagonisti dell'aldosterone sono composti in grado di opporsi a questi effetti deleteri dell'aldosterone, compresi quelli non limitati all'ipertensione. Lo spironolattone causa perdita renale di sodio bloccando l'effetto dei mineralcorticoidi ed è stato inizialmente impiegato nei soggetti ipertesi che presentavano elevati livelli di mineralcorticoidi, come per esempio i pazienti con aldosteronismo primario e secondario. Sia gli ACE-inibitori che gli antagonisti recettoriali dell'angiotensina II possono aumentare significativamente i livelli sierici di potassio nei

pazienti con insufficienza renale; è pertanto necessario, in questi pazienti, un attento monitoraggio della potassiemia nei pazienti con compromissione della funzione renale.

1.3.7 Diuretici

I diuretici sono i farmaci più impiegati e meglio conosciuti: il loro effetto iniziale è correlato alla deplezione del sodio e alla riduzione del volume, mentre quello a lungo termine si eserciterebbe attraverso una riduzione delle resistenze vascolari periferiche.

In generale sono efficaci in 3-4 giorni e numerosi studi ne hanno dimostrato l'efficacia nel ridurre la mortalità e la morbilità a lungo termine.

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. Le diverse classi farmacologiche agiscono su diversi siti d'azione: 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 ritiene che i diuretici riducano la sensibilità dei vasi sanguigni alle catecolamine riducendo quindi le resistenze vascolari periferiche [13]; in realtà il meccanismo per il quale questi farmaci abbassano la pressione nel lungo termine è ancora in larga parte sconosciuto. Per esempio la "furosemide", potente diuretico attivo sull'ansa di Henle, ha un notevole effetto sul volume plasmatico, ma nulli o trascurabili effetti sulla pressione arteriosa: ne fa confermare la raccomandazione del loro uso nello schema terapeutico dello "scompenso cardiaco cronico" condizione in larga misura caratterizzata da pressione arteriosa sistemica normale o bassa. Esistono vari tipi di diuretici, il farmaco utilizzato nel nostro studio è l'idroclorotiazide che è un diuretico tiazidico.

1.3.7.1 Diuretici tiazidici

I diuretici tiazidici rappresentano una delle scelte terapeutiche di prima opzione nell'ipertensione arteriosa essenziale, in quanto sono efficaci, relativamente sicuri e sostanzialmente ben tollerati per il trattamento dell'ipertensione [9].

D'altronde, il meccanismo per spiegare gli effetti antiipertensivi ben documentati dei tiazidi non è pienamente compreso.

Il bersaglio noto dei diuretici tiazidici è il trasporto Na-K-Cl nel tubulo distale del nefrone, dove riducono il riassorbimento del sodio dai tubuli renali, con conseguente aumento dell'escrezione dell'acqua e degli elettroliti, come sodio, potassio, cloruro e magnesio.

Inoltre i diuretici tiazidici riducono la resistenza periferica arteriosa mediante l'attivazione dei canali del potassio attivati dal calcio e inibendo varie anidrasi carboniche nel tessuto vascolare causando vasodilatazione [15].

E' importante valutare l'impatto clinico delle varianti geniche per quanto riguarda la risposta dei farmaci antipertensivi [16].

Varianti geniche che influenzano la pressione sanguigna sono destinate a svolgere un ruolo importante nella risposta pressoria ai farmaci antipertensivi. Abbiamo già suggerito il ruolo di alcuni geni candidati nella risposta all'idroclorotiazide (HCTZ) [17, 18, 19, 20, 21], ma una gran parte delle variazioni BP in risposta al trattamento è ancora poco conosciuta.

L'obiettivo dello studio era di identificare, attraverso l'individuazione di SNPs, i geni che controllano la risposta pressoria all'idroclorotiazide usando un approccio genome-wide.

1.4 Farmacogenomica.

È esperienza comune che gli effetti dei diversi farmaci non sono della medesima portata nella totalità dei soggetti. Dopo la somministrazione di un farmaco anche a dosi piene o elevate, si può riscontrare l'assenza di un beneficio terapeutico, così come la comparsa di una risposta da ipersensibilità, dovute a differenze individuali di natura genetica [22].

Nel 1959 Friedrich Vogel ha coniato il termine "Farmacogenetica". La farmacogenetica 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 [23]. Recentemente è stato introdotto il termine farmacogenomica, un termine più ampio che comprende tutti i geni in un genoma in grado di determinare una variazione nella risposta al farmaco.

Lo scopo fondamentale della farmacogenomica è quello di individuare quali sostanze terapeutiche siano più adatte in base alle precise caratteristiche genetiche del soggetto in esame, in modo da ottenere la massima proprietà curativa e prevenire nei limiti del possibile, l'eventuale insorgenza di effetti indesiderati che si potrebbero sviluppare una volta venuti a contatto con il farmaco: non più una terapia standard, ma un intervento terapeutico personalizzato differente da caso a caso.

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. Inizialmente la farmacogenomica si occupava della farmacocinetica, mentre in seguito ha riguardato le basi genetiche della farmacodinamica [13].

Gli studi classici sui geni, erano basati sulla metodica “per geni candidati”. Il gene candidato è un gene che si ipotizza sia responsabile dello sviluppo di una determinata patologia. Nel corso degli ultimi anni si è cambiato tipo di approccio utilizzando gli studi di associazione Genome-Wide, (GWAs).

Questo è stato possibile grazie alla disponibilità della sequenza completa del genoma umano, al progetto 1000 Genomi e al progetto HapMap ed all'utilizzo di nuove tecnologie, come la piattaforma Illumina, che è in grado di testare contemporaneamente centinaia di migliaia di varianti geniche (sino ad un milione di polimorfismi a singolo nucleotide, SNP) in migliaia di individui a costi accessibili, attraverso l'utilizzo di Chip-array.

Con questa metodica si possono effettuare anche studi caso controllo. L'obiettivo che gli studi caso controllo si propongono è quello di effettuare una classificazione tra campioni di soggetti che si dividono in controlli (soggetti sani) e casi (soggetti affetti da una specifica patologia che ha base genica) sulla base delle differenze di frequenza allelica con cui gli SNPs si presentano nei due gruppi.

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, recentemente descritte per tutto il genoma, sono definite come segmenti di DNA di almeno 1kb che mostrano 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 grandi database 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 mediante semplici software disponibili online (per es. Haploview).

1.4.1 Farmacogenomica dell'ipertensione

Per quanto riguarda l'ipertensione arteriosa essenziale sono stati fatti molti studi, in questi ultimi 30 anni, ma a tutt'oggi ci sono ancora poche conoscenze sulle componenti genetiche specifiche e sulle loro interazioni che contribuiscono al fenotipo finale. Per cui la scelta dell'antipertensivo da usare nel singolo paziente è tutt'ora fatta su basi empiriche non essendo disponibile alcun indicatore né clinico, né laboratoristico, né strumentale sull'efficacia di una determinata molecola in un determinato paziente [2].

Ne consegue che a volte occorrono alcuni mesi per individuare la terapia a cui il paziente risponde maggiormente con tutto ciò che ne consegue in termini di disagio, di costi e di esposizione a rischio maggiore del paziente fin tanto che la BP non è stata messa sotto controllo. Lo strumento della farmacogenomica diventa quindi essenziale al fine di ottenere indicatori genetici di risposta alle singole molecole di antiipertensivi con l'obiettivo di poter praticare la “terapia ideale” nel singolo paziente con massimo effetto terapeutico e minimi effetti collaterali.

2. OBIETTIVO DELLO STUDIO HCTZ

Gli obiettivi del nostro studio sono:

1. Identificare mediante approccio genome-wide le varianti geniche associate alla risposta della pressione arteriosa all'idroclorotiazide (HCTZ) in pazienti con ipertensione essenziale mai trattati in una coorte di SASSARI e in una di MILANO, così da ottimizzare l'efficacia della terapia minimizzandone gli effetti collaterali.
2. Verificare la specificità dei risultati per l'HCTZ in una coorte indipendente di pazienti ipertesi "naive" trattati con Losartan per 4 settimane.
3. Confermare i risultati mediante replica in 5 coorti indipendenti di origine europea:
 - GENRES;
 - GERA1;
 - NORDIL;
 - PEAR;
 - CSN-StayOnDiur

Sono stati condotti molti studi su geni candidati coinvolti nella risposta pressoria all'idroclorotiazide [17, 18, 19, 20, 21], ma una gran parte della variazione della risposta pressoria a questo trattamento è ancora poco chiara.

Grazie all'approccio genome-wide e a nuovi pannelli di imputazione, si è dunque voluta estendere l'analisi al fine di individuare nuovi loci associati alla risposta pressoria a questo farmaco.

Abbiamo effettuato un'analisi di associazione genome-wide (GWA), seguita da una meta-analisi in due coorti italiane, una proveniente da Sassari e l'altra da Milano (PHSS e HCTZ-Milano), di soggetti ipertesi essenziali trattati con HCTZ volta ad identificare nuovi loci di regolazione della risposta pressoria all'idroclorotiazide. Abbiamo verificato la specificità dei nostri risultati testando

gli SNPs significativamente associati con la risposta ad HCTZ in una coorte di soggetti ipertesi essenziali trattati con il bloccante del recettore dell'angiotensina II, losartan [24, 25].

Tutte le valutazioni di cui sopra sono state condotte in soggetti con ipertensione essenziale lieve-moderata non trattati: infatti, in accordo con la letteratura crediamo fermamente che i periodi di wash-out di almeno 6 mesi sono necessari per azzerare le funzioni delle cellule dagli effetti dei trattamenti antipertensivi [26]. Così periodi di wash-out di breve durata di otto settimane o anche più brevi potrebbero aumentare il "rumore di fondo", che costituisce una limitazione importante per ottenere risultati attendibili [26]. Abbiamo testato i nostri risultati per la replica, utilizzando i dati di cinque campioni indipendenti di pazienti ipertesi di origine europea: GENRES [27], GERA1 [28], NORDIL [29], PEAR [30] e CSN-StayOnDiur [31, 32], anche se eravamo consapevoli che le differenze rilevanti nella progettazione del protocollo e nel reclutamento delle coorti potessero influenzare la replica.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Protocollo di studio della coorte di Sassari (PHSS)

Sono stati analizzati 601 soggetti caucasici sardi mai trattati. I dati fenotipici e i campioni di DNA sono stati raccolti tra il 1997 e il 2013. I soggetti reclutati erano affetti da ipertensione essenziale di I o II grado, in accordo con le linee guida del "Seventh report of the Joint National Committee" [9], senza nessuna comorbidità rilevante. Tutti i pazienti erano maggiorenni ed erano stati diagnosticati come ipertesi prima del 60° anno di età.

La pressione arteriosa è stata misurata tre volte consecutive (braccio dominante) in posizione seduta con dispositivo elettronico certificato (OMRON 7051T), in una camera tranquilla, dalla stessa infermiera e in assenza del medico. Dopo la prima visita, tutti i pazienti sono stati sottoposti ad un periodo di run-in di 8 settimane, sotto regime alimentare controllato (100-140 mEq / giorno di sodio e 50-70 mEq / giorno di potassio); per tutti i pazienti è stato eseguito un work-up clinico, strumentale e laboratoristico per escludere possibili forme di ipertensione secondaria.

Durante questo periodo di run-in la BP è stata misurata ogni due settimane tra le 8:00 e le 10:00; in ogni occasione, la media di tre misurazioni consecutive è stata utilizzata per definire la presenza della malattia e per le successive analisi, con un dispositivo elettronico certificato (OMRON 7051T Omron Healthcare, Kyoto, Giappone).

Solo i pazienti asintomatici, con ipertensione essenziale lieve-moderata (EH) sono stati arruolati nello studio.

Sono stati esclusi i pazienti con:

- Ipertensione sintomatica;
- Ipertensione secondaria o maligna (secondo le Linee Guida ESH [2] e il report JNC 7 [9]);
- Donne in gravidanza o in allattamento o in età fertile che non utilizzano un metodo contraccettivo adeguato;

- Ipotassiemia (potassio < 3,5 mmol / L) alla visita della settimana 0 o durante il trattamento;
- Malattie sistemiche croniche e condizioni acute clinicamente rilevanti;
- Qualsiasi condizione che potrebbe influire negativamente sulla partecipazione del paziente allo studio (tossicodipendenza, alcolismo, prevedibile mancanza di collaborazione o di scarsa compliance alla terapia, ecc);
- Storia di gotta o iperuricemia (acido urico ≥ 7.0 mg/dL).

Non era consentito l'uso di altri farmaci, compreso l'uso occasionale di farmaci antiinfiammatori a causa della loro documentata interferenza con meccanismi d'azione dei tiazidici. Cento e quarantasei pazienti (24,3 %) sono stati esclusi durante il periodo di run-in (9 per comparsa di sintomi correlati all'EH, 12 per un peggioramento dei valori pressori, 3 perché hanno ritirato il consenso e 122 per normalizzazione dei valori della BP).

Così, alla fine delle otto settimane di run-in (settimana 0) sono stati arruolati 455 pazienti con ipertensione essenziale di grado lieve -moderata con pressione sistolica ≥ 140 mmHg e pressione diastolica ≥ 90 mmHg. Alla settimana 0, tutti i pazienti hanno iniziato il trattamento con idroclorotiazide 25 mg/die per 8 settimane.

Prima di iniziare il trattamento, sono stati raccolti il sangue per le analisi chimiche, l'attività reninica plasmatica basale e l'aldosterone, nonché le urine delle 24 ore. Durante le 8 settimane di trattamento con HCTZ, 7 pazienti hanno lasciato lo studio per scarsa compliance (1,5%) e 47 per comparsa di effetti collaterali (10,3 % ipotassiemia; potassio < 3,5 mmol / L).

La coorte genotipizzata risultava dunque composta da 401 soggetti.

La Figura 1 mostra l'intero flusso dei pazienti dalla settimana -8, all'inizio dello screening, fino alla settimana +8, fine dello studio.

Il protocollo è stato approvato dal Comitato Etico locale (ASL n.1 - AOU Comitato Etico di Sassari). E' stato ottenuto il consenso informato scritto per lo studio e per l'analisi del DNA e tutte le indagini cliniche sono state condotte secondo i principi espressi nella Dichiarazione di Helsinki.

3.2 Protocollo di studio della coorte di Milano

Sono stati analizzati duecento e trentadue (232) soggetti caucasici mai trattati provenienti da Milano, dopo l'esclusione di ipertensione secondaria. I dati fenotipici e i campioni di DNA sono stati raccolti tra il 1998 e il 2008. I soggetti reclutati erano affetti da ipertensione essenziale di I o II grado [9], senza comorbidità rilevanti.

Tutti i pazienti erano maggiorenni e sono stati diagnosticati come ipertesi prima del 60° anno di età. Dopo la prima visita, tutti i pazienti sono stati sottoposti ad un periodo di run-in di 4 settimane, in cui è stato consigliato ai partecipanti di seguire un regime alimentare che prevedeva un'assunzione di sodio < 150 mmol al giorno. Durante il periodo di run-in quattro pazienti sono stati esclusi dallo studio: uno per il ritiro del consenso (0,4%) e tre per normalizzazione dei valori della BP (1,3 %).

Così, al termine del periodo di run-in (settimana 0) 228 pazienti affetti da EH di grado lieve-moderato con pressione sistolica ≥ 140 mmHg e pressione diastolica ≥ 90 mmHg hanno iniziato il trattamento con HCTZ per 8 settimane. Prima di iniziare il trattamento, sono stati raccolti i campioni di sangue per gli esami biochimici, la PRA basale ed l'aldosterone ed anche i campioni urinari. I soggetti sono stati trattati per otto settimane con HCTZ, iniziando con una dose di 12,5 mg al giorno per 4 settimane, seguita da 25 mg al giorno per altre 4 settimane. A ciascuna visita, in ambulatorio è stata misurata la BP dallo stesso sperimentatore utilizzando un dispositivo Omron 750IT (Omron Healthcare, Kyoto, Giappone), tra le ore 8:00 e le ore 10:00, circa 24 ore dopo l'ultima dose HCTZ.

E' stata calcolata la media delle ultime 3 misurazioni stabili prese dopo l'esame clinico e questo dato successivamente è stato utilizzato per le analisi. La risposta alla terapia è stata calcolata come

differenza tra la media degli ultimi 3 valori di PA registrati all'ultima visita pretrattamento e la media degli ultimi 3 valori pressori dopo 2 mesi di terapia con HCTZ descritta sopra. Durante le 8 settimane di trattamento con HCTZ, un paziente è stato perso al follow-up (0,4%), sei pazienti hanno lasciato lo studio per scarsa compliance (2,6%), due per il peggioramento dei valori pressori (0,9%) e quattro per la comparsa di effetti collaterali (tre per iperuricemia, acido urico > 7 mg / dl, e uno per palpitazioni; 1,7%).

Il campione genotipizzato era composto da 215 soggetti.

La Figura 2 illustra l'intero flusso dei pazienti dalla settimana -4, all'inizio dello screening, fino alla settimana +8, fine dello studio. Il protocollo è stato approvato dal Comitato Etico dell'Ospedale San Raffaele - Segrate MI. E' stato ottenuto il consenso informato scritto per lo studio e per l'analisi del DNA, e tutte le indagini cliniche sono state condotte secondo i principi espressi nella Dichiarazione di Helsinki.

3.3 Campione losartan

Lo studio con il losartan è stato condotto applicando lo stesso protocollo per lo studio HCTZ di Sassari (vedi sopra), eccetto per l'uso del farmaco losartan. Dodici Centri di ricerca in tutta Italia hanno partecipato allo studio sotto la supervisione del Centro di Ipertensione e Malattie Correlate, dell'AOU – Università di Sassari. I pazienti ipertesi di grado lieve-moderato, asintomatici e senza complicazioni, sono stati reclutati tra il 2005 e il 2009, secondo il protocollo SOPHIA disegnato dal Gruppo di Studio della Farmacogenomica Cardiovascolare della Società Italiana dell'Ipertensione Arteriosa [24, 25]. Il protocollo SOPHIA ha ricevuto l'approvazione da parte dei Comitati Etici di tutti i centri partecipanti. Come per lo studio HCTZ, tutti i pazienti ipertesi sono stati arruolati dopo aver ottenuto il consenso informato scritto. Dopo il controllo di qualità, 372 pazienti sono stati analizzati (Figura 3).

3.4 Coorti di replica

Abbiamo testato i nostri migliori risultati in cinque studi clinici indipendenti. Le cinque coorti di replica sono: GENRES, GERA1, NORDIL, PEAR e CSN-StayOnDiur.

3.4.1 Studio GENRES

Lo studio GENRES (GENetics of drug RESponsiveness in essential hypertension) è uno studio sugli antipertensivi, prospettico, randomizzato, in doppio cieco, cross-over, placebo-controllato condotto in 233 uomini finlandesi con ipertensione di grado lieve-moderato, di età compresa tra 35 e 60 anni [27]. I criteri di inclusione erano pressione diastolica ≥ 95 mm Hg in misurazioni ripetute oppure l'uso di farmaci antipertensivi. Eventuali farmaci antipertensivi precedentemente prescritti sono stati sospesi almeno quattro settimane prima di iniziare l'assunzione del farmaco in studio. I criteri di esclusione erano l'uso di tre o più farmaci antipertensivi, ipertensione secondaria, o comorbidità significative. Ogni partecipante allo studio ha ricevuto 50 mg/die di losartan, 5 mg/die di bisoprololo, 25 mg/die di idroclorotiazide e 5 mg/die di amlodipina al giorno, ciascuno come monoterapia in modo randomizzato per quattro settimane. Lo studio è iniziato con un periodo di run-in con placebo per quattro settimane e tutti e quattro i periodi di trattamento del farmaco sono stati separati da periodi di quattro settimane con placebo.

La validità dello studio per quanto riguarda il trattamento con l'HCTZ è stata verificata tramite l'associazione della maggiore età e valori basali più bassi di renina plasmatica con una migliore risposta pressoria all'idroclorotiazide [27, 33].

I campioni sono stati genotipizzati utilizzando l'Illumina HumanOmniExpress-12 BeadChip (Illumina, Inc., San Diego, CA, USA). L'imputazione è stata effettuata utilizzando IMPUTE2 (versione 2.2.2) e il pannello 1000 Genomi come pannello di riferimento. In questo studio di replicazione sono stati utilizzati i dati della BP in ambulatorio, includendo 214 soggetti con risposta all'HCTZ e i dati GWAS.

3.4.2 Studio GERA1

Nello studio GERA1 (Genetic Epidemiology of Responses to Antihypertensives) i partecipanti erano americani caucasici ipertesi; di questi sono stati analizzati i dati fenotipici e genetici. [28]. Tra il 1997 e il 2002, 300 pazienti provenienti da Rochester MN sono stati trattati con HCTZ alla dose di 25 mg al giorno per quattro settimane dopo un periodo di wash-out di almeno quattro settimane.

La BP è stata misurata alla fine del periodo di wash-out e anche alla fine del trattamento con il farmaco utilizzando uno sfigmomanometro random zero (Hawksley and Sons, Ltd.; West Sussex, Inghilterra).

I campioni di DNA dello studio GERA1 sono stati genotipizzati per ≈ 500.000 SNPs markers genome-wide utilizzando l'Array Affymetrix GeneChip Human Mapping 500K. Per tutti i partecipanti inclusi nelle analisi, il call rate genotipico era superiore al 95% su tutti gli SNPs; SNPs con call rate $<80\%$ in tutti i partecipanti allo studio GERA1 sono stati esclusi dalle analisi. Gli SNPs che hanno superato il controllo di qualità sono stati imputati utilizzando il software MACH (versione 1.0.16) e HapMap III come pannello di riferimento. I risultati genotipici degli SNP imputati sono stati filtrati per un valore soglia di r^2 di 0,3 e una soglia di frequenza allelica minore di 0,03.

3.4.3 Studio NORDIL

Lo studio NORDIL (NORdic DILtiazem intervention) è uno studio prospettico, randomizzato, aperto, condotto presso 1.032 centri sanitari in Svezia e Norvegia tra il 1992 e il 1999 [29]. Sono stati inclusi 10881 partecipanti svedesi e norvegesi di mezza età, che avevano pressione diastolica ≥ 100 mmHg, in due misurazioni.

I partecipanti non erano mai stati trattati in precedenza o anche se trattati in precedenza, presentavano una pressione diastolica ≥ 100 mmHg in due misurazioni consecutive, a distanza almeno di una settimana l'una dall'altra, durante un periodo di run-in in cui non è stato dato nessun trattamento antipertensivo. I partecipanti sono stati sottoposti in maniera random ad un trattamento con diltiazem (un bloccante non selettivo dei canali del calcio) o con beta-bloccanti, diuretici, o entrambi.

Il diuretico tiazidico era l'idroclorotiazide o il bendroflumetiazide a discrezione del medico curante, così come la dose somministrata. La pressione arteriosa è stata misurata ambulatorialmente ogni sei mesi con i pazienti in posizione supina, con lo stesso metodo di misura per ciascun centro partecipante. I partecipanti con pressione diastolica >90 mmHg alla visite di follow-up, hanno ricevuto una terapia aggiuntiva graduale. Nel gruppo in cui erano somministrati i beta-bloccanti o i diuretici, i partecipanti sono stati inizialmente trattati solo con un beta-bloccante o solo con il diuretico tiazidico. Nel passaggio 2, i due sono stati combinati, se necessario, per un'adeguata riduzione della pressione arteriosa. Nel passaggio 3, è stato aggiunto un ACE inibitore o un alfa-bloccante. Se i partecipanti presentavano ancora livelli elevati di pressione, qualsiasi altro composto antipertensivo poteva essere aggiunto, ad eccezione dei farmaci calcio-antagonisti. Il DNA è stato estratto da 5152 partecipanti svedesi, che costituiscono il 72,4% della coorte svedese dello studio NORDIL. Fra questi, sono stati selezionati per nostra replica 383 pazienti in monoterapia con un diuretico tiazidico durante i primi 6 mesi dello studio. In ambulatorio la risposta pressoria all'idroclorotiazide è stata calcolata come la differenza tra i valori pressori misurati prima e dopo sei mesi di trattamento con l'idroclorotiazide in monoterapia. La genotipizzazione genome-wide dello studio NORDIL è stata eseguita utilizzando l'Illumina 610 Quad V1 BeadChip (Illumina, Inc., San Diego, CA, USA). Sono stati rimossi gli SNPs con una frequenza allelica (MAF) $<1\%$ o in significativo disequilibrio di Hardy-Weinberg (p -value $<1 \times 10^{-7}$), in campioni aggregati, lasciando 521.220 SNPs per l'analisi. La struttura della popolazione è stata valutata utilizzando l'analisi delle

componenti principali con EIGENSTRAT. E' stata effettuata l'imputazione utilizzando IMPUTE v.2 e HapMap (release 22 , build 35 panel).

3.4.4 Studio PEAR

Lo studio PEAR (Pharmacogenomics Evaluation of Antihypertensive Response) è stato condotto in due gruppi di afroamericani e americani caucasici, di cui sono state misurate le pressioni in ambulatorio e a casa, di giorno e di notte, ed è stata calcolata una media ponderata delle risposte pressorie [30, 34]. Durante la visita di screening, sono stati somministrati questionari standardizzati, è stato eseguito un rapido esame fisico, e sono stati prelevati campioni di sangue e di urine ai pazienti per accertarne l'idoneità allo studio.

Ai partecipanti è stata sospesa ogni precedente terapia farmacologica antipertensiva per un periodo di wash-out medio di 31 giorni (range: 13-125 giorni).

Per risultare idonei al test random con l'idroclorotiazide (o atenololo), la pressione diastolica domiciliare media della settimana precedente, doveva essere di >85 mmHg (risultante da almeno cinque misurazioni effettuate al mattino e cinque alla sera) e la pressione diastolica media in ambulatorio >90 mmHg. La terapia iniziava con HCTZ (o atenololo) alla dose di 12,5 mg (o 50 mg) al giorno per due settimane, dopo di che, se la BP rimaneva $> 120/70$ mmHg, la dose veniva aumentata a 25 mg (o 100 mg) al giorno per ulteriori sei settimane. L'aumento di dose si è reso necessario nel 98% dei pazienti trattati con idroclorotiazide e nell'83% di pazienti trattati con atenololo.

I campioni di DNA dello studio PEAR sono stati genotipizzati per più di un 1 milione di SNPs utilizzando l'Illumina Human Omni1-Quad BeadChip (Illumina, San Diego, CA) con il software BeadStudio e GenTrain2 (Illumina, San Diego, CA). Sono stati sottoposti ad imputazione più di un milione di SNPs che avevano superato il controllo di qualità, utilizzando il software Mach (versione

1.0.16) usando HapMap III come mappa di riferimento. Gli SNPs con frequenza dell'allele minore (MAF) < 3% o r^2 di imputazione < 0,3 sono stati esclusi dall'analisi. Siccome i nostri campioni includevano solo europei, ci siamo concentrati per la replica (n = 228) solo sulla coorte dello studio PEAR che era costituita da Americani caucasici e trattati in monoterapia con HCTZ.

3.4.5 Studio CSN-StayOnDiur

Il campione dello Studio CSN-StayOnDiur (Campania Salute Network-StayOnDiur) era costituito da 617 soggetti caucasici di origine Europea di età compresa tra 18-75 anni. I parametri clinici dei partecipanti allo studio sono stati raccolti in base al protocollo di studio [31, 32]. In breve, 1.300 pazienti sono stati selezionati in modo casuale dalla CSN (Campania Salute Network), un registro coordinato che coinvolge ~ 12.000 pazienti, 23 ambulatori di ipertensione ospedalieri, 260 medici di base (MMG) selezionati in modo casuale, e un Centro coordinante specialistico per l'Iipertensione presso l'Università Federico II di Napoli. Sono state effettuate le analisi dei campioni di sangue e urine, ecografia carotidea e cardiaca al basale e in momenti programmati.

I criteri di esclusione comprendevano: storia di un precedente infarto miocardico, angina, procedure di rivascularizzazione coronarica, storia di ictus o attacco ischemico transitorio (TIA), scompenso cardiaco congestizio e malattia renale cronica (con grado >3 e GFR <30 ml / min per 1,73 m²).

Il follow-up dei pazienti è stato eseguito per due anni dal MMG assegnato. Tutti i pazienti con ipertensione diagnosticata sono stati randomizzati e hanno iniziato il trattamento con un solo farmaco (clortalidone 12,5-25 mg al giorno). I pazienti sono stati visitati ogni mese presso lo studio dei medici di base per regolare la terapia in modo da ottenere la normalizzazione della pressione sanguigna (cioè pressione sistolica <140 mmHg e pressione diastolica <90 mmHg o <130/80 mmHg nei diabetici) per un periodo di due anni. I dati sono stati raccolti e memorizzati utilizzando il Case Report Form (CRF) centralizzato online. L'aderenza al trattamento è stata valutata ad ogni

visita di controllo da parte del medico di famiglia utilizzando un registro delle prescrizioni e un questionario somministrato a ciascun paziente. L'aderenza alla terapia è stata stabilita dalla corrispondenza tra le risposte al questionario e l'effettivo momento della prescrizione. Ad ogni visita veniva assegnato 1 punto in caso di comprovata aderenza alla terapia, 0 punti in caso di non aderenza. E' stato definito "Adherence score" la somma dei punteggi ottenuti ad ogni visita diviso per il numero delle visite. I campioni CSN-stayondiur sono stati genotipizzati usando il 320K e il 1M Human-DUO Illumina SNP array. I chip sono stati eseguiti e analizzati secondo protocolli del produttore. Gli SNPs che avevano un call rate <97% nella matrice 320K e <97% nella matrice 1M, e una frequenza allelica minore <5%, in equilibrio di Hardy-Weinberg (HWE) con un $P < 1 \times 10^{-6}$, sono stati esclusi dall'analisi.

Tramite i filtri del controllo di qualità sono stati scartati 496 soggetti e 218.000 SNPs dall'array 320K e 720.000 SNPs dall'array 1M Human-DUO. I dati genotipizzati risultanti dal controllo di qualità (QC) sono stati fusi e sono state eseguite le imputazioni utilizzando come riferimento HapMap CEU population (build 36, release 22). Sono stati imputati circa 2,5 milioni di SNPs con metodo della verosimiglianza massima implementato in MACH software 1.0. Per la replica abbiamo analizzato 438 soggetti della coorte CSN-stayondiur che rispondevano ai nostri criteri di inclusione (PAS basale ≥ 140 mmHg e DBP basale ≥ 90 mmHg).

3.5 Genotipizzazione e imputazione

DNA genomico è stato estratto dal sangue periferico raccolto alla settimana 0 (kit Macherey - Nagel: NucleoSpin Blood XL, Düren, Germania o con il metodo standard).

Due centottantadue pazienti PHSS sono stati genotipizzati utilizzando l'array Illumina Human1MDuo (Illumina Inc, San Diego, CA, USA) nell'ambito del progetto HYPERGENES [35] e 119 utilizzando l'array Illumina HumanOmniExpress nell'ambito del progetto InterOmics (<http://www.interomics.eu/>).

Duecento e quindici campioni HCTZ-Milano sono stati genotipizzati utilizzando l'array Illumina Human1M-Duo nell'ambito del progetto HYPERGENES.

La totalità dei dati grezzi è stata analizzata con l'Illumina Software Genome Studio per chiamata genomica, utilizzando l'Illumina reference cluster file. Una soglia di call rate per il DNA è stata fissata a 0,95 e i DNA con call rate $\leq 0,95$ sono stati esclusi dal dataset dei dati finale. Per ciascun DNA i dati ricavati dal cromosoma X sono stati usati per verificare l'eventuale discordanza con il sesso dichiarato.

L'imputazione Genome wide è stata effettuata con Minimac [36] usando come riferimento il 1000 Genomes haplotypes (release March 2012). Gli SNPs misurati con call rate ≥ 99 % e la frequenza dell'allele minore (MAF) ≥ 1 % sono stati inclusi nel dataset. Gli SNPs imputati con bassa qualità di imputazione ($R_{sq} < 0,8$ o $MAF < 3$ %) non sono stati utilizzati nell'analisi di associazione.

3.6 Analisi statistica

Abbiamo analizzato i pazienti sia con la PA sistolica ≥ 140 mmHg che con la diastolica ≥ 90 mmHg. Per questo motivo, prima di eseguire l'analisi di associazione, abbiamo escluso 28 soggetti con DBP < 90 mmHg (13%) e 36 soggetti con pressione sistolica < 140 mmHg (16,7%) dalla coorte HCTZ-Milano, lasciando 151 pazienti.

Il fenotipo analizzato era la variazione della BP (sistolica e diastolica) dopo 8 settimane di trattamento (ΔSBP_8 , ΔDBP_8), definito come la differenza tra la BP alla fine del trattamento (settimana 8) e la BP alla fine del periodo di run in (settimana 0).

Il controllo di qualità è stato effettuato in conformità con il protocollo di Anderson CA e colleghi [37].

Quattro cento e uno (401) individui genotipizzati della coorte di Sassari (PHSS) sono stati sottoposti al controllo di qualità. Sono stati identificati e rimossi dall'analisi otto soggetti con sex mismatch

genotipico (differenza tra il sesso riportato nei dati clinici e quello stimato con i sex SNPs genotipizzati). Sette soggetti sono stati esclusi per basso call rate ($\leq 0,95$). Tredici soggetti sono stati esclusi per una ridotta proporzione di eterozigosit  nei genotipi. Il grado di parentela tra gli individui   stato stimato utilizzando genome-wide IBD (PLINK, versione 1.7) [38]. Abbiamo identificato e rimosso 15 campioni duplicati e 13 individui imparentati (un componente della famiglia, nove fratelli, due parenti di secondo grado, e un genitore / figlio).

Anche i duecento e quindici individui genotipizzati della coorte di HCTZ -Milano sono stati sottoposti al controllo di qualit . Tre soggetti con sex mismatch genotipico sono stati identificati e rimossi dall'analisi. Due soggetti sono stati esclusi per una ridotta proporzione di eterozigosit  nei genotipi. Il grado di parentela tra gli individui   stato stimato utilizzando genome-wide IBD (PLINK, versione 1.7) [38]. Abbiamo identificato e rimosso due individui imparentati (un fratello e un genitore/figlio).

Abbiamo valutato la stratificazione della popolazione con l'analisi delle componenti principali (PCA), utilizzando il pacchetto EIGENSOFT [39, 40] (versione 3.0). Sono stati rimossi 2 genetic outliers dalla coorte di Sassari e 2 genetic outliers dalla coorte di Milano, definiti come gli individui che eccedevano di 6 deviazioni standard dalla media dell'intero campione per ciascuna delle componenti principali. I risultati delle prime due componenti principali per la coorte di Sassari e di Milano sono descritti rispettivamente nella Figura 4A e Figura 4B.

Gli SNPs con MAF $<3\%$, call rate $<99\%$ e $R_{sq} <0,8$ sono stati rimossi dal dataset, secondo il protocollo Anderson CA [37] e come descritto da Turner ST e colleghi [41].

Dopo il controllo di qualit , il campione PHSS era composto da 343 pazienti (223 maschi e 120 femmine) e il campione HCTZ Milano da 142 pazienti (118 maschi e 24 femmine). Per valutare l'associazione tra genotipo e fenotipo per ciascuna coorte abbiamo effettuato una regressione lineare sui $\Delta SBP8$ e $\Delta DBP8$ sotto un modello additivo, aggiustato per sesso, et , BP basale e per componenti principali (PC), come attuata in Mach2qtl [42, 43].

Abbiamo eseguito una meta-analisi dei risultati, come attuata in Metal [44].

I markers sono stati filtrati per la frequenza dell'allele minore ($MAF < 0,03$) e per la qualità di imputazione ($Rsq < 0,8$), lasciando ≈ 6 milioni di markers.

Per verificare la specificità dei best SNPs identificati per la risposta all'idroclorotiazide, abbiamo effettuato un'analisi di regressione lineare applicando il modello sopra descritto, in un campione italiano indipendente di 372 soggetti ipertesi trattati con 50 mg / die di losartan (Figura 3). [24, 25].

Per replicare i nostri risultati abbiamo testato l'associazione in cinque campioni indipendenti di ipertesi di origine europea provenienti dagli studi GENRES, GERA1, NORDIL, PEAR e CSN-StayOnDiur.

4. RISULTATI

Caratteristiche delle coorti di studio sono riportate nella Tabella 2.

I partecipanti allo studio PHSS erano caucasici bianchi e comprendevano 120 donne (35%). L'età media era 49,2 anni (SD \pm 8,7); le medie pretrattamento della SBP e della DBP (\pm SD) erano 158,6 (\pm 13,4) e 103 (\pm 7.7) mmHg, rispettivamente. Dopo il controllo di qualità dei 401 campioni genotipizzati, 343 pazienti erano disponibili per l'analisi.

La coorte HCTZ-Milano era composta da caucasici bianchi e comprendeva 24 donne (17%). L'età media era di 46,3 anni (SD \pm 8,1); le medie pretrattamento della SBP e DBP (\pm SD) erano 153,5 (\pm 10,6) e 101.5 (\pm 7.4) mmHg. Dopo il controllo di qualità e l'esclusione per selezione della BP dei 215 campioni genotipizzati, 142 pazienti erano disponibili per l'analisi. Campioni PHSS e HCTZ-Milano hanno valori comparabili di DBP pretrattamento, potassio sierico e sodio urinario. Età, BMI, SBP pretrattamento erano più elevati nella coorte PHSS, mentre il valore del potassio urinario era maggiore nella coorte HCTZ-Milano.

Abbiamo effettuato un'analisi di regressione lineare nelle due coorti indipendenti, al fine di identificare polimorfismi associati con Δ SBP8 o Δ DBP8, secondo un modello additivo, aggiustato per le PC, il sesso, l'età e SBP o DBP basale. Abbiamo quindi effettuato una meta-analisi dei risultati.

Nonostante nessuno SNP abbia raggiunto il livello di significatività genome-wide nella meta-analisi per la risposta pressoria sistolica e diastolica all'idroclorotiazide, abbiamo deciso di considerare come significativa una soglia di valore di $p \leq 10^{-5}$, come suggerito dai qq plots (Figura 5).

Infatti, il p-value degli SNPs deviava sopra la diagonale, che rappresenta la linea di riferimento della distribuzione, ad un livello $\leq 10^{-5}$.

Così abbiamo selezionato 141 SNPs per Δ SBP8 e 130 SNPs per Δ DBP8 significativi in entrambe le coorti e con p value di meta-analisi $\leq 10^{-5}$. (Figure 6 e 7 e tabelle 3 e 4). Al fine di escludere risultati ridondanti, abbiamo filtrato gli SNPs che erano in linkage disequilibrium (LD) ($r^2 \geq 0.8$). Abbiamo anche escluso gli SNPs che mappavano nelle regioni deserte.

Abbiamo identificato sei SNPs associati con il Δ SBP8 (Tabella 5): rs12505746 nel gene TET2 - Tet Methylcytosine Dioxygenase 2 (beta -5.4 ± 1.2 , p-value 9.40×10^{-6}); rs7387065 e rs11993031 nel gene CSMD1 - CUB and Sushi multiple domains protein 1 (beta -3.5 ± 0.7 , p-value 1.71×10^{-6} , beta -3.4 ± 0.7 , p-value 7.65×10^{-6}); rs9285669 nel gene SPINK14 - Serina Peptidase Inhibitor, Kazal Type 14 (beta -3.8 ± 0.8 , p-value 7.09×10^{-7}); rs11189015 nel gene SLIT1 - slit homolog 1 (*Drosophila*) (beta -10.1 ± 2.2 , p-value 4.54×10^{-6}); rs9915451 nel gene ANKFN1 - Ankyrin-Repeat And Fibronectin Type III Domain Containing 1 (beta -4.1 ± 0.9 , p-value 4.01×10^{-6}).

Abbiamo identificato cinque SNPs associati con il Δ DBP8 (Tabella 6): rs4431329 e rs7706429 nel gene FBXL17 - F-box and leucine-rich repeat protein 17 (beta -2.9 ± 0.6 , p-value 1.28×10^{-6} , beta -2.6 ± 0.6 , p-value 3.01×10^{-6}); rs9590353 nel gene UGGT2 - UDP-glucose glycoprotein glucosyltransferase 2 (beta -4.6 ± 1.0 , p-value 5.39×10^{-6}); rs113095083 nel gene ILKAP - integrin-linked kinase-associated serine/threonine phosphatase (beta -6.5 ± 1.4 , p-value 6.37×10^{-6}); e rs77876672 nel gene DIAPH3 - diaphanous-related formin 3 (beta -5.6 ± 1.3 , p-value 9.47×10^{-6}).

Per valutare la specificità di questi SNPs con la risposta all'HCTZ, abbiamo testato la loro associazione con il Δ SBP8 o Δ DBP8 in 372 soggetti trattati con losartan.

Tutti gli SNPs testati erano specifici per la risposta pressoria all'idroclorotiazide (tabelle 7 e 8).

Per fare la replica abbiamo utilizzato i dati provenienti da diversi studi: GENRES, GERA1, NORDIL, PEAR e CSN-StayOnDiur (Tabella 9).

Rs7387065 nel gene CSMD1 era significativamente associato con la risposta alla SBP nella coorte GENRES (p-value 0,04, beta -2.2 ± 1.1), e ha mostrato la stessa direzionalità di effect size nella

coorte NORDIL sebbene non significativa; inoltre rs7387065 era significativamente associato con la risposta SBP nella coorte PEAR (p-value 0,03), ma con direzionalità di effect size opposta (Tabella 10). I genotipi per rs12505746 nel gene TET2 non erano disponibili nelle coorti di replica. Un tag SNP per rs12505746 (gene TET2) era presente nello studio GENRES, e ha mostrato un trend non significativo o borderline per la replica (Δ SBP p-value 0,33, Δ DBP p-value 0,02) nella stessa direzione. D'altra parte non siamo riusciti a replicare l'effect size, probabilmente a causa dell'elevata variabilità interindividuale della risposta pressoria. Rs9590353 nel gene UGGT2 è stato associato con la risposta della pressione diastolica nel campione CSN-StayOnDiur (p-value 0,04, beta -3.65 ± 1.75). Le stesse coorti sono state testate per replicare anche altri risultati, associati a Δ SBP8 o Δ DBP8 con p-value $< 10^{-5}$, ma senza risultati significativi (p-value > 0.05) o gli SNPs non erano disponibili (Figure 8 e 9).

5. DISCUSSIONE

Abbiamo eseguito un'analisi combinata di due coorti italiane di pazienti ipertesi essenziali di grado lieve-moderato mai trattati, per la ricerca di varianti genetiche predittive della risposta pressoria all'HCTZ. Nel complesso abbiamo identificato 141 SNPs associati con il Δ SBP8 e 130 SNPs associati con il Δ DBP8 con un p-value $<10^{-5}$.

La specificità dei nostri risultati per l'HCTZ è stata testata in una coorte diversa di ipertesi essenziali di grado lieve-moderato mai trattati, a cui era stato somministrato losartan per 4 settimane. Dopo l'esclusione di SNPs ridondanti per linkage disequilibrium, sei SNPs sono stati associati con la risposta pressoria sistolica all'HCTZ con un p-value $<10^{-5}$, mentre cinque SNPs con lo stesso p-value sono stati associati con la risposta diastolica.

In particolare, lo SNP rs12505746 che mappa nella regione intronica del gene TET2, così come gli SNPs rs7387065 e rs11993031 che mappano nella regione intronica del gene CSMD1 rappresentano i candidati più plausibili per la regolazione della pressione da parte dell'HCTZ.

Il gene TET2 catalizza la conversione della 5-metilcitosina (5MC) a 5-idrossimetilcitosina (5hmC) e svolge un ruolo chiave nella demetilazione del DNA attivo [45]. Yu Z. e colleghi [46] hanno dimostrato che l'aldosterone stimola l'attivazione di TET2 demetilando così il promotore del canale epiteliale del sodio α ENaC, ed inducendo la trascrizione di α ENaC. Come già noto, l'aldosterone aumenta il riassorbimento tubulare del Na^+ aumentando la trascrizione di α ENaC nelle cellule del dotto collettore.

E' stato dimostrato che il trattamento delle cellule del dotto collettore con 1 μM /l di aldosterone causa la dispersione della DNA metiltransferasi 3b (DNMT3B) dalla subregione R3 di α ENaC e attiva TET2 per convertire 5MC a 5hmC per contribuire alla derepressione della trascrizione di α ENaC. Lo studio identifica TET2 come mediatore aldosterone-sensibile della trascrizione del gene α ENaC nelle cellule dei dotti collettori della midollare interna [46]. La regolazione del sodio è uno

dei principali meccanismi patofisiologici della omeostasi CV: una up-regulation gene dipendente dell'attività di ENAC può quindi portare ad una ritenzione di sodio e di conseguenza ad un'espansione di volume che in ultima analisi agisce sulla PA e sulla modulazione della risposta ai diuretici tiazidici.

Recentemente, è stata proposta la teoria di un'attivazione da parte del sodio tramite il canale endoteliale del sodio (EnNaC) con meccanismo di feed-forward per contrastare l'inibizione a feedback di ENaC nel rene [47]. Ci sono prove che l'aldosterone aumenta la sintesi di EnNaC e la sua abbondanza sulla membrana, come nel rene. Per questo motivo, il sodio plasmatico penetra nell'endotelio causando l'irrigidimento delle cellule endoteliali della corteccia e una ridotta produzione di ossido nitrico, portando all'aumento della pressione arteriosa [48].

Possiamo ipotizzare che TET2 possa indurre anche la trascrizione di α EnNaC, influenzando così l'outcome cardiovascolare, oltre alla risposta della pressione sanguigna all'idroclorotiazide: ulteriori studi sono necessari per chiarire il suo ruolo.

Il gene CSMD1 codifica per una proteina transmembrana appartenente alla famiglia proteine-vacuolari sorting 13.

Nel lievito, questa proteina è coinvolta nel trasporto delle proteine di membrana, anche se la funzione della proteina umana non è stata ancora chiarita [49]. Tuttavia, i domini CUB e Sushi si trovano in molte altre proteine e si ritiene siano siti di interazione proteina-proteina o proteina-ligando [50, 51]. Recentemente il gene CSMD1 è stato associato con l'arteriopatia obliterante periferica [52] e alla sindrome metabolica [53].

Inoltre il gene CSMD1 è stato associato ad un aumento del rischio di ipertensione in due studi caso-controllo in coorti coreane, ma non è chiaro come CSMD1 potrebbe contribuire alla regolazione della BP [54].

Abbiamo valutato la specificità di questi SNPs per l'HCTZ, testando la loro associazione con Δ SBP8 o Δ DBP8 in pazienti trattati con losartan. Tutti gli SNPs testati erano specifici per la risposta pressoria all'HCTZ.

Abbiamo testato i nostri migliori risultati in cinque studi clinici sui diuretici, indipendenti tra loro: GENRES, GERA1, NORDIL, PEAR e CSN-StayOnDiur. Per tutti i partecipanti allo studio è stata analizzata la risposta pressoria in ambulatorio.

Nonostante questo fosse un gruppo eterogeneo di studi, che differivano in termini di disegno di studio, run-in, periodi di esposizione al farmaco e BP basale, in contrasto con il disegno dello studio rigoroso degli studi PHSS e HCTZ-Milano, abbiamo ipotizzato che la direzionalità concorde di effect size potrebbe sostenere la validità dei nostri risultati.

Infatti, GENRES, GERA1 e NORDIL hanno mostrato una simile direzionalità di effect size per rs7387065 nel gene CSMD1 e quindi è stata convalidata indirettamente la nostra ipotesi. Rs7387065 era significativamente associato con la risposta della sistolica nella coorte PEAR, ma con direzionalità opposta di effect size.

Un tag SNP rs12505746 di TET2 nella coorte GENRES è risultato associato con Δ DBP, ma non con Δ SBP. Nel campione CSN-StayOnDiur rs9590353 (gene UGGT2) è stato associato con la risposta diastolica nella stessa direzionalità. Il Gene UGGT2 codifica per una glicoproteina; la cui funzione biologica non è ancora stata chiarita [55].

Una vera replica richiede studi indipendenti con protocolli simili, come si evince nelle nostre coorti PHSS e HCTZ-Milano. Mentre questo potrebbe non essere fattibile per l'analisi post-hoc di studi clinici, i risultati di queste analisi possono comunque fornire informazioni utili e catalizzare eventuali trials clinici più specifici.

Studi precedenti hanno riportato diversi polimorfismi in geni candidati come predittori della risposta pressoria all'idroclorotiazide: il polimorfismo rs5443 nel gene GNB3 [56]; il polimorfismo inserzione / delezione nel gene ACE [57]; il polimorfismo rs1799983 di NOS3 [58]; rs2107614,

rs2277869 e rs1159744 nel gene WNK1; rs2400707 nel gene ADRB2; rs5723 e rs5729 nel gene SCNN1G [59]; rs4149601 nel gene NEDD4L [60]; rs6749447 e rs3754777 nel gene STK39 [61,62]; rs10792367, situato tra OAT1 e OAT3 [63]; rs1894111 e rs4930416 nel gene ADRBK1 [64]. Nessuno di loro ha ottenuto un p-value $<10^{-5}$ nel presente studio.

L'approccio GWA è stato seguito precedentemente anche nella farmacogenomica di HCTZ. Nel 2008 Turner S. *et al.* hanno suggerito che gli aplotipi da rs317689 a rs7297610 sul cromosoma 12q15 fossero associati con la risposta BP all'idroclorotiazide in afro-americani [65].

Nel 2012, Duarte JD *et al.* hanno identificato rs2269879 nel gene DOT1L nella razza caucasica [66].

Successivamente McDonough CW *et al.* hanno suggerito che rs4149601, rs292449 e rs75982813 in NEDD4L potevano essere associati alla risposta pressoria all'HCTZ nei bianchi [67].

Nello stesso anno, Turner S. *et al.* hanno identificato rs16960228 in PRKCA e rs2273359 nella regione GNAS-EDN3 [34]. Nessuno di questi SNPs ha raggiunto un p-value $<10^{-5}$ nel nostro studio.

6. CONCLUSIONI

In conclusione, abbiamo identificato due loci associati in modo plausibile alla risposta pressoria sistolica all'idroclorotiazide: TET2, un mediatore aldosterone-reattivo della trascrizione genica di α ENaC e CSMD1, in precedenza descritto come associato all'ipertensione in uno studio caso-controllo.

Il presente studio esplorativo presenta come limitazione la possibilità di ottenere una replica valida dei nostri risultati tra le diverse coorti analizzate, che risulta difficile per l'eterogeneità fenotipica e il diverso study design degli studi considerati.

Pur considerando che i nostri risultati mappano in regioni introniche o fiancheggianti il gene, rendendo perciò di non semplice comprensione il loro ruolo funzionale, questo studio può essere considerato come punto di partenza per chiarire il ruolo delle varianti genetiche che regolano la risposta pressoria all'idroclorotiazide.

Possiamo ipotizzare che i polimorfismi del gene presenti nel nostro studio siano in linkage disequilibrium con varianti causali che influenzano la struttura genica e l'espressione proteica o possono mappare loci funzionali non ancora identificati.

Ulteriori repliche saranno necessarie in futuro per confermare gli SNPs segnalati come marcatori della risposta pressoria all'idroclorotiazide.

NOTA: il lavoro scientifico oggetto di questa tesi è stato pubblicato nel febbraio 2015 con il seguente titolo: *TET2 and CSMD1 genes affect SBP response to hydrochlorothiazide in never-treated essential hypertensives* (Journal of Hypertension 2015 Jun;33(6):1301-9).

7. TABELLE

Characteristic	PHSS (n=343)	Milan-HCTZ (n=142)	p-value
Men/women	223/120	118/24	<0.0001
Age, y	49.2±8.7	46.3±8.1	0.0005
BMI baseline, kg/m ²	27.6±4.0	26.1±3.2	0.0001
Pretreatment SBP, mmHg	158.6±13.4	153.5±10.6	0.0001
Pretreatment DBP, mmHg	103.0±7.7	101.5±7.4	NS
Serum potassium, mmol/L	4.1±0.6	4.1±0.3	NS
Urine sodium, mEq/24 h	150.3±47.2	155.7±62.7	NS
Urine potassium, mEq/24 h	54.42±16.2	64.7±22.6	<0.0001
ΔSBP, mmHg	-18.9±15.1	-13.8±11.6	<0.0001
ΔDBP, mmHg	-12.0±9.5	-8.0± 8.4	<0.0001

Tabella 2. Caratteristiche delle due coorti di pazienti trattate con idroclorotiazide. La Tabella mostra le caratteristiche della coorte PHSS (Pharmacogenomics of Hydrochlorothiazide Sardinian Study) e Milan HCTZ (Pharmacogenomics of Hydrochlorothiazide Milan Study) come media±SD. BMI: indice di massa corporea; 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 è la significatività tra i due gruppi di trattamento (NS: p-value non significativo). Le comparazioni tra i gruppi di medie e frequenze sono state eseguite con ANOVA (analysis of variance) o con il chi-quadro test, a seconda della necessità.

Tabella 3. Risultati dell'associazione genome-wide per la risposta pressoria sistolica (SBP) all'idroclorotiazide nelle due coorti (PHSS e HCTZ Milano) e nella meta-analisi (SNPs with HCTZ meta-analysis p-value < 1x10⁻⁵). Tutti gli SNPs imputati hanno una qualità di imputazione (Rsq) ≥ 0.8. La risposta pressoria sistolica all'HCTZ è stata valutata usando un'analisi di regressione lineare sotto un modello additivo usando sesso, età, SBP basale e le componenti principali come covariate. Per recuperare maggiori informazioni sugli SNPs e sul loro contesto genomico (il gene più vicino) abbiamo usato l'hg19 assembly (National Center for Biotechnology Information 37). SNPID indica il polimorfismo a singolo nucleotide, chr: cromosoma e SE: errore standard.

Marker								PHSS			Milan-HCTZ			Meta-analysis		
SNPID	chr	position	risk allele	other allele	freq risk allele	gene	location	beta	SE	p-value	beta	SE	p-value	beta	SE	p-value
rs9285669	5	1,48E+08	T	A	0,6604	SPINK14	upstream	3,784	0,965	8,81E-05	3,719	1,225	2,39E-03	-3,7591	0,758	7,09E-07
21:46561448	21	46561448	D	R	0,0363	-	-	-10,05	3,589	5,11E-03	-12,857	3,219	6,50E-05	11,6056	2,3963	1,28E-06
rs7387065	8	2903020	G	A	0,5532	CSMD1	intron	3,828	0,9	2,09E-05	2,847	1,247	2,25E-02	-3,492	0,7298	1,71E-06
5:147544667	5	1,48E+08	R	D	0,6784	-	-	3,738	0,963	1,05E-04	3,388	1,212	5,19E-03	-3,6026	0,754	1,77E-06
rs6888900	5	1,48E+08	T	C	0,3215	-	-	3,753	0,964	9,86E-05	3,367	1,211	5,44E-03	3,6033	0,7542	1,78E-06
rs9654500	5	1,48E+08	G	A	0,6804	-	-	3,725	0,962	1,09E-04	3,367	1,211	5,43E-03	-3,5865	0,7533	1,92E-06
rs9654501	5	1,48E+08	T	C	0,3196	-	-	3,725	0,962	1,09E-04	3,367	1,211	5,43E-03	3,5865	0,7533	1,92E-06
rs13360182	5	1,48E+08	A	T	0,3202	SPINK14	upstream	3,724	0,962	1,08E-04	3,368	1,211	5,42E-03	3,5863	0,7533	1,93E-06
rs10075227	5	1,48E+08	T	C	0,3202	SPINK14	upstream	3,724	0,962	1,08E-04	3,368	1,211	5,42E-03	3,5863	0,7533	1,93E-06
rs6863271	5	1,48E+08	G	C	0,6798	SPINK14	upstream	3,724	0,962	1,08E-04	3,368	1,211	5,42E-03	-3,5863	0,7533	1,93E-06
rs9654491	5	1,48E+08	T	C	0,3202	SPINK14	upstream	3,724	0,962	1,09E-04	3,368	1,211	5,42E-03	3,5863	0,7533	1,93E-06
rs6864133	5	1,48E+08	C	T	0,6798	SPINK14	upstream	3,724	0,962	1,09E-04	3,368	1,211	5,42E-03	-3,5863	0,7533	1,93E-06
rs9654502	5	1,48E+08	G	A	0,6804	-	-	3,724	0,962	1,09E-04	3,368	1,211	5,43E-03	-3,5863	0,7533	1,93E-06
rs10065999	5	1,48E+08	C	T	0,6794	SPINK14	upstream	3,722	0,962	1,08E-04	3,368	1,211	5,43E-03	-3,585	0,7533	1,94E-06
rs9654490	5	1,48E+08	G	A	0,6778	-	-	3,779	0,984	1,23E-04	3,407	1,223	5,32E-03	-3,6328	0,7667	2,15E-06
rs10068916	5	1,48E+08	T	C	0,3595	SPINK14	upstream	3,414	0,929	2,38E-04	3,476	1,172	3,03E-03	3,4379	0,728	2,33E-06
rs10068913	5	1,48E+08	T	C	0,3595	SPINK14	upstream	3,415	0,929	2,38E-04	3,477	1,173	3,02E-03	3,4389	0,7283	2,34E-06
rs2191680	5	1,48E+08	C	T	0,6778	SPINK14	upstream	3,684	0,95	1,06E-04	3,239	1,201	6,99E-03	-3,5127	0,7451	2,42E-06
rs6894796	5	1,48E+08	T	C	0,3211	SPINK14	upstream	3,721	0,961	1,08E-04	3,249	1,204	6,96E-03	3,5373	0,7511	2,48E-06
rs4452547	5	1,48E+08	C	T	0,6765	SPINK14	downstream	3,654	0,943	1,07E-04	3,21	1,196	7,30E-03	-3,4838	0,7405	2,54E-06
rs4270684	5	1,48E+08	C	T	0,6765	SPINK14	downstream	3,654	0,943	1,07E-04	3,21	1,196	7,30E-03	-3,4838	0,7405	2,54E-06
rs9325078	5	1,48E+08	G	A	0,6768	SPINK14	upstream	3,66	0,945	1,08E-04	3,217	1,198	7,26E-03	-3,4901	0,742	2,55E-06
5:147557444	5	1,48E+08	R	D	0,6744	-	-	3,616	0,941	1,21E-04	3,271	1,202	6,52E-03	-3,4849	0,741	2,56E-06
rs9325077	5	1,48E+08	A	G	0,3232	SPINK14	upstream	3,662	0,946	1,08E-04	3,219	1,199	7,24E-03	3,492	0,7427	2,58E-06
rs9285670	5	1,48E+08	T	A	0,6768	SPINK14	upstream	3,658	0,945	1,08E-04	3,216	1,198	7,27E-03	-3,4885	0,742	2,58E-06

Marker								PHSS			Milan-HCTZ			Meta-analysis		
SNPID	chr	position	risk allele	other allele	freq risk allele	gene	location	beta	SE	p-value	beta	SE	p-value	beta	SE	p-value
rs4254894	5	1,48E+08	T	C	0,3232	SPINK14	upstream	3,658	0,945	1,08E-04	3,216	1,198	7,27E-03	3,4885	0,742	2,58E-06
rs6898191	5	1,48E+08	G	A	0,6829	-	-	3,837	0,968	7,44E-05	3,15	1,228	1,03E-02	-3,5737	0,7602	2,59E-06
rs4623135	5	1,48E+08	A	G	0,3232	SPINK14	upstream	3,657	0,945	1,08E-04	3,216	1,198	7,27E-03	3,4878	0,742	2,59E-06
rs9325079	5	1,48E+08	C	T	0,6768	SPINK14	upstream	3,658	0,945	1,09E-04	3,214	1,198	7,29E-03	-3,4877	0,742	2,59E-06
rs10068904	5	1,48E+08	T	C	0,3232	SPINK14	upstream	3,652	0,944	1,09E-04	3,212	1,197	7,31E-03	3,4833	0,7412	2,61E-06
rs10068922	5	1,48E+08	T	C	0,3231	SPINK14	upstream	3,649	0,943	1,09E-04	3,21	1,197	7,34E-03	3,4809	0,7407	2,61E-06
rs9325080	5	1,48E+08	T	C	0,3235	SPINK14	upstream	3,654	0,945	1,10E-04	3,217	1,199	7,27E-03	3,4866	0,7422	2,63E-06
rs4269285	5	1,48E+08	T	C	0,3235	SPINK14	upstream	3,646	0,943	1,10E-04	3,209	1,196	7,31E-03	3,4785	0,7405	2,64E-06
rs4705055	5	1,48E+08	C	T	0,6765	SPINK14	upstream	3,646	0,943	1,10E-04	3,209	1,196	7,31E-03	-3,4785	0,7405	2,64E-06
rs6881658	5	1,48E+08	T	G	0,3235	SPINK14	upstream	3,646	0,943	1,10E-04	3,209	1,196	7,31E-03	3,4785	0,7405	2,64E-06
rs6895745	5	1,48E+08	G	C	0,6765	SPINK14	upstream	3,646	0,943	1,10E-04	3,209	1,196	7,31E-03	-3,4785	0,7405	2,64E-06
rs2400493	5	1,48E+08	G	A	0,6765	SPINK14	downstream	3,645	0,943	1,10E-04	3,21	1,196	7,30E-03	-3,4782	0,7405	2,64E-06
rs2400496	5	1,48E+08	A	G	0,3235	SPINK14	downstream	3,645	0,943	1,10E-04	3,21	1,196	7,30E-03	3,4782	0,7405	2,64E-06
rs9325084	5	1,48E+08	G	C	0,6765	SPINK14	downstream	3,645	0,943	1,10E-04	3,21	1,196	7,30E-03	-3,4782	0,7405	2,64E-06
rs767569	5	1,48E+08	T	C	0,3235	SPINK14	downstream	3,645	0,943	1,10E-04	3,21	1,196	7,30E-03	3,4782	0,7405	2,64E-06
rs767570	5	1,48E+08	A	G	0,3235	SPINK14	downstream	3,645	0,943	1,10E-04	3,21	1,196	7,30E-03	3,4782	0,7405	2,64E-06
rs10070470	5	1,48E+08	T	C	0,3235	SPINK14	upstream	3,646	0,943	1,10E-04	3,209	1,197	7,33E-03	3,4786	0,7407	2,65E-06
rs10068988	5	1,48E+08	T	C	0,3235	SPINK14	upstream	3,645	0,943	1,10E-04	3,208	1,197	7,35E-03	3,4776	0,7407	2,67E-06
rs7826843	8	2900054	T	G	0,4505	CSMD1	intron	3,774	0,902	2,84E-05	2,9	1,32	2,80E-02	3,4958	0,7447	2,68E-06
5:147552361	5	1,48E+08	R	I	0,6709	-	-	3,694	0,948	9,85E-05	3,176	1,205	8,42E-03	-3,496	0,7451	2,70E-06
rs4259160	5	1,48E+08	G	A	0,6748	SPINK14	downstream	3,618	0,938	1,15E-04	3,209	1,196	7,31E-03	-3,4622	0,7381	2,72E-06
rs6898210	5	1,48E+08	G	T	0,6829	-	-	3,825	0,968	7,72E-05	3,145	1,227	1,04E-02	-3,5641	0,76	2,73E-06
rs6884063	5	1,48E+08	T	G	0,3171	-	-	3,822	0,968	7,92E-05	3,145	1,227	1,04E-02	3,5623	0,76	2,77E-06
rs10074328	5	1,48E+08	C	T	0,6748	SPINK14	downstream	3,611	0,938	1,19E-04	3,21	1,197	7,30E-03	-3,4584	0,7383	2,81E-06
rs1029884	5	1,48E+08	G	C	0,6748	SPINK14	intron	3,611	0,938	1,19E-04	3,21	1,197	7,30E-03	-3,4584	0,7383	2,81E-06
rs7703761	5	1,48E+08	C	T	0,6748	SPINK14	downstream	3,61	0,938	1,19E-04	3,208	1,196	7,32E-03	-3,4569	0,7381	2,82E-06
rs2400494	5	1,48E+08	A	G	0,3252	SPINK14	downstream	3,609	0,938	1,19E-04	3,209	1,196	7,31E-03	3,4567	0,7381	2,82E-06
rs2400495	5	1,48E+08	G	A	0,6748	SPINK14	downstream	3,609	0,938	1,19E-04	3,209	1,196	7,31E-03	-3,4567	0,7381	2,82E-06
rs7445725	5	1,48E+08	A	C	0,3252	SPINK14	downstream	3,609	0,938	1,19E-04	3,209	1,196	7,31E-03	3,4567	0,7381	2,82E-06
rs767568	5	1,48E+08	A	G	0,3252	SPINK14	downstream	3,609	0,938	1,19E-04	3,209	1,196	7,31E-03	3,4567	0,7381	2,82E-06

Marker								PHSS			Milan-HCTZ			Meta-analysis		
SNPID	chr	position	risk allele	other allele	freq risk allele	gene	location	beta	SE	p-value	beta	SE	p-value	beta	SE	p-value
rs1156195	5	1,48E+08	T	C	0,3252	SPINK14	intron	3,609	0,938	1,19E-04	3,209	1,196	7,31E-03	3,4567	0,7381	2,82E-06
rs7713904	5	1,48E+08	C	T	0,6748	SPINK14	intron	3,609	0,938	1,19E-04	3,209	1,196	7,31E-03	-3,4567	0,7381	2,82E-06
rs2191681	5	1,48E+08	T	C	0,3252	SPINK14	downstream	3,61	0,938	1,19E-04	3,209	1,197	7,33E-03	3,4574	0,7383	2,83E-06
rs2400497	5	1,48E+08	T	C	0,3252	SPINK14	downstream	3,609	0,938	1,19E-04	3,208	1,196	7,33E-03	3,4563	0,7381	2,83E-06
rs6883615	5	1,48E+08	T	C	0,3167	-	-	3,68	0,967	1,42E-04	3,28	1,197	6,14E-03	3,522	0,7522	2,84E-06
rs6898852	5	1,48E+08	C	T	0,6833	-	-	3,68	0,967	1,43E-04	3,28	1,197	6,15E-03	-3,522	0,7522	2,84E-06
rs10477363	5	1,48E+08	T	C	0,3256	SPINK14	downstream	3,609	0,939	1,21E-04	3,216	1,197	7,24E-03	3,4593	0,7388	2,84E-06
rs10061827	5	1,48E+08	C	T	0,6833	-	-	3,678	0,967	1,43E-04	3,278	1,197	6,16E-03	-3,52	0,7522	2,87E-06
rs10055396	5	1,48E+08	A	G	0,3276	-	-	3,58	0,949	1,61E-04	3,368	1,216	5,63E-03	3,4998	0,7481	2,90E-06
rs2400492	5	1,48E+08	G	A	0,6833	-	-	3,675	0,967	1,45E-04	3,275	1,196	6,17E-03	-3,5169	0,752	2,91E-06
rs2400491	5	1,48E+08	T	C	0,3167	-	-	3,675	0,967	1,45E-04	3,275	1,196	6,18E-03	3,5169	0,752	2,91E-06
rs2159661	5	1,48E+08	A	G	0,3261	SPINK14	downstream	3,583	0,94	1,38E-04	3,262	1,202	6,65E-03	3,4612	0,7405	2,95E-06
rs6580532	5	1,48E+08	C	T	0,6731	-	-	3,573	0,948	1,65E-04	3,363	1,216	5,69E-03	-3,4936	0,7476	2,97E-06
rs7719535	5	1,48E+08	T	C	0,328	-	-	3,573	0,947	1,61E-04	3,341	1,212	5,84E-03	3,4851	0,7462	3,01E-06
rs34339574	5	1,48E+08	T	C	0,3385	-	-	3,299	0,953	5,39E-04	3,902	1,236	1,59E-03	3,5238	0,7547	3,03E-06
rs6580533	5	1,48E+08	C	T	0,6724	-	-	3,57	0,949	1,68E-04	3,367	1,217	5,65E-03	-3,4932	0,7484	3,04E-06
rs6898179	5	1,48E+08	G	T	0,6759	-	-	3,88	0,977	7,19E-05	3,087	1,233	1,23E-02	-3,5741	0,7657	3,05E-06
rs6884944	5	1,48E+08	T	C	0,328	-	-	3,562	0,947	1,69E-04	3,353	1,213	5,72E-03	3,4829	0,7465	3,07E-06
rs10077607	5	1,48E+08	C	A	0,6724	-	-	3,562	0,948	1,72E-04	3,362	1,215	5,65E-03	-3,4863	0,7474	3,09E-06
rs6860003	5	1,48E+08	C	T	0,6714	-	-	3,562	0,948	1,71E-04	3,356	1,214	5,70E-03	-3,484	0,7472	3,12E-06
rs35696310	5	1,48E+08	T	A	0,672	-	-	3,55	0,947	1,78E-04	3,365	1,214	5,58E-03	-3,48	0,7467	3,15E-06
5:147566123	5	1,48E+08	R	D	0,6469	-	-	3,44	0,957	3,27E-04	3,677	1,24	3,02E-03	-3,5285	0,7576	3,20E-06
5:147561496	5	1,48E+08	R	D	0,672	-	-	3,547	0,947	1,81E-04	3,362	1,214	5,61E-03	-3,477	0,7467	3,22E-06
rs6879875	5	1,48E+08	A	G	0,3161	-	-	3,782	0,969	9,53E-05	3,147	1,226	1,03E-02	3,5378	0,7602	3,26E-06
rs1974627	5	1,48E+08	T	G	0,3251	SPINK14	downstream	3,626	0,945	1,24E-04	3,198	1,208	8,09E-03	3,4635	0,7443	3,27E-06
rs12653723	5	1,48E+08	A	G	0,3286	-	-	3,534	0,948	1,94E-04	3,369	1,215	5,56E-03	3,4716	0,7474	3,40E-06
rs12653724	5	1,48E+08	A	G	0,3286	-	-	3,532	0,948	1,95E-04	3,37	1,215	5,55E-03	3,4707	0,7474	3,42E-06
rs6899173	5	1,48E+08	C	T	0,6847	-	-	3,787	0,969	9,32E-05	3,103	1,221	1,10E-02	-3,5227	0,759	3,47E-06
rs1974628	5	1,48E+08	T	C	0,3268	SPINK14	downstream	3,589	0,94	1,34E-04	3,198	1,207	8,08E-03	3,4414	0,7416	3,48E-06
rs1974629	5	1,48E+08	A	G	0,3268	SPINK14	downstream	3,587	0,94	1,36E-04	3,202	1,208	8,03E-03	3,4418	0,7419	3,49E-06

Marker								PHSS			Milan-HCTZ			Meta-analysis		
SNPID	chr	position	risk allele	other allele	freq risk allele	gene	location	beta	SE	p-value	beta	SE	p-value	beta	SE	p-value
rs1558410	5	1,48E+08	G	A	0,6729	SPINK14	downstream	3,586	0,94	1,36E-04	3,203	1,208	8,02E-03	-3,4416	0,7419	3,50E-06
rs9885020	5	1,48E+08	C	T	0,6324	-	-	3,254	0,967	7,64E-04	4,075	1,26	1,22E-03	-3,5583	0,7671	3,51E-06
rs2400498	5	1,48E+08	T	C	0,3267	SPINK14	downstream	3,584	0,939	1,35E-04	3,166	1,195	8,08E-03	3,4244	0,7383	3,52E-06
rs35491588	5	1,48E+08	G	C	0,6681	-	-	3,409	0,945	3,09E-04	3,563	1,223	3,57E-03	-3,4666	0,7478	3,56E-06
rs10043288	5	1,48E+08	G	A	0,6337	-	-	3,352	0,964	5,10E-04	3,844	1,255	2,19E-03	-3,5346	0,7645	3,78E-06
rs2400488	5	1,48E+08	A	G	0,3153	-	-	3,65	0,966	1,58E-04	3,197	1,194	7,42E-03	3,4708	0,751	3,81E-06
rs13179181	5	1,48E+08	C	T	0,6596	-	-	3,257	0,938	5,19E-04	3,749	1,225	2,21E-03	-3,4388	0,7447	3,88E-06
rs7717500	5	1,48E+08	T	C	0,316	-	-	3,647	0,966	1,59E-04	3,179	1,192	7,66E-03	3,4615	0,7505	3,98E-06
rs9915451	17	54433211	A	G	0,2149	ANKFN1	intron	3,961	1,138	5,01E-04	4,376	1,443	2,43E-03	4,1201	0,8936	4,01E-06
rs35217112	5	1,48E+08	G	A	0,6665	-	-	3,358	0,943	3,71E-04	3,582	1,222	3,37E-03	-3,4416	0,7466	4,03E-06
rs6871633	5	1,48E+08	C	A	0,6649	-	-	3,357	0,943	3,72E-04	3,583	1,222	3,37E-03	-3,4414	0,7466	4,03E-06
rs62950160	5	1,48E+08	A	G	0,3406	-	-	3,265	0,939	5,07E-04	3,707	1,221	2,39E-03	3,4293	0,7443	4,08E-06
rs36056267	5	1,48E+08	T	C	0,3335	-	-	3,354	0,943	3,76E-04	3,582	1,222	3,37E-03	3,4391	0,7466	4,09E-06
rs34258096	5	1,48E+08	A	G	0,3335	-	-	3,357	0,944	3,75E-04	3,582	1,222	3,38E-03	3,4411	0,7471	4,10E-06
rs10059441	5	1,48E+08	A	G	0,3335	-	-	3,349	0,943	3,82E-04	3,581	1,222	3,38E-03	3,4356	0,7466	4,19E-06
5:147564699	5	1,48E+08	R	I	0,6564	-	-	3,306	0,94	4,34E-04	3,589	1,21	3,01E-03	-3,4125	0,7423	4,28E-06
5:147564823	5	1,48E+08	R	D	0,6421	-	-	3,362	0,954	4,25E-04	3,693	1,248	3,08E-03	-3,4841	0,7579	4,29E-06
rs13154742	5	1,48E+08	A	G	0,329	SPINK14	downstream	3,576	0,941	1,45E-04	3,144	1,213	9,51E-03	3,4137	0,7435	4,40E-06
rs12717963	5	1,48E+08	C	T	0,6626	-	-	3,243	0,938	5,43E-04	3,689	1,216	2,42E-03	-3,4094	0,7427	4,42E-06
rs11189015	10	98911936	C	G	0,0325	SLIT1	intron	-9,365	3,243	3,88E-03	-10,664	2,984	3,52E-04	-	2,1959	4,54E-06
rs10052031	5	1,48E+08	A	C	0,3267	SPINK14	intron	3,545	0,941	1,66E-04	3,159	1,207	8,85E-03	3,3991	0,7421	4,64E-06
5:147575340	5	1,48E+08	D	R	0,3364	-	-	3,279	0,946	5,28E-04	3,692	1,232	2,72E-03	3,4322	0,7503	4,78E-06
rs9885208	5	1,48E+08	T	C	0,3503	-	-	3,302	0,958	5,71E-04	3,653	1,214	2,61E-03	3,4367	0,752	4,88E-06
rs6868569	5	1,48E+08	T	G	0,3365	-	-	3,267	0,937	4,86E-04	3,598	1,215	3,06E-03	3,3904	0,742	4,89E-06
rs6896988	5	1,48E+08	T	C	0,3371	-	-	3,269	0,938	4,96E-04	3,592	1,218	3,19E-03	3,3892	0,7432	5,10E-06
rs6870548	5	1,48E+08	G	A	0,6629	-	-	3,271	0,939	4,92E-04	3,592	1,218	3,20E-03	-3,3907	0,7437	5,13E-06
rs6872890	5	1,48E+08	T	C	0,3148	-	-	3,644	0,965	1,60E-04	3,044	1,183	1,01E-02	3,4043	0,7478	5,30E-06
5:147554997	5	1,48E+08	R	D	0,6686	-	-	3,555	0,941	1,59E-04	3,07	1,201	1,06E-02	-3,3705	0,7407	5,36E-06
rs7702990	5	1,48E+08	T	C	0,3375	-	-	3,24	0,935	5,32E-04	3,591	1,214	3,10E-03	3,3707	0,7408	5,36E-06

Marker								PHSS			Milan-HCTZ			Meta-analysis		
SNPID	chr	position	risk allele	other allele	freq risk allele	gene	location	beta	SE	p-value	beta	SE	p-value	beta	SE	p-value
rs6867695	5	1,48E+08	T	C	0,3384	-	-	3,231	0,935	5,53E-04	3,602	1,215	3,04E-03	3,369	0,741	5,45E-06
rs7716861	5	1,48E+08	G	A	0,6626	-	-	3,23	0,934	5,47E-04	3,592	1,214	3,08E-03	-3,3646	0,7403	5,49E-06
rs9325087	5	1,48E+08	C	T	0,6625	-	-	3,233	0,935	5,43E-04	3,592	1,214	3,08E-03	-3,3667	0,7408	5,50E-06
rs10041939	5	1,48E+08	G	T	0,6626	-	-	3,229	0,934	5,48E-04	3,592	1,214	3,08E-03	-3,364	0,7403	5,51E-06
5:147564419	5	1,48E+08	R	D	0,6626	-	-	3,234	0,935	5,43E-04	3,592	1,215	3,11E-03	-3,3672	0,741	5,52E-06
rs6864124	5	1,48E+08	A	C	0,3365	-	-	3,235	0,937	5,55E-04	3,604	1,216	3,03E-03	3,3725	0,7422	5,53E-06
rs2400489	5	1,48E+08	T	C	0,3527	-	-	3,69	1,006	2,45E-04	3,249	1,236	8,60E-03	3,5143	0,7802	6,66E-06
rs10067334	5	1,48E+08	A	C	0,3603	SPINK14	upstream	3,277	0,929	4,21E-04	3,461	1,237	5,13E-03	3,3434	0,7428	6,77E-06
rs7703690	5	1,48E+08	G	C	0,3607	SPINK14	intron	-3,276	0,93	4,28E-04	-3,458	1,238	5,21E-03	3,3417	0,7436	6,99E-06
5:147549507	5	1,48E+08	I	R	0,6387	-	-	-3,278	0,931	4,29E-04	-3,456	1,238	5,26E-03	-3,3423	0,7441	7,06E-06
rs8073797	17	54432502	T	G	0,208	ANKFN1	intron	3,969	1,161	6,31E-04	4,278	1,472	3,67E-03	4,0875	0,9116	7,33E-06
rs9885451	5	1,48E+08	C	T	0,3652	SPINK14	intron	-3,265	0,93	4,45E-04	-3,456	1,24	5,31E-03	3,3338	0,744	7,43E-06
rs11993031	8	2809581	A	T	0,4964	CSMD1	intron	2,759	0,923	2,80E-03	4,535	1,291	4,41E-04	3,3597	0,7508	7,65E-06
rs12189210	5	1,48E+08	G	A	0,3655	SPINK14	downstream	-3,255	0,93	4,65E-04	-3,462	1,242	5,30E-03	3,3294	0,7444	7,74E-06
rs4499819	5	1,48E+08	G	A	0,3663	SPINK14	downstream	-3,23	0,931	5,24E-04	-3,507	1,247	4,91E-03	3,3291	0,746	8,10E-06
rs9885270	5	1,48E+08	A	G	0,3502	-	-	3,239	0,949	6,41E-04	3,544	1,232	4,02E-03	3,3526	0,7518	8,22E-06
4:106126664	4	1,06E+08	I	R	0,0933	-	-	5,877	1,494	8,36E-05	4,487	2,08	3,10E-02	5,4039	1,2134	8,45E-06
5:147549663	5	1,48E+08	D	R	0,6363	-	-	-3,238	0,935	5,30E-04	-3,473	1,244	5,24E-03	-3,3228	0,7474	8,76E-06
rs12522694	5	1,48E+08	A	C	0,6313	-	-	-3,172	0,933	6,78E-04	-3,623	1,261	4,06E-03	-3,3316	0,75	8,92E-06
rs7726994	5	1,48E+08	A	T	0,6288	SPINK14	intron	-3,335	0,939	3,83E-04	-3,374	1,266	7,70E-03	-3,3488	0,7542	8,98E-06
rs12505746	4	1,06E+08	G	A	0,9074	TET2	intron	5,945	1,52	9,17E-05	4,487	2,08	3,10E-02	-5,4374	1,2272	9,40E-06
rs7698522	4	1,06E+08	C	T	0,9074	TET2	intron	5,944	1,52	9,17E-05	4,487	2,08	3,10E-02	-5,4368	1,2272	9,42E-06
rs11813810	10	55228586	T	C	0,1992	-	intron	-4,442	1,254	3,97E-04	-4,275	1,611	7,94E-03	-4,379	0,9895	9,63E-06
rs7576168	2	1,17E+08	T	G	0,4736	-	-	-3,434	0,973	4,17E-04	-3,261	1,221	7,57E-03	-3,3668	0,7609	9,67E-06
5:147592991	5	1,48E+08	R	D	0,949	-	-	-6,714	2,081	1,25E-03	-8,735	2,836	2,07E-03	7,4213	1,6778	9,72E-06
rs11782820	8	2809792	A	T	0,4948	CSMD1	intron	2,712	0,927	3,46E-03	4,489	1,284	4,70E-04	3,3209	0,7516	9,94E-06
5:147571885	5	1,48E+08	I	R	0,3755	-	-	2,948	0,932	1,56E-03	4,066	1,285	1,55E-03	3,3334	0,7545	9,95E-06

Tabella 4. Risultati dell'associazione genome-wide per la risposta pressoria diastolica (DBP) all'idroclorotiazide nelle due coorti (PHSS e HCTZ Milano) e nella meta-analisi (SNPs with HCTZ meta-analysis p-value < 1x10⁻⁵). Tutti gli SNPs imputati hanno una qualità di imputazione (Rsq) ≥ 0.8. La risposta pressoria diastolica all'HCTZ è stata valutata usando un'analisi di regressione lineare sotto un modello additivo usando sesso, età, DBP basale e le componenti principali come covariate. Per recuperare maggiori informazioni sugli SNPs e sul loro contesto genomico (il gene più vicino) abbiamo usato l'hg19 assembly (National Center for Biotechnology Information 37). SNPID indica il polimorfismo a singolo nucleotide, chr: cromosoma e SE: errore standard.

Marker								PHSS			Milan-HCTZ			Meta-analysis		
SNPID	chr	position	risk allele	other allele	freq risk allele	gene	location	beta	SE	p-value	beta	SE	p-value	beta	SE	p-value
rs7130887	11	1,22E+08	T	G	0,1527	-	-	3,999	0,966	3,51E-05	3,135	1,215	9,88E-03	3,6644	0,7561	1,26E-06
rs4431329	5	1,08E+08	A	T	0,4054	FBXL17	intron	3,353	0,743	6,45E-06	2,055	1,008	4,15E-02	2,896	0,5981	1,28E-06
rs1375016	11	1,22E+08	C	T	0,8513	-	-	4,082	0,966	2,37E-05	3,038	1,245	1,47E-02	-3,6897	0,7632	1,34E-06
rs1579921	11	1,22E+08	T	C	0,1529	-	-	3,969	0,962	3,67E-05	3,068	1,205	1,09E-02	3,6183	0,7518	1,49E-06
11:121690503	11	1,22E+08	I	R	0,154	-	-	3,968	0,962	3,68E-05	2,98	1,169	1,08E-02	3,5691	0,7428	1,55E-06
rs74353562	11	1,22E+08	C	T	0,8528	-	-	4,382	1,026	1,96E-05	3,059	1,31	1,95E-02	-3,879	0,8077	1,57E-06
rs11824638	11	1,22E+08	T	C	0,1531	-	-	4,183	0,977	1,84E-05	2,901	1,266	2,20E-02	3,7045	0,7735	1,67E-06
rs881754	11	1,22E+08	C	T	0,853	-	-	4,077	0,967	2,49E-05	2,948	1,25	1,83E-02	-3,6543	0,7648	1,77E-06
rs76903606	11	1,22E+08	C	A	0,8521	-	-	4,296	1,009	2,08E-05	2,904	1,249	2,01E-02	-3,7463	0,7849	1,81E-06
11:121732190	11	1,22E+08	D	R	0,1491	-	-	4,125	0,96	1,72E-05	2,797	1,248	2,50E-02	3,6313	0,7609	1,82E-06
rs111611915	11	1,22E+08	T	C	0,1484	-	-	4,087	0,967	2,38E-05	2,829	1,247	2,33E-02	3,6146	0,7642	2,24E-06
rs77683977	11	1,22E+08	G	C	0,8524	-	-	4,085	0,966	2,38E-05	2,831	1,251	2,36E-02	-3,6166	0,7646	2,24E-06
rs151249748	11	1,22E+08	C	G	0,1476	-	-	4,083	0,966	2,37E-05	2,829	1,248	2,34E-02	3,6132	0,7639	2,25E-06
rs75738575	11	1,22E+08	C	T	0,8523	-	-	4,172	0,985	2,28E-05	2,789	1,222	2,25E-02	-3,6273	0,7669	2,25E-06
rs76462942	11	1,22E+08	T	A	0,8517	-	-	4,078	0,965	2,38E-05	2,828	1,25	2,36E-02	-3,6112	0,7639	2,27E-06
rs78531352	11	1,22E+08	G	C	0,8524	-	-	4,082	0,966	2,37E-05	2,828	1,25	2,36E-02	-3,6131	0,7644	2,28E-06
rs11828273	11	1,22E+08	C	T	0,8511	-	-	4,081	0,966	2,38E-05	2,764	1,21	2,24E-02	-3,5683	0,7549	2,28E-06
rs147667467	11	1,22E+08	T	C	0,1476	-	-	4,078	0,967	2,48E-05	2,832	1,25	2,35E-02	3,6115	0,7648	2,34E-06
rs78050399	11	1,22E+08	A	G	0,1461	-	-	4,159	0,993	2,80E-05	2,892	1,269	2,27E-02	3,6778	0,782	2,57E-06
rs11827633	11	1,22E+08	G	A	0,8517	-	-	4,041	0,967	2,93E-05	2,762	1,209	2,24E-02	-3,542	0,7552	2,73E-06
rs7105411	11	1,22E+08	A	G	0,1483	-	-	4,041	0,967	2,93E-05	2,762	1,209	2,24E-02	3,542	0,7552	2,73E-06
rs80154702	11	1,22E+08	A	G	0,1483	-	-	4,045	0,968	2,93E-05	2,766	1,211	2,23E-02	3,5464	0,7561	2,73E-06
rs7130229	11	1,22E+08	A	C	0,1476	-	-	4,076	0,966	2,46E-05	2,768	1,259	2,80E-02	3,5913	0,7664	2,79E-06
11:121680575	11	1,22E+08	I	R	0,15	-	-	3,995	0,969	3,71E-05	2,846	1,224	2,00E-02	3,5523	0,7597	2,93E-06
rs7706429	5	1,08E+08	A	G	0,3451	FBXL17	intron	2,684	0,693	1,07E-04	2,519	0,964	8,95E-03	2,6278	0,5627	3,01E-06

Marker								PHSS			Milan-HCTZ			Meta-analysis		
SNPID	chr	position	risk allele	other allele	freq risk allele	gene	location	beta	SE	p-value	beta	SE	p-value	beta	SE	p-value
8:142304050	8	1,42E+08	D	R	0,0411	-	-	-	2,284	2,40E-06	-4,524	4,036	2,62E-01	-9,2572	1,9878	3,21E-06
rs10477887	5	1,08E+08	T	C	0,3436	FBXL17	intron	2,683	0,693	1,09E-04	2,497	0,967	9,86E-03	2,6199	0,5633	3,30E-06
11:121748552	11	1,22E+08	D	R	0,147	-	-	4,107	0,991	3,38E-05	2,839	1,263	2,46E-02	3,6238	0,7796	3,35E-06
rs62359548	5	1,08E+08	C	T	0,6441	FBXL17	intron	2,766	0,691	6,26E-05	2,233	0,952	1,90E-02	-2,5821	0,5592	3,89E-06
rs10057896	5	1,08E+08	T	C	0,3559	FBXL17	intron	2,764	0,691	6,31E-05	2,233	0,952	1,90E-02	2,5808	0,5592	3,93E-06
rs1833562	5	1,08E+08	A	G	0,3558	FBXL17	intron	2,766	0,691	6,25E-05	2,219	0,951	1,97E-02	2,577	0,559	4,03E-06
rs10075370	5	1,08E+08	G	A	0,6442	FBXL17	intron	2,765	0,691	6,26E-05	2,219	0,951	1,97E-02	-2,5763	0,559	4,05E-06
rs2076794	5	1,08E+08	C	T	0,6437	FBXL17	intron	2,753	0,69	6,59E-05	2,222	0,952	1,96E-02	-2,5701	0,5587	4,22E-06
rs6869057	5	1,08E+08	G	A	0,6439	FBXL17	intron	2,769	0,691	6,19E-05	2,168	0,947	2,20E-02	-2,5602	0,5582	4,51E-06
5:107598444	5	1,08E+08	R	D	0,6401	-	-	2,749	0,698	8,09E-05	2,298	0,973	1,82E-02	-2,5958	0,5672	4,72E-06
rs10065168	5	1,08E+08	G	A	0,6458	FBXL17	intron	2,692	0,687	8,87E-05	2,269	0,959	1,80E-02	-2,5485	0,5585	5,04E-06
rs2966822	5	1,08E+08	T	C	0,3542	FBXL17	intron	2,692	0,687	8,86E-05	2,268	0,959	1,80E-02	2,5482	0,5585	5,05E-06
rs2966829	5	1,08E+08	C	T	0,6458	FBXL17	intron	2,691	0,687	9,01E-05	2,268	0,959	1,81E-02	-2,5475	0,5585	5,08E-06
rs6880727	5	1,08E+08	A	G	0,3535	FBXL17	intron	2,695	0,688	9,05E-05	2,267	0,959	1,81E-02	2,5496	0,559	5,10E-06
rs2966825	5	1,08E+08	A	G	0,3542	FBXL17	intron	2,69	0,687	9,01E-05	2,268	0,959	1,80E-02	2,5469	0,5585	5,11E-06
rs2966816	5	1,08E+08	C	T	0,6167	FBXL17	intron	2,799	0,703	6,80E-05	2,207	0,969	2,28E-02	-2,5949	0,569	5,11E-06
rs35483103	4	38012837	C	G	0,1409	TBC1D1	intron	-5,224	1,049	6,41E-07	-1,437	1,268	2,57E-01	-3,6853	0,8083	5,13E-06
rs2941698	5	1,08E+08	G	A	0,6458	FBXL17	intron	2,689	0,687	9,00E-05	2,268	0,959	1,80E-02	-2,5462	0,5585	5,14E-06
rs2966823	5	1,08E+08	A	T	0,3542	FBXL17	intron	2,689	0,687	9,00E-05	2,268	0,959	1,80E-02	2,5462	0,5585	5,14E-06
rs10071499	5	1,08E+08	T	G	0,3535	FBXL17	intron	2,694	0,689	9,24E-05	2,273	0,959	1,78E-02	2,5507	0,5596	5,16E-06
rs2966788	5	1,08E+08	T	A	0,6457	FBXL17	intron	2,69	0,686	8,88E-05	2,252	0,958	1,88E-02	-2,5415	0,5577	5,19E-06
rs10040007	5	1,08E+08	C	G	0,3535	FBXL17	intron	2,691	0,689	9,40E-05	2,272	0,959	1,79E-02	2,5484	0,5596	5,26E-06
rs9590353	13	96631221	G	T	0,9179	UGGT2	intron	-3,881	1,24	1,75E-03	-6,169	1,78	5,29E-04	4,6286	1,0175	5,39E-06
5:107613705	5	1,08E+08	R	I	0,6466	-	-	2,701	0,691	9,21E-05	2,26	0,959	1,85E-02	-2,5503	0,5606	5,39E-06
rs9885545	5	1,08E+08	A	T	0,3567	FBXL17	intron	2,665	0,699	1,36E-04	2,409	0,977	1,37E-02	2,5783	0,5685	5,75E-06
rs7733311	5	1,08E+08	G	C	0,6469	FBXL17	intron	2,695	0,691	9,73E-05	2,249	0,959	1,90E-02	-2,5426	0,5606	5,75E-06
rs6594295	5	1,08E+08	C	G	0,3545	FBXL17	intron	2,688	0,686	8,89E-05	2,214	0,956	2,06E-02	2,5269	0,5574	5,80E-06
rs7727051	5	1,08E+08	G	A	0,6441	FBXL17	intron	2,701	0,687	8,45E-05	2,196	0,957	2,18E-02	-2,5293	0,5581	5,84E-06
rs2122156	5	1,08E+08	T	A	0,6275	FBXL17	intron	2,729	0,69	7,67E-05	2,168	0,96	2,39E-02	-2,5379	0,5603	5,91E-06

Marker								PHSS			Milan-HCTZ			Meta-analysis		
SNPID	chr	position	risk allele	other allele	freq risk allele	gene	location	beta	SE	p-value	beta	SE	p-value	beta	SE	p-value
rs4957551	5	1,08E+08	T	C	0,3548	FBXL17	intron	2,691	0,686	8,68E-05	2,192	0,955	2,17E-02	2,5212	0,5572	6,04E-06
rs2966796	5	1,08E+08	T	A	0,6443	FBXL17	intron	2,706	0,687	8,27E-05	2,183	0,963	2,34E-02	-2,5296	0,5593	6,10E-06
rs2966793	5	1,08E+08	A	G	0,3544	FBXL17	intron	2,696	0,686	8,53E-05	2,188	0,961	2,28E-02	2,5245	0,5583	6,14E-06
rs5005385	5	1,08E+08	G	A	0,6456	FBXL17	intron	2,697	0,686	8,49E-05	2,186	0,961	2,29E-02	-2,5245	0,5583	6,14E-06
rs10077527	5	1,08E+08	C	A	0,6472	FBXL17	intron	2,771	0,696	6,85E-05	2,11	0,957	2,75E-02	-2,5423	0,5629	6,28E-06
rs2922432	5	1,08E+08	A	G	0,3543	FBXL17	intron	2,698	0,686	8,46E-05	2,17	0,96	2,38E-02	2,5195	0,5581	6,36E-06
rs113095083	2	2,39E+08	C	T	0,9284	ILKAP	intron	-6,33	1,705	2,05E-04	-7,078	2,746	9,96E-03	6,5381	1,4485	6,37E-06
rs9763671	5	1,19E+08	T	G	0,1674	-	-	-4,258	0,941	6,08E-06	-1,852	1,206	1,25E-01	-3,3475	0,7419	6,42E-06
rs10055322	5	1,08E+08	C	T	0,6466	FBXL17	intron	2,697	0,686	8,52E-05	2,173	0,963	2,40E-02	-2,5206	0,5587	6,44E-06
19:53844324	19	53844324	I	R	0,2407	-	-	-4,008	0,966	3,34E-05	-3,053	1,661	6,61E-02	-3,7666	0,835	6,46E-06
rs2922425	5	1,08E+08	C	T	0,6457	FBXL17	intron	2,701	0,686	8,35E-05	2,156	0,959	2,45E-02	-2,5165	0,5579	6,47E-06
rs2966800	5	1,08E+08	T	G	0,3543	FBXL17	intron	2,7	0,686	8,38E-05	2,156	0,958	2,45E-02	2,5156	0,5577	6,47E-06
rs13146688	4	38011394	A	G	0,1394	TBC1D1	intron	-5,159	1,051	9,11E-07	-1,451	1,268	2,52E-01	-3,649	0,8092	6,50E-06
rs2910791	5	1,08E+08	A	T	0,3542	FBXL17	intron	2,7	0,687	8,42E-05	2,158	0,959	2,44E-02	2,5162	0,5585	6,63E-06
rs117103226	13	60232310	T	C	0,056	-	-	5,97	1,884	1,53E-03	6,043	1,887	1,37E-03	6,0064	1,3332	6,63E-06
rs2922421	5	1,08E+08	G	A	0,6458	FBXL17	intron	2,7	0,687	8,37E-05	2,155	0,958	2,45E-02	-2,5149	0,5583	6,65E-06
rs10070927	5	1,08E+08	G	A	0,6451	FBXL17	intron	2,696	0,686	8,56E-05	2,154	0,958	2,45E-02	-2,5123	0,5577	6,66E-06
rs2966804	5	1,08E+08	G	A	0,6458	FBXL17	intron	2,7	0,687	8,41E-05	2,156	0,959	2,45E-02	-2,5155	0,5585	6,66E-06
rs2922418	5	1,08E+08	T	C	0,3542	FBXL17	intron	2,699	0,687	8,47E-05	2,156	0,959	2,45E-02	2,5148	0,5585	6,70E-06
rs188271015	11	1,22E+08	T	A	0,8858	-	-	4,855	1,16	2,84E-05	2,956	1,529	5,33E-02	-4,1613	0,9241	6,71E-06
rs2966813	5	1,08E+08	A	G	0,3541	FBXL17	intron	2,702	0,687	8,40E-05	2,159	0,964	2,51E-02	2,5191	0,5595	6,71E-06
rs2966828	5	1,08E+08	T	C	0,3549	FBXL17	intron	2,702	0,687	8,37E-05	2,149	0,959	2,50E-02	2,5145	0,5585	6,72E-06
rs76891333	3	28080972	C	T	0,9765	-	-	-7,558	2,694	5,02E-03	-	3,14	2,68E-04	9,2052	2,0446	6,73E-06
rs2922417	5	1,08E+08	T	C	0,3542	FBXL17	intron	2,698	0,687	8,49E-05	2,156	0,959	2,46E-02	2,5142	0,5585	6,74E-06
rs2966814	5	1,08E+08	C	T	0,6458	FBXL17	intron	2,698	0,687	8,51E-05	2,156	0,959	2,46E-02	-2,5142	0,5585	6,74E-06
rs158168	5	1,08E+08	A	G	0,3581	FBXL17	intron	2,707	0,69	8,82E-05	2,162	0,959	2,41E-02	2,5211	0,5601	6,76E-06
rs2966827	5	1,08E+08	C	T	0,6451	FBXL17	intron	2,695	0,686	8,62E-05	2,15	0,958	2,48E-02	-2,5103	0,5577	6,77E-06
rs4395619	5	1,08E+08	A	T	0,3542	FBXL17	intron	2,697	0,687	8,56E-05	2,156	0,959	2,45E-02	2,5135	0,5585	6,78E-06
5:41596469	5	41596469	D	R	0,3837	-	-	-2,645	0,736	3,24E-04	-2,453	0,904	6,66E-03	-2,5685	0,5708	6,79E-06

Marker								PHSS			Milan-HCTZ			Meta-analysis		
SNPID	chr	position	risk allele	other allele	freq risk allele	gene	location	beta	SE	p-value	beta	SE	p-value	beta	SE	p-value
rs75609975	5	41571018	A	C	0,3603	-	-	-2,717	0,755	3,18E-04	-2,583	0,956	6,91E-03	-2,6655	0,5925	6,84E-06
rs2922422	5	1,08E+08	A	G	0,3561	FBXL17	intron	2,675	0,684	9,27E-05	2,168	0,96	2,39E-02	2,5043	0,5571	6,94E-06
rs2922408	5	1,08E+08	A	C	0,3549	FBXL17	intron	2,691	0,686	8,81E-05	2,139	0,958	2,56E-02	2,5039	0,5577	7,15E-06
rs2966821	5	1,08E+08	A	C	0,3549	FBXL17	intron	2,69	0,686	8,83E-05	2,137	0,958	2,57E-02	2,5026	0,5577	7,23E-06
rs72907861	18	39202390	T	G	0,156	-	-	2,88	0,898	1,33E-03	4,11	1,271	1,22E-03	3,2896	0,7334	7,28E-06
rs72907862	18	39203901	A	G	0,156	-	-	2,88	0,898	1,34E-03	4,11	1,271	1,22E-03	3,2896	0,7334	7,28E-06
rs34387	5	1,08E+08	A	C	0,3532	FBXL17	intron	2,624	0,687	1,33E-04	2,234	0,941	1,76E-02	2,4884	0,5549	7,30E-06
rs9375876	6	1,33E+08	T	C	0,3147	MOXD1	intron	3,105	0,714	1,36E-05	1,686	1,092	1,23E-01	2,68	0,5976	7,30E-06
rs72909913	18	39205657	G	A	0,844	-	-	2,88	0,899	1,36E-03	4,11	1,271	1,22E-03	-3,2902	0,734	7,37E-06
20:19046645	20	19046645	D	R	0,2386	-	-	-2,471	0,751	9,96E-04	-3,574	1,137	1,67E-03	-2,806	0,6266	7,54E-06
rs286763	5	1,08E+08	T	C	0,3549	FBXL17	intron	2,695	0,687	8,83E-05	2,12	0,958	2,69E-02	2,4997	0,5583	7,55E-06
rs74426495	12	89421923	C	T	0,9815	-	-	17,817	3,644	1,01E-06	5,15	3,926	1,90E-01	-	2,6708	7,60E-06
rs2966818	5	1,08E+08	T	C	0,3512	FBXL17	intron	2,706	0,694	9,69E-05	2,168	0,968	2,51E-02	2,5233	0,564	7,68E-06
rs7448343	5	41607044	G	T	0,8133	-	-	-3,54	1,083	1,08E-03	-4,233	1,375	2,09E-03	3,8053	0,8508	7,72E-06
rs636053	5	41570696	A	C	0,3623	-	-	-2,886	0,78	2,17E-04	-2,428	0,957	1,12E-02	-2,7032	0,6046	7,79E-06
rs9574319	13	79433560	G	C	0,9072	-	-	-4,773	1,458	1,06E-03	-6,249	2,015	1,93E-03	5,2802	1,1812	7,82E-06
rs2966802	5	1,08E+08	A	T	0,3565	FBXL17	intron	2,702	0,687	8,41E-05	2,07	0,945	2,86E-02	2,4835	0,5557	7,85E-06
rs72909922	18	39218641	C	T	0,8447	-	-	2,876	0,903	1,45E-03	4,11	1,271	1,22E-03	-3,2899	0,7361	7,85E-06
5:107559520	5	1,08E+08	R	I	0,648	-	-	2,702	0,694	9,81E-05	2,151	0,96	2,51E-02	-2,5129	0,5624	7,90E-06
rs2966803	5	1,08E+08	A	C	0,3565	FBXL17	intron	2,702	0,687	8,40E-05	2,069	0,946	2,87E-02	2,4834	0,5559	7,91E-06
rs6881879	5	1,08E+08	G	C	0,6457	FBXL17	intron	2,714	0,691	8,68E-05	2,073	0,945	2,82E-02	-2,4907	0,5578	8,00E-06
rs72909925	18	39221365	C	A	0,8447	-	-	2,874	0,904	1,48E-03	4,11	1,271	1,22E-03	-3,2892	0,7367	8,01E-06
rs9375877	6	1,33E+08	G	A	0,6894	MOXD1	intron	2,995	0,712	2,57E-05	1,88	1,093	8,54E-02	-2,6628	0,5966	8,07E-06
rs34795399	19	30653004	A	G	0,1589	-	-	-4,456	1,108	5,78E-05	-2,941	1,391	3,45E-02	-3,8679	0,8667	8,08E-06
rs9388986	6	1,33E+08	T	C	0,3106	MOXD1	intron	2,993	0,712	2,64E-05	1,88	1,093	8,56E-02	2,6614	0,5966	8,16E-06
rs2966820	5	1,08E+08	T	C	0,3558	FBXL17	intron	2,694	0,687	8,73E-05	2,071	0,945	2,85E-02	2,4786	0,5557	8,18E-06
rs78026375	11	1,22E+08	T	G	0,1105	-	-	4,78	1,155	3,49E-05	2,867	1,47	5,12E-02	4,0498	0,9082	8,23E-06
rs6081476	20	19056735	C	T	0,7667	-	-	-2,486	0,748	8,93E-04	-3,477	1,136	2,20E-03	2,7857	0,6247	8,23E-06
rs72909931	18	39224855	A	G	0,1553	-	-	2,87	0,905	1,52E-03	4,11	1,271	1,22E-03	3,2872	0,7372	8,24E-06

Marker								PHSS			Milan-HCTZ			Meta-analysis		
SNPID	chr	position	risk allele	other allele	freq risk allele	gene	location	beta	SE	p-value	beta	SE	p-value	beta	SE	p-value
rs2966831	5	1,08E+08	A	G	0,3544	FBXL17	intron	2,691	0,689	9,44E-05	2,091	0,946	2,71E-02	2,483	0,5569	8,26E-06
rs6863456	5	1,08E+08	G	A	0,6456	FBXL17	intron	2,692	0,689	9,36E-05	2,089	0,946	2,72E-02	-2,483	0,5569	8,26E-06
rs62218700	20	19056677	T	A	0,7667	-	-	-2,485	0,748	8,96E-04	-3,477	1,136	2,20E-03	2,785	0,6247	8,28E-06
5:107559522	5	1,08E+08	R	I	0,6474	-	-	2,697	0,695	1,04E-04	2,15	0,96	2,52E-02	-2,5089	0,563	8,33E-06
rs2909791	5	1,08E+08	T	C	0,3544	FBXL17	intron	2,689	0,689	9,49E-05	2,086	0,946	2,74E-02	2,48	0,5569	8,47E-06
rs6885988	5	1,08E+08	T	G	0,3544	FBXL17	intron	2,698	0,69	9,26E-05	2,075	0,945	2,81E-02	2,4814	0,5573	8,48E-06
rs41130	5	1,08E+08	A	G	0,3529	FBXL17	intron	2,622	0,689	1,41E-04	2,193	0,937	1,92E-02	2,4714	0,5551	8,49E-06
18:39219405	18	39219405	D	R	0,1574	-	-	2,831	0,894	1,54E-03	4,109	1,271	1,22E-03	3,254	0,7312	8,59E-06
rs73603599	20	19056171	T	C	0,2333	-	-	-2,477	0,748	9,34E-04	-3,477	1,136	2,20E-03	-2,7794	0,6247	8,63E-06
rs72909965	18	39247642	A	G	0,1543	-	-	2,874	0,913	1,65E-03	4,182	1,287	1,15E-03	3,3119	0,7447	8,69E-06
rs72909941	18	39229860	G	A	0,8454	-	-	2,862	0,907	1,59E-03	4,11	1,271	1,22E-03	-3,2831	0,7383	8,71E-06
rs72909959	18	39243996	T	C	0,1546	-	-	2,862	0,908	1,62E-03	4,113	1,273	1,23E-03	3,2838	0,7392	8,90E-06
rs9948369	18	39225425	C	A	0,8433	-	-	2,819	0,896	1,65E-03	4,116	1,271	1,20E-03	-3,2496	0,7323	9,11E-06
6:132684049	6	1,33E+08	D	R	0,2924	-	-	3,247	0,741	1,17E-05	1,598	1,149	1,64E-01	2,7626	0,6227	9,15E-06
rs2922431	5	1,08E+08	C	T	0,6443	FBXL17	intron	2,699	0,686	8,42E-05	2,036	0,961	3,41E-02	-2,4752	0,5583	9,29E-06
rs77876672	13	60319019	T	C	0,0569	DIAPH3	intron	5,528	1,792	2,04E-03	5,751	1,809	1,48E-03	5,6384	1,2731	9,47E-06
rs40065	5	1,08E+08	G	A	0,6467	FBXL17	intron	2,633	0,688	1,29E-04	2,103	0,927	2,33E-02	-2,4448	0,5525	9,64E-06
rs40066	5	1,08E+08	G	A	0,6467	FBXL17	intron	2,632	0,688	1,30E-04	2,103	0,927	2,33E-02	-2,4441	0,5525	9,69E-06

MARKERS INFORMATION								PHSS			Milan-HCTZ			Meta-analysis		
SNP	chr	position	risk allele	other allele	Risk allele freq	gene	location	beta	SE	p-value	beta	SE	p-value	beta	SE	p-value
rs12505746	4	106114071	A	G	0.91	TET2	intron	-5.94	1.52	9.17E-05	-4.49	2.08	3.10E-02	-5.44	1.23	9.40E-06
rs7387065	8	2903020	A	G	0.55	CSMD1	intron	-3.83	0.90	2.09E-05	-2.85	1.25	2.25E-02	-3.49	0.73	1.71E-06
rs11993031	8	2809581	T	A	0.51	CSMD1	intron	-2.76	0.92	2.80E-03	-4.53	1.29	4.41E-04	-3.36	0.75	7.65E-06
rs9285669	5	147546452	A	T	0.66	SPINK14	upstream	-3.78	0.96	8.81E-05	-3.72	1.22	2.39E-03	-3.76	0.76	7.09E-07
rs11189015	10	98911936	C	G	0.03	SLIT1	intron	-9.36	3.24	3.88E-03	-10.66	2.98	3.52E-04	-10.07	2.20	4.54E-06
rs9915451	17	54433211	G	A	0.79	ANKFN1	intron	-3.96	1.14	5.01E-04	-4.38	1.44	2.43E-03	-4.12	0.89	4.01E-06

Tabella 5. Risultati di associazione per la risposta della SBP all' idroclorotiazide nelle due coorti e in meta-analisi. La risposta SBP all' idroclorotiazide è stata valutata utilizzando l'analisi di regressione lineare in virtù di un modello additivo con sesso, età, SBP basale e le componenti principali (PC) ancestrali come covariate. Per recuperare le informazioni sui polimorfismi a singolo nucleotide e il loro contesto genomico (il gene più vicino) abbiamo usato la versione hg19 del genoma umano (NCBI). SNP: polimorfismo a singolo nucleotide; chr: cromosoma; bp: coppie di basi; e SE: errore standard.

SNP	MARKERS INFORMATION							PHSS			Milan-HCTZ			Meta-analysis		
	chr	position	risk allele	other allele	Risk allele freq	gene	location	beta	SE	p-value	beta	SE	p-value	beta	SE	p-value
rs4431329	5	107588958	T	A	0.59	FBXL17	intron	-3.35	0.74	6.45E-06	-2.05	1.01	4.15E-02	-2.90	0.60	1.28E-06
rs7706429	5	107586783	G	A	0.65	FBXL17	intron	-2.68	0.69	1.07E-04	-2.52	0.96	8.95E-03	-2.63	0.56	3.01E-06
rs9590353	13	96631221	G	T	0.08	UGGT2	intron	-3.88	1.24	1.75E-03	-6.17	1.78	5.29E-04	-4.63	1.02	5.39E-06
rs113095083	2	239105715	C	T	0.07	ILKAP	intron	-6.33	1.71	2.05E-04	-7.08	2.75	9.96E-03	-6.54	1.45	6.37E-06
rs77876672	13	60319019	C	T	0.94	DIAPH3	intron	-5.53	1.79	2.04E-03	-5.75	1.81	1.48E-03	-5.64	1.27	9.47E-06

Tabella 6. Risultati di associazione per la risposta della DBP all' idroclorotiazide nelle due coorti e in meta-analisi. La risposta DBP all' idroclorotiazide è stata valutata utilizzando l'analisi di regressione lineare in virtù di un modello additivo con sesso, età, DBP basale e le componenti principali (PC) ancestrali come covariate. Per recuperare le informazioni sui polimorfismi a singolo nucleotide e il loro contesto genomico (il gene più vicino) abbiamo usato la versione hg19 del genoma umano (NCBI). SNP: polimorfismo a singolo nucleotide; chr: cromosoma; bp: coppie di basi; e SE: errore standard.

Tabella 7. Risultati dell'associazione genome-wide per la risposta pressoria sistolica (SBP) all'idroclorotiazide (HCTZ) in meta-analisi e al losartan (SNPs with HCTZ meta-analysis p-value < 1×10^{-5}). Tutti gli SNPs imputati hanno una qualità di imputazione (Rsq) ≥ 0.8 . La risposta pressoria sistolica all'HCTZ e al Losartan è stata valutata usando un'analisi di regressione lineare sotto un modello additivo usando sesso, età, SBP basale e le componenti principali come covariate. Per recuperare maggiori informazioni sugli SNPs e sul loro contesto genomico (il gene più vicino) abbiamo usato l'hg19 assembly (National Center for Biotechnology Information 37). SNPID indica il polimorfismo a singolo nucleotide, chr: cromosoma e SE: errore standard.

Marker								Meta-analysis			Losartan cohort		
SNPID	chr	position	risk allele	other allele	freq risk allele	gene	location	beta	SE	p-value	beta	SE	p-value
rs9285669	5	1,48E+08	T	A	0,6604	SPINK14	upstream	-3,7591	0,758	7,09E-07	-0,826	0,625	1,86E-01
21:46561448	21	46561448	D	R	0,0363	-	-	-11,6056	2,3963	1,28E-06	-0,977	2,337	6,76E-01
rs7387065	8	2903020	G	A	0,5532	CSMD1	intron	-3,492	0,7298	1,71E-06	0,795	0,609	1,92E-01
5:147544667	5	1,48E+08	R	D	0,6784	-	-	-3,6026	0,754	1,77E-06	-0,833	0,626	1,84E-01
rs6888900	5	1,48E+08	T	C	0,3215	-	-	3,6033	0,7542	1,78E-06	-0,826	0,626	1,87E-01
rs9654500	5	1,48E+08	G	A	0,6804	-	-	-3,5865	0,7533	1,92E-06	-0,825	0,625	1,87E-01
rs9654501	5	1,48E+08	T	C	0,3196	-	-	3,5865	0,7533	1,92E-06	-0,825	0,625	1,87E-01
rs13360182	5	1,48E+08	A	T	0,3202	SPINK14	upstream	3,5863	0,7533	1,93E-06	-0,825	0,625	1,87E-01
rs10075227	5	1,48E+08	T	C	0,3202	SPINK14	upstream	3,5863	0,7533	1,93E-06	-0,825	0,625	1,87E-01
rs6863271	5	1,48E+08	G	C	0,6798	SPINK14	upstream	-3,5863	0,7533	1,93E-06	-0,825	0,625	1,87E-01
rs9654491	5	1,48E+08	T	C	0,3202	SPINK14	upstream	3,5863	0,7533	1,93E-06	-0,825	0,625	1,87E-01
rs6864133	5	1,48E+08	C	T	0,6798	SPINK14	upstream	-3,5863	0,7533	1,93E-06	-0,825	0,625	1,87E-01
rs9654502	5	1,48E+08	G	A	0,6804	-	-	-3,5863	0,7533	1,93E-06	-0,825	0,625	1,87E-01
rs10065999	5	1,48E+08	C	T	0,6794	SPINK14	upstream	-3,585	0,7533	1,94E-06	-0,826	0,625	1,87E-01
rs9654490	5	1,48E+08	G	A	0,6778	-	-	-3,6328	0,7667	2,15E-06	-0,797	0,641	2,13E-01
rs10068916	5	1,48E+08	T	C	0,3595	SPINK14	upstream	3,4379	0,728	2,33E-06	-0,806	0,609	1,86E-01
rs10068913	5	1,48E+08	T	C	0,3595	SPINK14	upstream	3,4389	0,7283	2,34E-06	-0,806	0,609	1,86E-01
rs2191680	5	1,48E+08	C	T	0,6778	SPINK14	upstream	-3,5127	0,7451	2,42E-06	-0,832	0,623	1,82E-01
rs6894796	5	1,48E+08	T	C	0,3211	SPINK14	upstream	3,5373	0,7511	2,48E-06	-0,826	0,625	1,86E-01
rs4452547	5	1,48E+08	C	T	0,6765	SPINK14	downstream	-3,4838	0,7405	2,54E-06	-0,837	0,622	1,78E-01

Marker								Meta-analysis			Losartan cohort		
SNPID	chr	position	risk allele	other allele	freq risk allele	gene	location	beta	SE	p-value	beta	SE	p-value
rs4270684	5	1,48E+08	C	T	0,6765	SPINK14	downstream	-3,4838	0,7405	2,54E-06	-0,837	0,622	1,78E-01
rs9325078	5	1,48E+08	G	A	0,6768	SPINK14	upstream	-3,4901	0,742	2,55E-06	-0,834	0,622	1,80E-01
5:147557444	5	1,48E+08	R	D	0,6744	-	-	-3,4849	0,741	2,56E-06	-0,876	0,627	1,63E-01
rs9325077	5	1,48E+08	A	G	0,3232	SPINK14	upstream	3,492	0,7427	2,58E-06	-0,834	0,622	1,80E-01
rs9285670	5	1,48E+08	T	A	0,6768	SPINK14	upstream	-3,4885	0,742	2,58E-06	-0,834	0,622	1,80E-01
rs4254894	5	1,48E+08	T	C	0,3232	SPINK14	upstream	3,4885	0,742	2,58E-06	-0,834	0,622	1,80E-01
rs6898191	5	1,48E+08	G	A	0,6829	-	-	-3,5737	0,7602	2,59E-06	-0,799	0,634	2,08E-01
rs4623135	5	1,48E+08	A	G	0,3232	SPINK14	upstream	3,4878	0,742	2,59E-06	-0,835	0,622	1,80E-01
rs9325079	5	1,48E+08	C	T	0,6768	SPINK14	upstream	-3,4877	0,742	2,59E-06	-0,851	0,623	1,72E-01
rs10068904	5	1,48E+08	T	C	0,3232	SPINK14	upstream	3,4833	0,7412	2,61E-06	-0,835	0,622	1,80E-01
rs10068922	5	1,48E+08	T	C	0,3231	SPINK14	upstream	3,4809	0,7407	2,61E-06	-0,837	0,622	1,79E-01
rs9325080	5	1,48E+08	T	C	0,3235	SPINK14	upstream	3,4866	0,7422	2,63E-06	-0,836	0,623	1,79E-01
rs4269285	5	1,48E+08	T	C	0,3235	SPINK14	upstream	3,4785	0,7405	2,64E-06	-0,837	0,622	1,78E-01
rs4705055	5	1,48E+08	C	T	0,6765	SPINK14	upstream	-3,4785	0,7405	2,64E-06	-0,837	0,622	1,78E-01
rs6881658	5	1,48E+08	T	G	0,3235	SPINK14	upstream	3,4785	0,7405	2,64E-06	-0,837	0,622	1,78E-01
rs6895745	5	1,48E+08	G	C	0,6765	SPINK14	upstream	-3,4785	0,7405	2,64E-06	-0,837	0,622	1,78E-01
rs2400493	5	1,48E+08	G	A	0,6765	SPINK14	downstream	-3,4782	0,7405	2,64E-06	-0,838	0,622	1,78E-01
rs2400496	5	1,48E+08	A	G	0,3235	SPINK14	downstream	3,4782	0,7405	2,64E-06	-0,838	0,622	1,78E-01
rs9325084	5	1,48E+08	G	C	0,6765	SPINK14	downstream	-3,4782	0,7405	2,64E-06	-0,838	0,622	1,78E-01
rs767569	5	1,48E+08	T	C	0,3235	SPINK14	downstream	3,4782	0,7405	2,64E-06	-0,838	0,622	1,78E-01
rs767570	5	1,48E+08	A	G	0,3235	SPINK14	downstream	3,4782	0,7405	2,64E-06	-0,837	0,622	1,78E-01
rs10070470	5	1,48E+08	T	C	0,3235	SPINK14	upstream	3,4786	0,7407	2,65E-06	-0,837	0,622	1,78E-01
rs10068988	5	1,48E+08	T	C	0,3235	SPINK14	upstream	3,4776	0,7407	2,67E-06	-0,838	0,622	1,78E-01
rs7826843	8	2900054	T	G	0,4505	CSMD1	intron	3,4958	0,7447	2,68E-06	0,87	0,596	1,45E-01
5:147552361	5	1,48E+08	R	I	0,6709	-	-	-3,496	0,7451	2,70E-06	-0,803	0,629	2,02E-01

Marker								Meta-analysis			Losartan cohort		
SNPID	chr	position	risk allele	other allele	freq risk allele	gene	location	beta	SE	p-value	beta	SE	p-value
rs4259160	5	1,48E+08	G	A	0,6748	SPINK14	downstream	-3,4622	0,7381	2,72E-06	-0,866	0,623	1,64E-01
rs6898210	5	1,48E+08	G	T	0,6829	-	-	-3,5641	0,76	2,73E-06	-0,799	0,634	2,07E-01
rs6884063	5	1,48E+08	T	G	0,3171	-	-	3,5623	0,76	2,77E-06	-0,799	0,634	2,07E-01
rs10074328	5	1,48E+08	C	T	0,6748	SPINK14	downstream	-3,4584	0,7383	2,81E-06	-0,867	0,623	1,64E-01
rs1029884	5	1,48E+08	G	C	0,6748	SPINK14	intron	-3,4584	0,7383	2,81E-06	-0,867	0,623	1,64E-01
rs7703761	5	1,48E+08	C	T	0,6748	SPINK14	downstream	-3,4569	0,7381	2,82E-06	-0,866	0,623	1,64E-01
rs2400494	5	1,48E+08	A	G	0,3252	SPINK14	downstream	3,4567	0,7381	2,82E-06	-0,867	0,623	1,64E-01
rs2400495	5	1,48E+08	G	A	0,6748	SPINK14	downstream	-3,4567	0,7381	2,82E-06	-0,867	0,623	1,64E-01
rs7445725	5	1,48E+08	A	C	0,3252	SPINK14	downstream	3,4567	0,7381	2,82E-06	-0,867	0,623	1,64E-01
rs767568	5	1,48E+08	A	G	0,3252	SPINK14	downstream	3,4567	0,7381	2,82E-06	-0,867	0,623	1,64E-01
rs1156195	5	1,48E+08	T	C	0,3252	SPINK14	intron	3,4567	0,7381	2,82E-06	-0,867	0,623	1,64E-01
rs7713904	5	1,48E+08	C	T	0,6748	SPINK14	intron	-3,4567	0,7381	2,82E-06	-0,867	0,623	1,64E-01
rs2191681	5	1,48E+08	T	C	0,3252	SPINK14	downstream	3,4574	0,7383	2,83E-06	-0,867	0,623	1,64E-01
rs2400497	5	1,48E+08	T	C	0,3252	SPINK14	downstream	3,4563	0,7381	2,83E-06	-0,867	0,623	1,64E-01
rs6883615	5	1,48E+08	T	C	0,3167	-	-	3,522	0,7522	2,84E-06	-0,799	0,624	2,01E-01
rs6898852	5	1,48E+08	C	T	0,6833	-	-	-3,522	0,7522	2,84E-06	-0,799	0,624	2,01E-01
rs10477363	5	1,48E+08	T	C	0,3256	SPINK14	downstream	3,4593	0,7388	2,84E-06	-0,868	0,623	1,64E-01
rs10061827	5	1,48E+08	C	T	0,6833	-	-	-3,52	0,7522	2,87E-06	-0,798	0,624	2,01E-01
rs10055396	5	1,48E+08	A	G	0,3276	-	-	3,4998	0,7481	2,90E-06	-0,969	0,629	1,24E-01
rs2400492	5	1,48E+08	G	A	0,6833	-	-	-3,5169	0,752	2,91E-06	-0,797	0,624	2,01E-01
rs2400491	5	1,48E+08	T	C	0,3167	-	-	3,5169	0,752	2,91E-06	-0,798	0,624	2,01E-01
rs2159661	5	1,48E+08	A	G	0,3261	SPINK14	downstream	3,4612	0,7405	2,95E-06	-0,87	0,625	1,64E-01
rs6580532	5	1,48E+08	C	T	0,6731	-	-	-3,4936	0,7476	2,97E-06	-0,885	0,628	1,59E-01
rs7719535	5	1,48E+08	T	C	0,328	-	-	3,4851	0,7462	3,01E-06	-0,891	0,627	1,55E-01
rs34339574	5	1,48E+08	T	C	0,3385	-	-	3,5238	0,7547	3,03E-06	-0,844	0,633	1,83E-01

Marker								Meta-analysis			Losartan cohort		
SNPID	chr	position	risk allele	other allele	freq risk allele	gene	location	beta	SE	p-value	beta	SE	p-value
rs6580533	5	1,48E+08	C	T	0,6724	-	-	-3,4932	0,7484	3,04E-06	-0,887	0,629	1,58E-01
rs6898179	5	1,48E+08	G	T	0,6759	-	-	-3,5741	0,7657	3,05E-06	-0,784	0,64	2,21E-01
rs6884944	5	1,48E+08	T	C	0,328	-	-	3,4829	0,7465	3,07E-06	-0,891	0,627	1,55E-01
rs10077607	5	1,48E+08	C	A	0,6724	-	-	-3,4863	0,7474	3,09E-06	-0,876	0,631	1,65E-01
rs6860003	5	1,48E+08	C	T	0,6714	-	-	-3,484	0,7472	3,12E-06	-0,893	0,628	1,55E-01
rs35696310	5	1,48E+08	T	A	0,672	-	-	-3,48	0,7467	3,15E-06	-0,891	0,628	1,55E-01
5:147566123	5	1,48E+08	R	D	0,6469	-	-	-3,5285	0,7576	3,20E-06	-0,795	0,652	2,23E-01
5:147561496	5	1,48E+08	R	D	0,672	-	-	-3,477	0,7467	3,22E-06	-0,889	0,628	1,56E-01
rs6879875	5	1,48E+08	A	G	0,3161	-	-	3,5378	0,7602	3,26E-06	-0,798	0,633	2,08E-01
rs1974627	5	1,48E+08	T	G	0,3251	SPINK14	downstream	3,4635	0,7443	3,27E-06	-0,855	0,623	1,70E-01
rs12653723	5	1,48E+08	A	G	0,3286	-	-	3,4716	0,7474	3,40E-06	-0,878	0,627	1,62E-01
rs12653724	5	1,48E+08	A	G	0,3286	-	-	3,4707	0,7474	3,42E-06	-0,878	0,627	1,62E-01
rs6899173	5	1,48E+08	C	T	0,6847	-	-	-3,5227	0,759	3,47E-06	-0,853	0,629	1,75E-01
rs1974628	5	1,48E+08	T	C	0,3268	SPINK14	downstream	3,4414	0,7416	3,48E-06	-0,884	0,624	1,56E-01
rs1974629	5	1,48E+08	A	G	0,3268	SPINK14	downstream	3,4418	0,7419	3,49E-06	-0,884	0,624	1,56E-01
rs1558410	5	1,48E+08	G	A	0,6729	SPINK14	downstream	-3,4416	0,7419	3,50E-06	-0,884	0,624	1,56E-01
rs9885020	5	1,48E+08	C	T	0,6324	-	-	-3,5583	0,7671	3,51E-06	-0,977	0,642	1,28E-01
rs2400498	5	1,48E+08	T	C	0,3267	SPINK14	downstream	3,4244	0,7383	3,52E-06	-0,879	0,623	1,58E-01
rs35491588	5	1,48E+08	G	C	0,6681	-	-	-3,4666	0,7478	3,56E-06	-0,893	0,629	1,56E-01
rs10043288	5	1,48E+08	G	A	0,6337	-	-	-3,5346	0,7645	3,78E-06	-0,774	0,654	2,36E-01
rs2400488	5	1,48E+08	A	G	0,3153	-	-	3,4708	0,751	3,81E-06	-0,792	0,623	2,04E-01
rs13179181	5	1,48E+08	C	T	0,6596	-	-	-3,4388	0,7447	3,88E-06	-0,852	0,632	1,78E-01
rs7717500	5	1,48E+08	T	C	0,316	-	-	3,4615	0,7505	3,98E-06	-0,787	0,623	2,06E-01
rs9915451	17	54433211	A	G	0,2149	ANKFN1	intron	4,1201	0,8936	4,01E-06	-0,673	0,708	3,42E-01
rs35217112	5	1,48E+08	G	A	0,6665	-	-	-3,4416	0,7466	4,03E-06	-0,894	0,631	1,57E-01

Marker								Meta-analysis			Losartan cohort		
SNPID	chr	position	risk allele	other allele	freq risk allele	gene	location	beta	SE	p-value	beta	SE	p-value
rs6871633	5	1,48E+08	C	A	0,6649	-	-	-3,4414	0,7466	4,03E-06	-0,882	0,63	1,61E-01
rs62950160	5	1,48E+08	A	G	0,3406	-	-	3,4293	0,7443	4,08E-06	-0,841	0,633	1,84E-01
rs36056267	5	1,48E+08	T	C	0,3335	-	-	3,4391	0,7466	4,09E-06	-0,863	0,63	1,71E-01
rs34258096	5	1,48E+08	A	G	0,3335	-	-	3,4411	0,7471	4,10E-06	-0,898	0,631	1,55E-01
rs10059441	5	1,48E+08	A	G	0,3335	-	-	3,4356	0,7466	4,19E-06	-0,864	0,63	1,70E-01
5:147564699	5	1,48E+08	R	I	0,6564	-	-	-3,4125	0,7423	4,28E-06	-0,846	0,63	1,79E-01
5:147564823	5	1,48E+08	R	D	0,6421	-	-	-3,4841	0,7579	4,29E-06	-0,971	0,639	1,29E-01
rs13154742	5	1,48E+08	A	G	0,329	SPINK14	downstream	3,4137	0,7435	4,40E-06	-0,871	0,626	1,64E-01
rs12717963	5	1,48E+08	C	T	0,6626	-	-	-3,4094	0,7427	4,42E-06	-0,818	0,631	1,95E-01
rs11189015	10	98911936	C	G	0,0325	SLIT1	intron	-10,0684	2,1959	4,54E-06	0,505	1,88	7,88E-01
rs10052031	5	1,48E+08	A	C	0,3267	SPINK14	intron	3,3991	0,7421	4,64E-06	-0,908	0,625	1,47E-01
5:147575340	5	1,48E+08	D	R	0,3364	-	-	3,4322	0,7503	4,78E-06	-0,743	0,638	2,45E-01
rs9885208	5	1,48E+08	T	C	0,3503	-	-	3,4367	0,752	4,88E-06	-1,027	0,641	1,09E-01
rs6868569	5	1,48E+08	T	G	0,3365	-	-	3,3904	0,742	4,89E-06	-0,839	0,629	1,82E-01
rs6896988	5	1,48E+08	T	C	0,3371	-	-	3,3892	0,7432	5,10E-06	-0,884	0,629	1,60E-01
rs6870548	5	1,48E+08	G	A	0,6629	-	-	-3,3907	0,7437	5,13E-06	-0,884	0,629	1,60E-01
rs6872890	5	1,48E+08	T	C	0,3148	-	-	3,4043	0,7478	5,30E-06	-0,772	0,622	2,14E-01
5:147554997	5	1,48E+08	R	D	0,6686	-	-	-3,3705	0,7407	5,36E-06	-0,86	0,627	1,70E-01
rs7702990	5	1,48E+08	T	C	0,3375	-	-	3,3707	0,7408	5,36E-06	-0,888	0,628	1,57E-01
rs6867695	5	1,48E+08	T	C	0,3384	-	-	3,369	0,741	5,45E-06	-0,883	0,629	1,60E-01
rs7716861	5	1,48E+08	G	A	0,6626	-	-	-3,3646	0,7403	5,49E-06	-0,853	0,626	1,73E-01
rs9325087	5	1,48E+08	C	T	0,6625	-	-	-3,3667	0,7408	5,50E-06	-0,843	0,627	1,79E-01
rs10041939	5	1,48E+08	G	T	0,6626	-	-	-3,364	0,7403	5,51E-06	-0,853	0,626	1,73E-01
5:147564419	5	1,48E+08	R	D	0,6626	-	-	-3,3672	0,741	5,52E-06	-0,886	0,628	1,58E-01
rs6864124	5	1,48E+08	A	C	0,3365	-	-	3,3725	0,7422	5,53E-06	-0,888	0,628	1,58E-01

Marker								Meta-analysis			Losartan cohort		
SNPID	chr	position	risk allele	other allele	freq risk allele	gene	location	beta	SE	p-value	beta	SE	p-value
rs2400489	5	1,48E+08	T	C	0,3527	-	-	3,5143	0,7802	6,66E-06	-0,786	0,661	2,35E-01
rs10067334	5	1,48E+08	A	C	0,3603	SPINK14	upstream	3,3434	0,7428	6,77E-06	-0,724	0,591	2,21E-01
rs7703690	5	1,48E+08	G	C	0,3607	SPINK14	intron	3,3417	0,7436	6,99E-06	0,722	0,591	2,22E-01
5:147549507	5	1,48E+08	I	R	0,6387	-	-	-3,3423	0,7441	7,06E-06	0,722	0,592	2,23E-01
rs8073797	17	54432502	T	G	0,208	ANKFN1	intron	4,0875	0,9116	7,33E-06	-0,749	0,718	2,97E-01
rs9885451	5	1,48E+08	C	T	0,3652	SPINK14	intron	3,3338	0,744	7,43E-06	0,782	0,592	1,87E-01
rs11993031	8	2809581	A	T	0,4964	CSMD1	intron	3,3597	0,7508	7,65E-06	0,849	0,621	1,71E-01
rs12189210	5	1,48E+08	G	A	0,3655	SPINK14	downstream	3,3294	0,7444	7,74E-06	0,788	0,593	1,84E-01
rs4499819	5	1,48E+08	G	A	0,3663	SPINK14	downstream	3,3291	0,746	8,10E-06	0,794	0,594	1,82E-01
rs9885270	5	1,48E+08	A	G	0,3502	-	-	3,3526	0,7518	8,22E-06	-0,879	0,637	1,68E-01
4:106126664	4	1,06E+08	I	R	0,0933	-	-	5,4039	1,2134	8,45E-06	-0,292	1,027	7,76E-01
5:147549663	5	1,48E+08	D	R	0,6363	-	-	-3,3228	0,7474	8,76E-06	0,744	0,594	2,10E-01
rs12522694	5	1,48E+08	A	C	0,6313	-	-	-3,3316	0,75	8,92E-06	0,802	0,597	1,80E-01
rs7726994	5	1,48E+08	A	T	0,6288	SPINK14	intron	-3,3488	0,7542	8,98E-06	0,71	0,598	2,35E-01
rs12505746	4	1,06E+08	G	A	0,9074	TET2	intron	-5,4374	1,2272	9,40E-06	-0,284	1,026	7,82E-01
rs7698522	4	1,06E+08	C	T	0,9074	TET2	intron	-5,4368	1,2272	9,42E-06	-0,294	1,026	7,74E-01
rs11813810	10	55228586	T	C	0,1992		intron	-4,379	0,9895	9,63E-06	-0,393	0,824	6,34E-01
rs7576168	2	1,17E+08	T	G	0,4736	-		-3,3668	0,7609	9,67E-06	0,43	0,658	5,14E-01
5:147592991	5	1,48E+08	R	D	0,949	-	-	7,4213	1,6778	9,72E-06	1,072	1,332	4,21E-01
rs11782820	8	2809792	A	T	0,4948	CSMD1	intron	3,3209	0,7516	9,94E-06	0,868	0,614	1,58E-01
5:147571885	5	1,48E+08	I	R	0,3755	-	-	3,3334	0,7545	9,95E-06	-0,791	0,599	1,86E-01

Tabella 8. Risultati dell'associazione genome-wide per la risposta pressoria diastolica (DBP) all'idroclorotiazide (HCTZ) in meta-analisi e al losartan (SNPs with HCTZ meta-analysis p-value < 1×10^{-5}). Tutti gli SNPs imputati hanno una qualità di imputazione (R_{sq}) ≥ 0.8 . La risposta pressoria diastolica all'HCTZ e al Losartan è stata valutata usando un'analisi di regressione lineare sotto un modello additivo usando sesso, età, DBP basale e le componenti principali come covariate. Per recuperare maggiori informazioni sugli SNPs e sul loro contesto genomico (il gene più vicino) abbiamo usato l'hg19 assembly (National Center for Biotechnology Information 37). SNPID indica il polimorfismo a singolo nucleotide, chr: cromosoma e SE: errore standard.

Marker								Meta-analysis			Losartan cohort		
SNPID	chr	position	risk allele	other allele	freq risk allele	gene	location	beta	SE	p-value	beta	SE	p-value
rs113095083	2	2,39E+08	C	T	0,9284	ILKAP	intron	6,5381	1,4485	6,37E-06	-0,343	0,958	0,7206
rs76891333	3	28080972	C	T	0,9765	-	-	9,2052	2,0446	6,73E-06	0,998	2,64	0,7054
rs35483103	4	38012837	C	G	0,1409	TBC1D1	intron	-3,6853	0,8083	5,13E-06	0,098	0,666	0,8828
rs13146688	4	38011394	A	G	0,1394	TBC1D1	intron	-3,649	0,8092	6,50E-06	0,149	0,678	0,8265
rs4431329	5	1,08E+08	A	T	0,4054	FBXL17	intron	2,896	0,5981	1,28E-06	-0,05	0,508	0,9219
rs7706429	5	1,08E+08	A	G	0,3451	FBXL17	intron	2,6278	0,5627	3,01E-06	-0,114	0,461	0,8046
rs10477887	5	1,08E+08	T	C	0,3436	FBXL17	intron	2,6199	0,5633	3,30E-06	-0,116	0,462	0,8017
rs62359548	5	1,08E+08	C	T	0,6441	FBXL17	intron	-2,5821	0,5592	3,89E-06	-0,075	0,456	0,8701
rs10057896	5	1,08E+08	T	C	0,3559	FBXL17	intron	2,5808	0,5592	3,93E-06	-0,078	0,456	0,8651
rs1833562	5	1,08E+08	A	G	0,3558	FBXL17	intron	2,577	0,559	4,03E-06	-0,077	0,456	0,8662
rs10075370	5	1,08E+08	G	A	0,6442	FBXL17	intron	-2,5763	0,559	4,05E-06	-0,077	0,456	0,8662
rs2076794	5	1,08E+08	C	T	0,6437	FBXL17	intron	-2,5701	0,5587	4,22E-06	-0,097	0,457	0,8318
rs6869057	5	1,08E+08	G	A	0,6439	FBXL17	intron	-2,5602	0,5582	4,51E-06	-0,084	0,456	0,8532
5:107598444	5	1,08E+08	R	D	0,6401	-	-	-2,5958	0,5672	4,72E-06	-0,055	0,464	0,9056
rs10065168	5	1,08E+08	G	A	0,6458	FBXL17	intron	-2,5485	0,5585	5,04E-06	-0,11	0,457	0,8105
rs2966822	5	1,08E+08	T	C	0,3542	FBXL17	intron	2,5482	0,5585	5,05E-06	-0,109	0,457	0,8109
rs2966829	5	1,08E+08	C	T	0,6458	FBXL17	intron	-2,5475	0,5585	5,08E-06	-0,109	0,458	0,8115
rs6880727	5	1,08E+08	A	G	0,3535	FBXL17	intron	2,5496	0,559	5,10E-06	-0,116	0,46	0,8017
rs2966825	5	1,08E+08	A	G	0,3542	FBXL17	intron	2,5469	0,5585	5,11E-06	-0,103	0,459	0,8233
rs2966816	5	1,08E+08	C	T	0,6167	FBXL17	intron	-2,5949	0,569	5,11E-06	-0,161	0,475	0,7353
rs2941698	5	1,08E+08	G	A	0,6458	FBXL17	intron	-2,5462	0,5585	5,14E-06	-0,102	0,459	0,8239

Marker								Meta-analysis			Losartan cohort		
SNPID	chr	position	risk allele	other allele	freq risk allele	gene	location	beta	SE	p-value	beta	SE	p-value
rs2966823	5	1,08E+08	A	T	0,3542	FBXL17	intron	2,5462	0,5585	5,14E-06	-0,102	0,459	0,8248
rs10071499	5	1,08E+08	T	G	0,3535	FBXL17	intron	2,5507	0,5596	5,16E-06	-0,116	0,458	0,801
rs2966788	5	1,08E+08	T	A	0,6457	FBXL17	intron	-2,5415	0,5577	5,19E-06	-0,103	0,459	0,8233
rs10040007	5	1,08E+08	C	G	0,3535	FBXL17	intron	2,5484	0,5596	5,26E-06	-0,108	0,459	0,8137
5:107613705	5	1,08E+08	R	I	0,6466	-	-	-2,5503	0,5606	5,39E-06	-0,108	0,458	0,8134
rs9885545	5	1,08E+08	A	T	0,3567	FBXL17	intron	2,5783	0,5685	5,75E-06	-0,14	0,459	0,7607
rs7733311	5	1,08E+08	G	C	0,6469	FBXL17	intron	-2,5426	0,5606	5,75E-06	-0,116	0,46	0,801
rs6594295	5	1,08E+08	C	G	0,3545	FBXL17	intron	2,5269	0,5574	5,80E-06	-0,11	0,459	0,8108
rs7727051	5	1,08E+08	G	A	0,6441	FBXL17	intron	-2,5293	0,5581	5,84E-06	-0,123	0,459	0,7892
rs2122156	5	1,08E+08	T	A	0,6275	FBXL17	intron	-2,5379	0,5603	5,91E-06	-0,105	0,467	0,8227
rs4957551	5	1,08E+08	T	C	0,3548	FBXL17	intron	2,5212	0,5572	6,04E-06	-0,121	0,459	0,7917
rs2966796	5	1,08E+08	T	A	0,6443	FBXL17	intron	-2,5296	0,5593	6,10E-06	-0,102	0,461	0,8253
rs2966793	5	1,08E+08	A	G	0,3544	FBXL17	intron	2,5245	0,5583	6,14E-06	-0,11	0,459	0,8101
rs5005385	5	1,08E+08	G	A	0,6456	FBXL17	intron	-2,5245	0,5583	6,14E-06	-0,11	0,459	0,8109
rs10077527	5	1,08E+08	C	A	0,6472	FBXL17	intron	-2,5423	0,5629	6,28E-06	-0,125	0,464	0,7878
rs2922432	5	1,08E+08	A	G	0,3543	FBXL17	intron	2,5195	0,5581	6,36E-06	-0,107	0,459	0,8154
rs9763671	5	1,19E+08	T	G	0,1674	-	-	-3,3475	0,7419	6,42E-06	0,581	0,612	0,3428
rs10055322	5	1,08E+08	C	T	0,6466	FBXL17	intron	-2,5206	0,5587	6,44E-06	-0,103	0,46	0,8227
rs2922425	5	1,08E+08	C	T	0,6457	FBXL17	intron	-2,5165	0,5579	6,47E-06	-0,105	0,459	0,8195
rs2966800	5	1,08E+08	T	G	0,3543	FBXL17	intron	2,5156	0,5577	6,47E-06	-0,105	0,459	0,8192
rs2910791	5	1,08E+08	A	T	0,3542	FBXL17	intron	2,5162	0,5585	6,63E-06	-0,105	0,459	0,8196
rs2922421	5	1,08E+08	G	A	0,6458	FBXL17	intron	-2,5149	0,5583	6,65E-06	-0,106	0,459	0,8167
rs10070927	5	1,08E+08	G	A	0,6451	FBXL17	intron	-2,5123	0,5577	6,66E-06	-0,126	0,458	0,783
rs2966804	5	1,08E+08	G	A	0,6458	FBXL17	intron	-2,5155	0,5585	6,66E-06	-0,105	0,459	0,8185
rs2922418	5	1,08E+08	T	C	0,3542	FBXL17	intron	2,5148	0,5585	6,70E-06	-0,111	0,459	0,8092
rs2966813	5	1,08E+08	A	G	0,3541	FBXL17	intron	2,5191	0,5595	6,71E-06	-0,094	0,458	0,8378

Marker								Meta-analysis			Losartan cohort		
SNPID	chr	position	risk allele	other allele	freq risk allele	gene	location	beta	SE	p-value	beta	SE	p-value
rs2966828	5	1,08E+08	T	C	0,3549	FBXL17	intron	2,5145	0,5585	6,72E-06	-0,125	0,459	0,7849
rs2922417	5	1,08E+08	T	C	0,3542	FBXL17	intron	2,5142	0,5585	6,74E-06	-0,113	0,459	0,805
rs2966814	5	1,08E+08	C	T	0,6458	FBXL17	intron	-2,5142	0,5585	6,74E-06	-0,116	0,459	0,8009
rs158168	5	1,08E+08	A	G	0,3581	FBXL17	intron	2,5211	0,5601	6,76E-06	-0,118	0,46	0,7985
rs2966827	5	1,08E+08	C	T	0,6451	FBXL17	intron	-2,5103	0,5577	6,77E-06	-0,125	0,458	0,7853
rs4395619	5	1,08E+08	A	T	0,3542	FBXL17	intron	2,5135	0,5585	6,78E-06	-0,122	0,459	0,7906
5:41596469	5	41596469	D	R	0,3837	-	-	-2,5685	0,5708	6,79E-06	-0,133	0,458	0,7718
rs75609975	5	41571018	A	C	0,3603	-	-	-2,6655	0,5925	6,84E-06	-0,154	0,472	0,7441
rs2922422	5	1,08E+08	A	G	0,3561	FBXL17	intron	2,5043	0,5571	6,94E-06	-0,087	0,461	0,8506
rs2922408	5	1,08E+08	A	C	0,3549	FBXL17	intron	2,5039	0,5577	7,15E-06	-0,123	0,459	0,7887
rs2966821	5	1,08E+08	A	C	0,3549	FBXL17	intron	2,5026	0,5577	7,23E-06	-0,123	0,459	0,7884
rs34387	5	1,08E+08	A	C	0,3532	FBXL17	intron	2,4884	0,5549	7,30E-06	-0,104	0,462	0,8217
rs286763	5	1,08E+08	T	C	0,3549	FBXL17	intron	2,4997	0,5583	7,55E-06	-0,121	0,459	0,7922
rs2966818	5	1,08E+08	T	C	0,3512	FBXL17	intron	2,5233	0,564	7,68E-06	-0,16	0,466	0,732
rs7448343	5	41607044	G	T	0,8133	-	-	3,8053	0,8508	7,72E-06	-0,062	0,598	0,9169
rs636053	5	41570696	A	C	0,3623	-	-	-2,7032	0,6046	7,79E-06	-0,121	0,478	0,8004
rs2966802	5	1,08E+08	A	T	0,3565	FBXL17	intron	2,4835	0,5557	7,85E-06	-0,124	0,457	0,7864
5:107559520	5	1,08E+08	R	I	0,648	-	-	-2,5129	0,5624	7,90E-06	-0,117	0,463	0,8009
rs2966803	5	1,08E+08	A	C	0,3565	FBXL17	intron	2,4834	0,5559	7,91E-06	-0,118	0,46	0,7967
rs6881879	5	1,08E+08	G	C	0,6457	FBXL17	intron	-2,4907	0,5578	8,00E-06	-0,126	0,458	0,7832
rs2966820	5	1,08E+08	T	C	0,3558	FBXL17	intron	2,4786	0,5557	8,18E-06	-0,139	0,459	0,7625
rs2966831	5	1,08E+08	A	G	0,3544	FBXL17	intron	2,483	0,5569	8,26E-06	-0,129	0,458	0,7773
rs6863456	5	1,08E+08	G	A	0,6456	FBXL17	intron	-2,483	0,5569	8,26E-06	-0,129	0,458	0,7782
5:107559522	5	1,08E+08	R	I	0,6474	-	-	-2,5089	0,563	8,33E-06	-0,116	0,463	0,8018
rs2909791	5	1,08E+08	T	C	0,3544	FBXL17	intron	2,48	0,5569	8,47E-06	-0,131	0,458	0,7754
rs6885988	5	1,08E+08	T	G	0,3544	FBXL17	intron	2,4814	0,5573	8,48E-06	-0,126	0,458	0,7835

Marker								Meta-analysis			Losartan cohort		
SNPID	chr	position	risk allele	other allele	freq risk allele	gene	location	beta	SE	p-value	beta	SE	p-value
rs41130	5	1,08E+08	A	G	0,3529	FBXL17	intron	2,4714	0,5551	8,49E-06	-0,123	0,461	0,7903
rs2922431	5	1,08E+08	C	T	0,6443	FBXL17	intron	-2,4752	0,5583	9,29E-06	-0,106	0,459	0,8178
rs40065	5	1,08E+08	G	A	0,6467	FBXL17	intron	-2,4448	0,5525	9,64E-06	-0,112	0,46	0,8085
rs40066	5	1,08E+08	G	A	0,6467	FBXL17	intron	-2,4441	0,5525	9,69E-06	-0,112	0,46	0,8085
rs9375876	6	1,33E+08	T	C	0,3147	MOXD1	intron	2,68	0,5976	7,30E-06	-0,129	0,482	0,7895
rs9375877	6	1,33E+08	G	A	0,6894	MOXD1	intron	-2,6628	0,5966	8,07E-06	-0,132	0,481	0,784
rs9388986	6	1,33E+08	T	C	0,3106	MOXD1	intron	2,6614	0,5966	8,16E-06	-0,134	0,482	0,7814
6:132684049	6	1,33E+08	D	R	0,2924	-	-	2,7626	0,6227	9,15E-06	0,063	0,49	0,8972
8:142304050	8	1,42E+08	D	R	0,0411	-	-	-9,2572	1,9878	3,21E-06	-1,84	1,89	0,3301
rs7130887	11	1,22E+08	T	G	0,1527	-	-	3,6644	0,7561	1,26E-06	0,803	0,745	0,2807
rs1375016	11	1,22E+08	C	T	0,8513	-	-	-3,6897	0,7632	1,34E-06	0,71	0,72	0,3245
rs1579921	11	1,22E+08	T	C	0,1529	-	-	3,6183	0,7518	1,49E-06	0,798	0,734	0,2772
11:121690503	11	1,22E+08	I	R	0,154	-	-	3,5691	0,7428	1,55E-06	0,749	0,732	0,3063
rs74353562	11	1,22E+08	C	T	0,8528	-	-	-3,879	0,8077	1,57E-06	0,95	0,795	0,2317
rs11824638	11	1,22E+08	T	C	0,1531	-	-	3,7045	0,7735	1,67E-06	0,92	0,747	0,2179
rs881754	11	1,22E+08	C	T	0,853	-	-	-3,6543	0,7648	1,77E-06	0,661	0,719	0,3583
rs76903606	11	1,22E+08	C	A	0,8521	-	-	-3,7463	0,7849	1,81E-06	0,83	0,774	0,2833
11:121732190	11	1,22E+08	D	R	0,1491	-	-	3,6313	0,7609	1,82E-06	0,727	0,742	0,3275
rs111611915	11	1,22E+08	T	C	0,1484	-	-	3,6146	0,7642	2,24E-06	0,771	0,739	0,2965
rs77683977	11	1,22E+08	G	C	0,8524	-	-	-3,6166	0,7646	2,24E-06	0,836	0,743	0,2602
rs151249748	11	1,22E+08	C	G	0,1476	-	-	3,6132	0,7639	2,25E-06	0,822	0,742	0,2679
rs75738575	11	1,22E+08	C	T	0,8523	-	-	-3,6273	0,7669	2,25E-06	0,793	0,752	0,2921
rs76462942	11	1,22E+08	T	A	0,8517	-	-	-3,6112	0,7639	2,27E-06	0,854	0,738	0,2471
rs78531352	11	1,22E+08	G	C	0,8524	-	-	-3,6131	0,7644	2,28E-06	0,814	0,74	0,2711
rs11828273	11	1,22E+08	C	T	0,8511	-	-	-3,5683	0,7549	2,28E-06	0,771	0,738	0,2962
rs147667467	11	1,22E+08	T	C	0,1476	-	-	3,6115	0,7648	2,34E-06	0,866	0,741	0,2423

Marker								Meta-analysis			Losartan cohort		
SNPID	chr	position	risk allele	other allele	freq risk allele	gene	location	beta	SE	p-value	beta	SE	p-value
rs78050399	11	1,22E+08	A	G	0,1461	-	-	3,6778	0,782	2,57E-06	0,865	0,764	0,258
rs11827633	11	1,22E+08	G	A	0,8517	-	-	-3,542	0,7552	2,73E-06	0,8	0,739	0,2791
rs7105411	11	1,22E+08	A	G	0,1483	-	-	3,542	0,7552	2,73E-06	0,8	0,739	0,2792
rs80154702	11	1,22E+08	A	G	0,1483	-	-	3,5464	0,7561	2,73E-06	0,709	0,738	0,3367
rs7130229	11	1,22E+08	A	C	0,1476	-	-	3,5913	0,7664	2,79E-06	0,802	0,744	0,2807
11:121680575	11	1,22E+08	I	R	0,15	-	-	3,5523	0,7597	2,93E-06	0,661	0,72	0,3583
11:121748552	11	1,22E+08	D	R	0,147	-	-	3,6238	0,7796	3,35E-06	0,873	0,762	0,2518
rs188271015	11	1,22E+08	T	A	0,8858	-	-	-4,1613	0,9241	6,71E-06	1,88	1,08	0,08171
rs78026375	11	1,22E+08	T	G	0,1105	-	-	4,0498	0,9082	8,23E-06	1,595	1,081	0,1401
rs74426495	12	89421923	C	T	0,9815	-	-	-11,9547	2,6708	7,60E-06	3,787	2,849	0,1838
rs9590353	13	96631221	G	T	0,9179	UGGT2	intron	4,6286	1,0175	5,39E-06	0,599	0,72	0,4055
rs117103226	13	60232310	T	C	0,056	-	-	6,0064	1,3332	6,63E-06	0,854	1,113	0,4431
rs9574319	13	79433560	G	C	0,9072	-	-	5,2802	1,1812	7,82E-06	-0,186	0,918	0,839
rs77876672	13	60319019	T	C	0,0569	DIAPH3	intron	5,6384	1,2731	9,47E-06	0,871	1,051	0,4069
rs72907861	18	39202390	T	G	0,156	-	-	3,2896	0,7334	7,28E-06	-0,882	0,618	0,1535
rs72907862	18	39203901	A	G	0,156	-	-	3,2896	0,7334	7,28E-06	-0,882	0,618	0,1535
rs72909913	18	39205657	G	A	0,844	-	-	-3,2902	0,734	7,37E-06	-0,882	0,618	0,1534
rs72909922	18	39218641	C	T	0,8447	-	-	-3,2899	0,7361	7,85E-06	-0,882	0,618	0,1534
rs72909925	18	39221365	C	A	0,8447	-	-	-3,2892	0,7367	8,01E-06	-0,883	0,618	0,1531
rs72909931	18	39224855	A	G	0,1553	-	-	3,2872	0,7372	8,24E-06	-0,883	0,618	0,1531
18:39219405	18	39219405	D	R	0,1574	-	-	3,254	0,7312	8,59E-06	-0,942	0,614	0,1252
rs72909965	18	39247642	A	G	0,1543	-	-	3,3119	0,7447	8,69E-06	-0,963	0,628	0,1252
rs72909941	18	39229860	G	A	0,8454	-	-	-3,2831	0,7383	8,71E-06	-0,883	0,618	0,1532
rs72909959	18	39243996	T	C	0,1546	-	-	3,2838	0,7392	8,90E-06	-1,003	0,633	0,113
rs9948369	18	39225425	C	A	0,8433	-	-	-3,2496	0,7323	9,11E-06	-0,925	0,613	0,1314
19:53844324	19	53844324	I	R	0,2407	-	-	-3,7666	0,835	6,46E-06	-0,172	0,712	0,8091

Marker								Meta-analysis			Losartan cohort		
SNPID	chr	position	risk allele	other allele	freq risk allele	gene	location	beta	SE	p-value	beta	SE	p-value
rs34795399	19	30653004	A	G	0,1589	-	-	-3,8679	0,8667	8,08E-06	0,592	0,704	0,4003
20:19046645	20	19046645	D	R	0,2386	-	-	-2,806	0,6266	7,54E-06	-0,151	0,508	0,7658
rs6081476	20	19056735	C	T	0,7667	-	-	2,7857	0,6247	8,23E-06	-0,222	0,505	0,66
rs62218700	20	19056677	T	A	0,7667	-	-	2,785	0,6247	8,28E-06	-0,221	0,505	0,6618
rs73603599	20	19056171	T	C	0,2333	-	-	-2,7794	0,6247	8,63E-06	-0,21	0,506	0,6784

Characteristic	GENRES (n=214)	GERA1 (n=282)	NORDIL (n=383)	PEAR (n=228)	CSN-StayOnDiur (n = 438)
Men/women	214/0	161/121	148/235	137/91	259/179
Age, y	50.5±6.4	46.3±8.1	61.5±6.7	50.0±9.5	57.3±8.2
Treatment dose	25 mg/die	25 mg/die	at physician discretion	12.5 mg/die 25 mg/die	12.5 mg/die 25 mg/die
Period of treatment	4 weeks	4 weeks	6 months	2 weeks additional 6 weeks	2 years
Run-in period	4 weeks placebo	4 weeks placebo	...	~ 31 days	2 years
BMI baseline, kg/m ²	26.7±2.8	30.9±5.5	...	30.3±4.9	27.8±4.5
Pretreatment SBP, mmHg	151.4±12.6	142.4±12.5	172.5±15.6	151.8±12.4	154.9±15.7
Pretreatment DBP, mmHg	99.5±6.8	95.4±5.4	103.0±4.5	98.1±5.8	98.5±6.8
ΔSBP, mmHg	-4.7±11.2	-10.8±12.0	-21.2±16.4	-11.0±12.8	-20.7±21.9
ΔDBP, mmHg	-2.5±6.3	-6.5± 7.5	-13.9±8.1	-5.0±7.2	19.4±13.3

Tabella 9. Caratteristiche delle coorti di replica: GENRES, GERA1, NORDIL, PEAR and CSN-StayOnDiur. La tabella mostra le caratteristiche dei pazienti degli studi GENRES, GERA1, NORDIL, PEAR e CSN-StayOnDiur come media ± DS.

GENRES: GENetics of drug RESponsiveness in essential hypertension; GERA1: Genetic Epidemiology of Responses to Antihypertensives; NORDIL: NORdic DILtiazem intervention; PEAR: Pharmacogenomics Evaluation of Antihypertensive Responses e CSN-StayOnDiur: Campania Salute Network-StayOnDiur. 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 run-in; ΔDBP: differenza tra DBP alla fine del trattamento e DBP alla fine di run-in.

MARKER	SNP	rs12505746	rs7387065	rs11993031	rs9590353
	chr	4	8	8	13
	alleles	A/G	A/G	T/A	G/T
	gene	TET2	CSMD1	CSMD1	UGGT2
GWA analysis of PHSS cohort					
	allele freq	0.91	0.52	0.49	0.09
	beta	-5.94	-3.83	-2.76	-3.88
	SE	1.52	0.9	0.92	1.24
	p-value	9.17E-05	2.09E-05	2.80E-03	1.75E-03
GWA analysis of HCTZ-Milan cohort					
	allele freq	0.91	0.62	0.54	0.07
	beta	-4.49	-2.85	-4.53	-6.17
	SE	2.08	1.25	1.29	1.78
	p-value	3.10E-02	2.25E-02	4.41E-04	5.29E-04
Replication analysis in GENRES study participants					
	allele freq	0.89 ^a	0.61	0.46 ^b	0.11
	beta	-1.70	-2.20	-1.30	-1.40
	SE	1.70	1.10	1.00	0.90
	p-value	0.33	0.04	0.21	0.14
Replication analysis in GERA1 study participants					
	allele freq	-	0.69	-	0.11
	beta	-	0.87	-	-0.10
	SE	-	1.03	-	1.09
	p-value	-	0.40	-	0.36
Replication analysis in NORDIL study participants					
	allele freq	0.94	0.68	0.51	0.09
	beta	-1.35	-0.99	1.4	-0.3
	SE	3.01	1.06	1.12	0.87
	p-value	0.66	0.35	0.21	0.77
Replication analysis in PEAR study participants					
	allele freq	0.9	0.65	0.48	0.08
	beta	0.93	1.36	0.51	0.29
	SE	1.09	0.64	0.63	0.76
	p-value	0.39	0.03	0.42	0.71
Replication analysis in CSN-StayOnDiur study participants					
	allele freq	-	0.62	-	0.08
	beta	-	0.33	-	-3.65
	SE	-	1.23	-	1.75
	p-value	-	0.79	-	0.04

Tabella 10. Polimorfismi a singolo nucleotide associati alla risposta pressoria all'idroclorotiazide in meta analisi tra i campioni PHSS e Milano-HCTZ e risultati di replica nei campioni GENRES, GERA1, NORDIL e PEAR CSN-StayOnDiur. Alleli: l'allele codificante viene mostrato a sinistra dell'allele non codificante; freq allele: frequenza dell'allele codificante; chr: cromosoma; SE: errore standard; SNP: polimorfismo a singolo-nucleotide. HCTZ: idroclorotiazide; GWA: genome-wide association; GENRES: GENetics of drug RESponsiveness in essential hypertension; GERA1: Genetic Epidemiology of Responses to Antihypertensives; NORDIL: NORDic DILtiazem intervention; PEAR: Pharmacogenomics Evaluation of Antihypertensive Responses; CSN-StayOnDiur: Campania Salute Network-StayOnDiur; PHSS: Pharmacogenomics of Hydrochlorothiazide Sardinian Study e Milan HCTZ (Pharmacogenomics of Hydrochlorothiazide Milan Study).

a I valori sono riferiti ad un tag SNP di rs12505746 (rs7698522, alleli T/C);

b I valori sono riferiti ad un tag SNP di rs11993031 (rs4875856, alleli G/C).

8. FIGURE

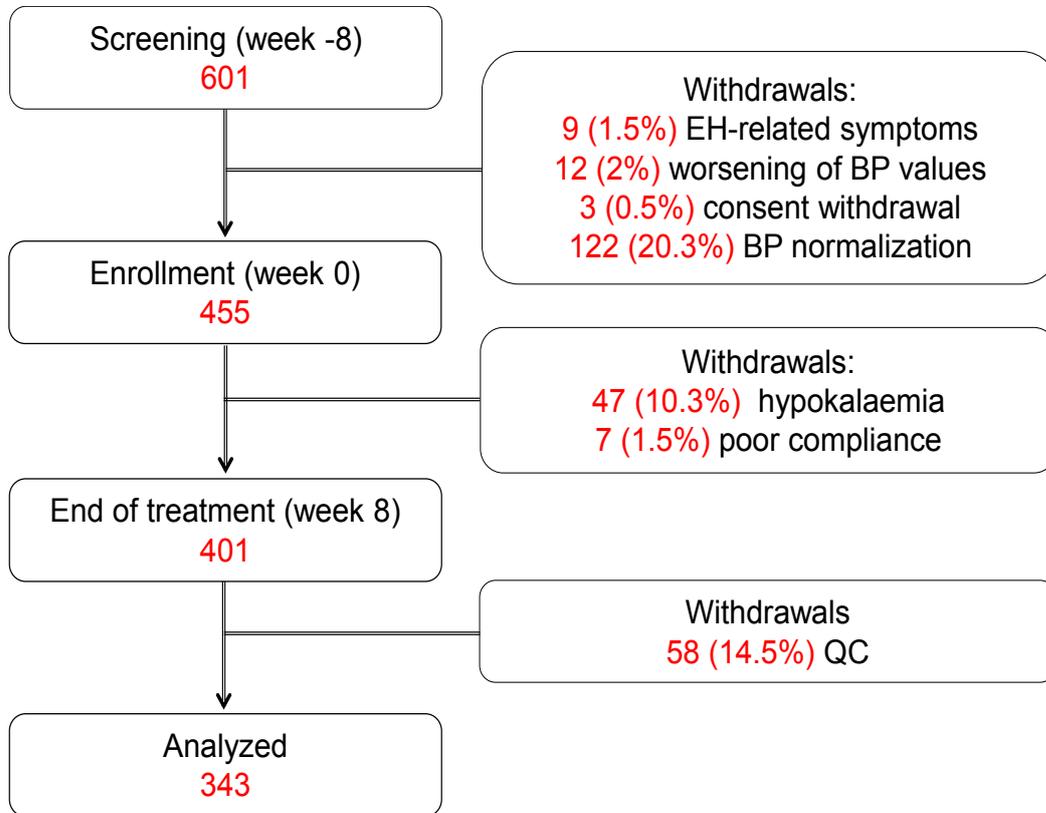


Figura 1. Diagramma di flusso dei partecipanti allo studio HCTZ di Sassari dopo 8 settimane di trattamento. EH= ipertensione essenziale; BP= pressione arteriosa; QC = controllo di qualità.

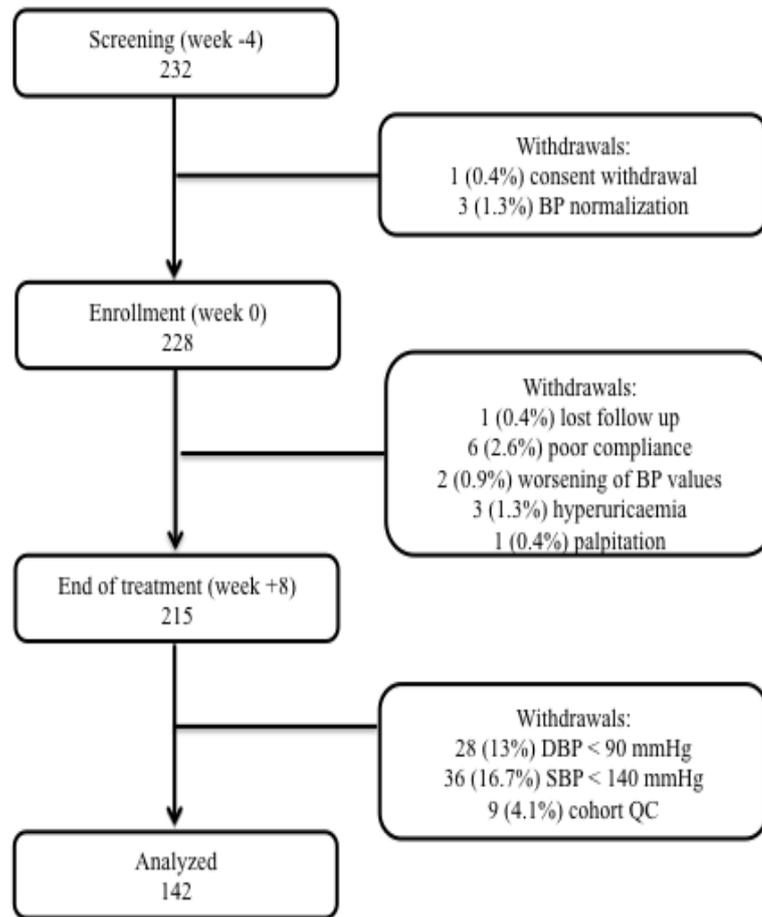


Figura 2. Diagramma di flusso dei partecipanti allo studio HCTZ di Milano dopo 8 settimane di trattamento. EH = ipertensione essenziale; BP = pressione arteriosa; QC = controllo di qualità.

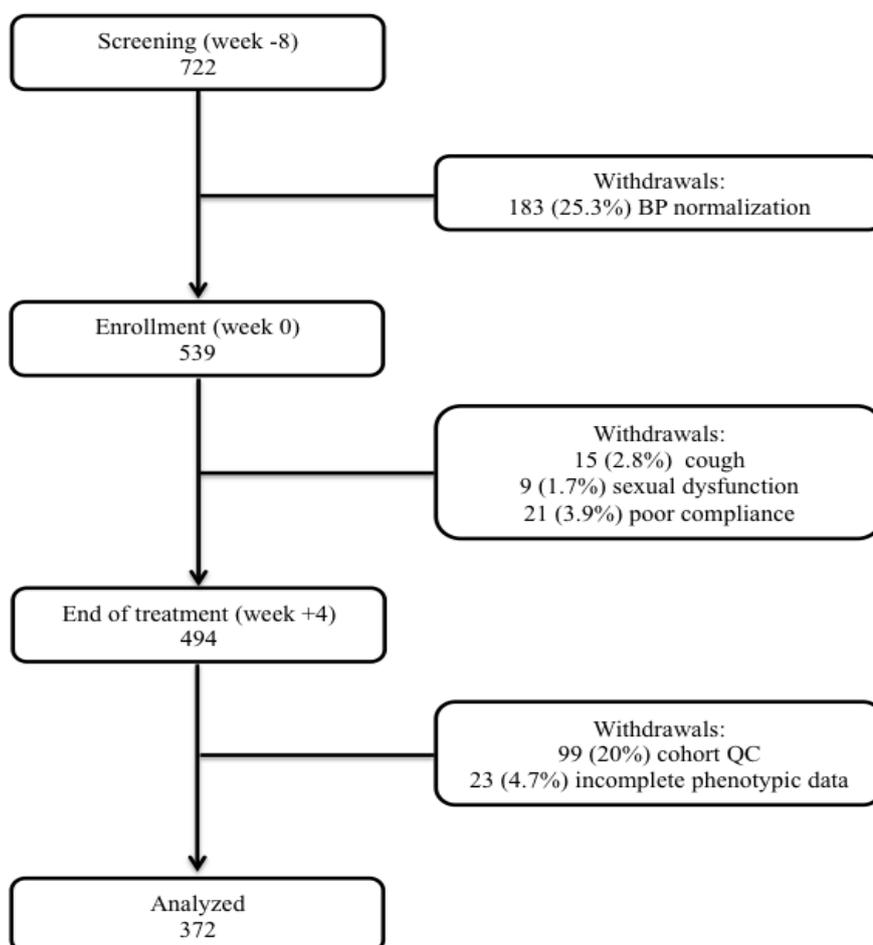


Figura 3. Diagramma di flusso dei partecipanti allo studio Losartan dopo 4 settimane di trattamento. EH = ipertensione essenziale; BP = pressione arteriosa; QC = controllo di qualità.

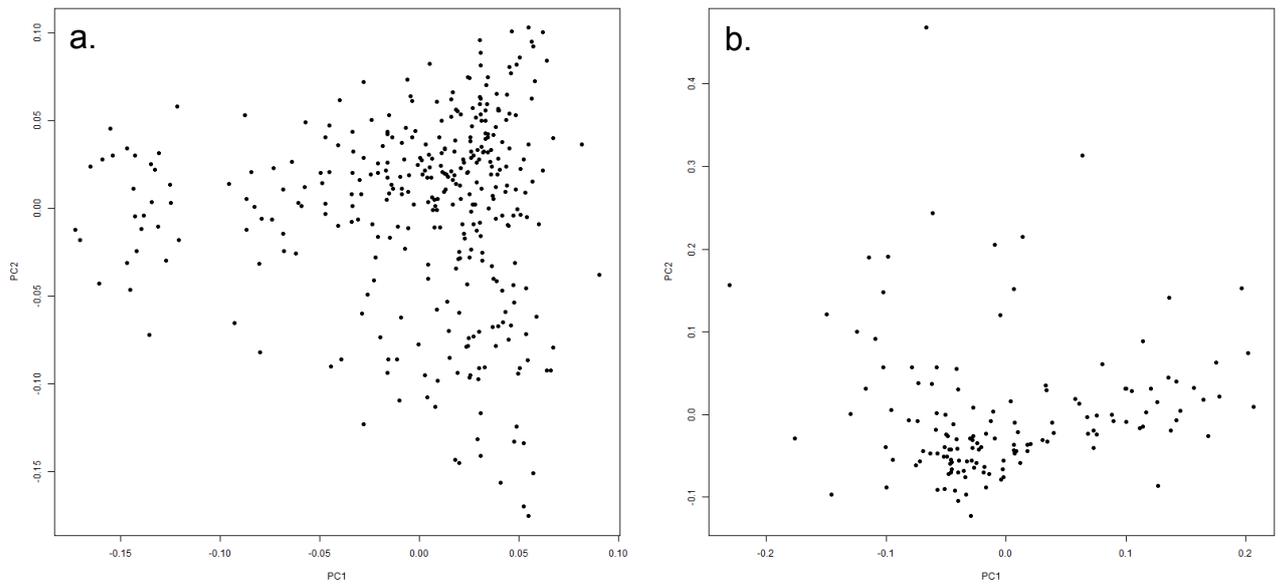


Figure 4. Grafico delle componenti principali delle coorti a) PHSS and b) HCTZ-Milano.

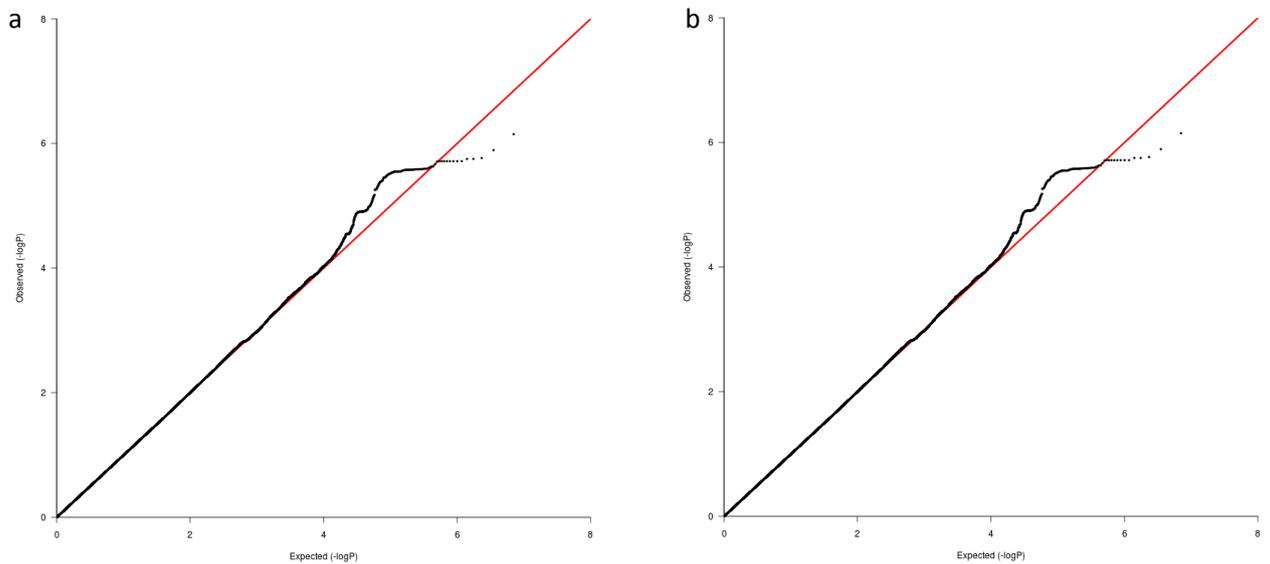


Figura 5. Quantile-quantile plot dei p values dei polimorfismi a singolo nucleotide emersi dall'analisi di associazione genome wide della a) risposta della pressione arteriosa sistolica (Δ SBP4) e b) risposta della pressione arteriosa diastolica (Δ DBP4) all'idroclorotiazide.

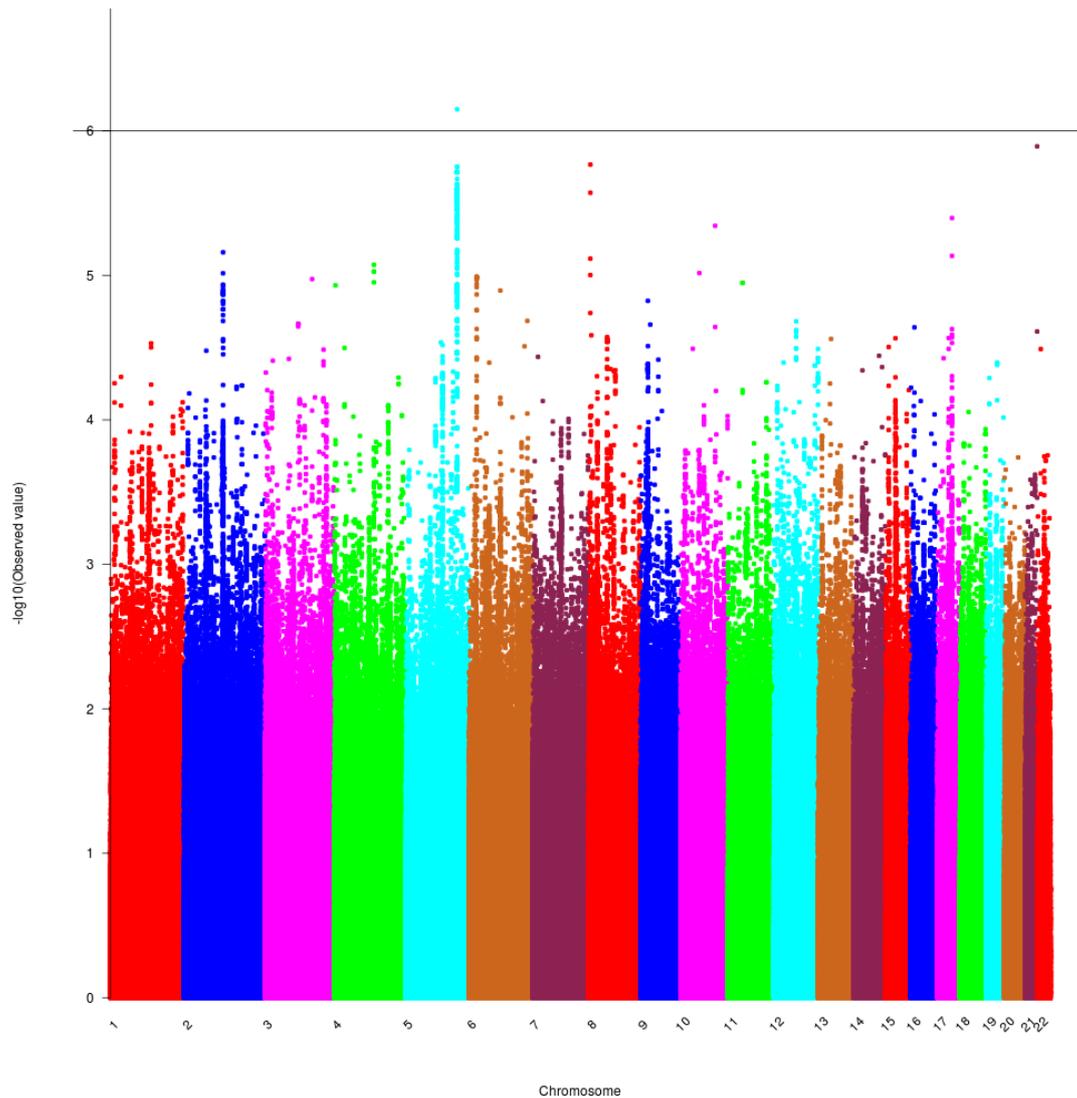


Figure 6. Manhattan plot del test statistico di regressione lineare per singolo SNP per Δ SBP8. L'analisi di regressione lineare aggiustata per genere, età, pressione sistolica basale e componenti principali. I risultati sono riportati come $-\log_{10}$ (P value) per posizione genomica.

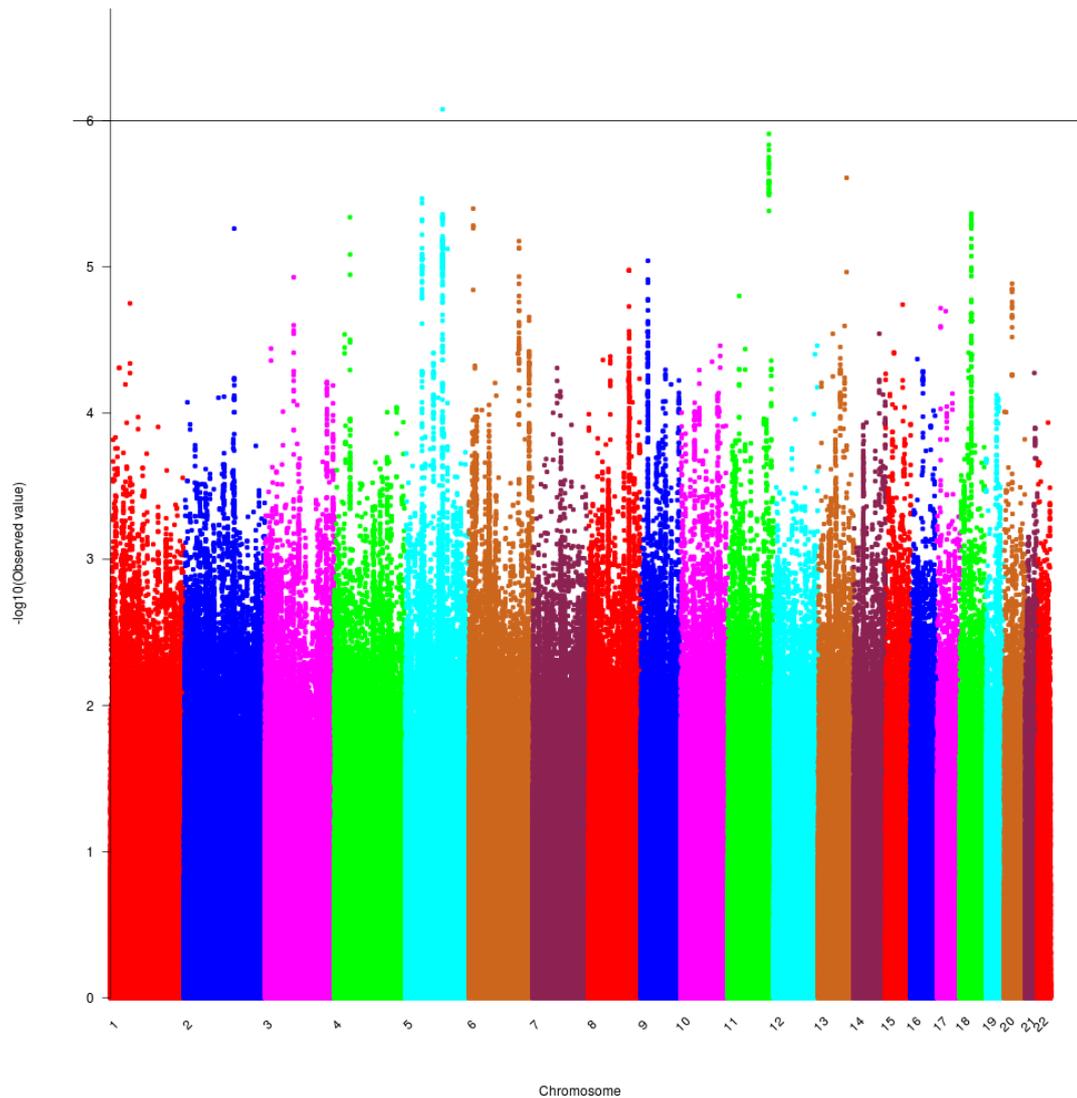


Figure 7. Manhattan plot del test statistico di regressione lineare per singolo SNP per Δ DBP8. L'analisi di regressione lineare è stata aggiustata per genere, età, pressione sistolica basale e componenti principali. I risultati sono riportati come $-\log_{10}$ (P value) per posizione genomica.

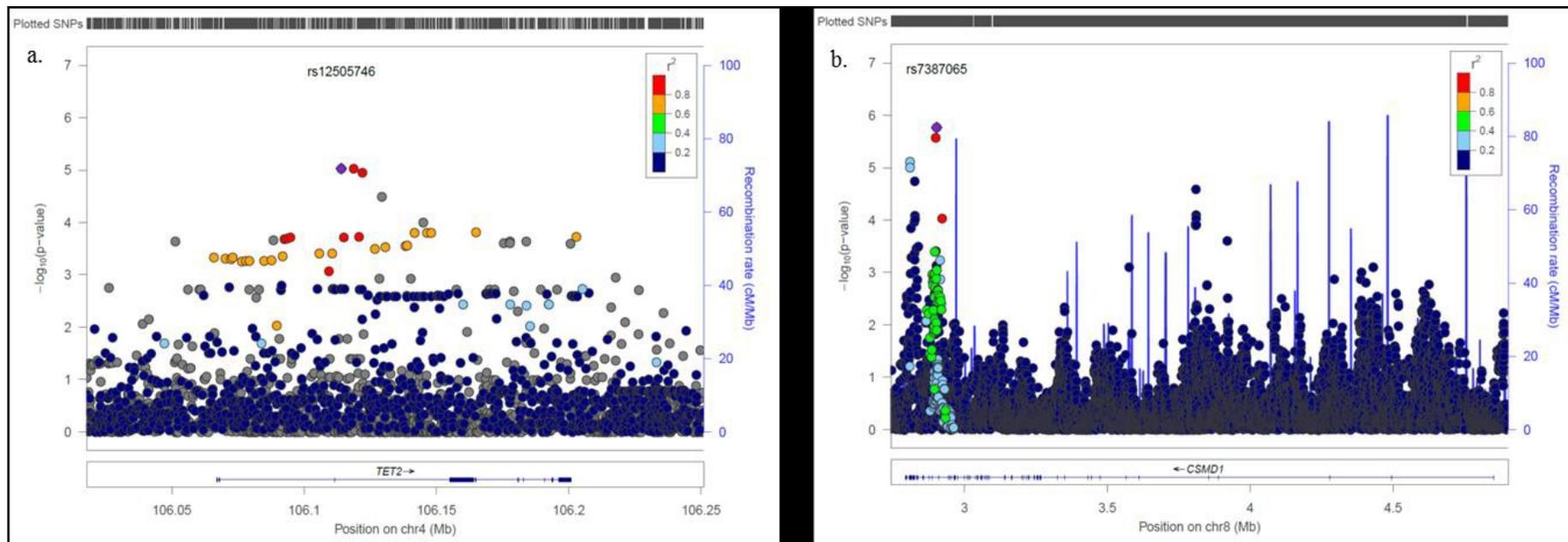


Figura 8: Local regional plot per le regioni TET2 (pannello a) e CSMD1 (pannello b).

Ogni cerchio rappresenta un polimorfismo a singolo nucleotide (SNP), l'asse y è il $-\log_{10}$ del p-value di associazione per la risposta all'HCTZ e l'asse x rappresenta la posizione fisica sul cromosoma (build 37, hg19). I cerchi sono colorati secondo il linkage disequilibrium (LD; r^2) tra un dato SNP e i best SNPs rs12505746 e rs7387065 rispettivamente (cerchi viola).

CSMD1: CUB and Sushi multiple domains protein 1; TET2: Tet methylcytosine dioxygenase 2; HCTZ: hydrochlorothiazide.

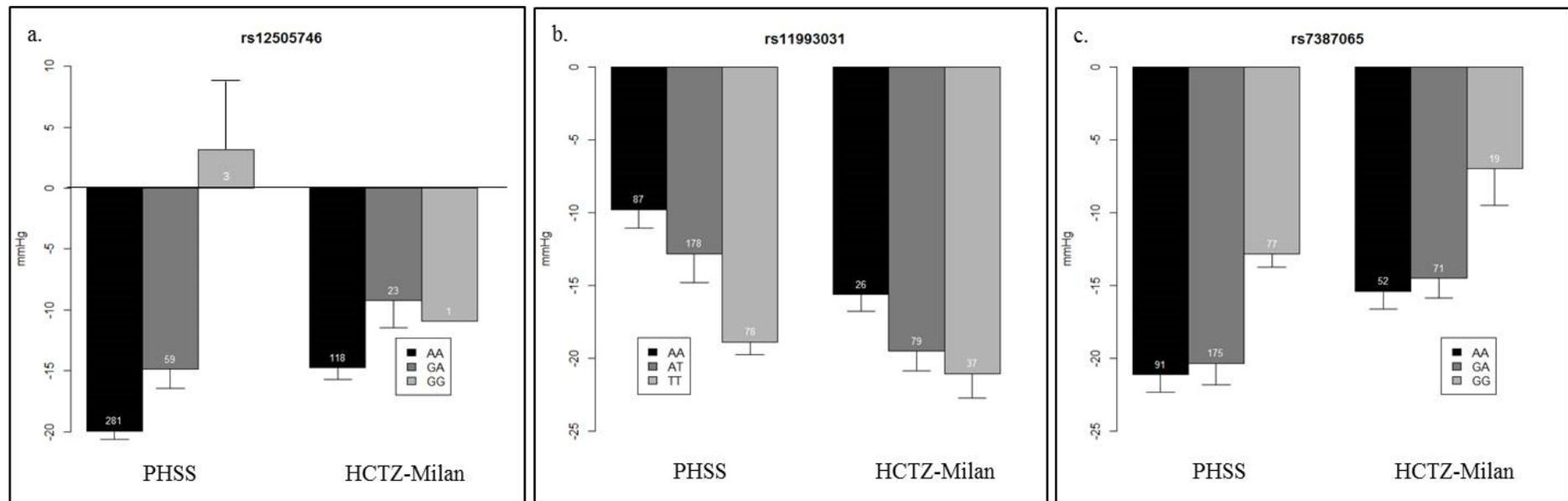


Figura 9: Grafico della risposta pressoria sistolica all'idroclorotiazide per lo SNP rs12505746 che si trova in TET2 (pannello a), e gli SNPs rs11993031 (pannello b) e rs7387065 nel gene CSMD1 (pannello c) nei partecipanti delle due coorti (PHSS e HCTZ-Milano). Il numero di individui con i differenti genotipi è riportato sotto ogni istogramma. La risposta della pressione è aggiustata per il livello BP pre-trattamento, l'età, il sesso e le componenti principali.

9. BIBLIOGRAFIA

- 1 Carretero OA, Oparil S. Essential hypertension. Part I: definition and etiology. *Circulation*. 2000 Jan 25;101(3):329-35.
- 2 Mancia G, Fagard R, Narkiewicz K, Redón J, Zanchetti A, Böhm M, et al. 2013. ESH/ESC Guidelines for the management of arterial hypertension: the task force for the management of arterial hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J* 2013; 34:2159-2219.
- 3 Kitsios GD and Zintzaras E. Synopsis and data synthesis of genetic association studies in hypertension for the adrenergic receptors family genes: the CUMAGAS-HYPERT database. *Am J Hypertens*. 2010 March; 23(3):305–313.
- 4 Herrera VL, Pasion KA, Moran AM, Zaninello R, Ortu MF, Fresu G, Piras DA, Argiolas G, Troffa C, Glorioso V, Masala W, Glorioso N, Ruiz-Opazo N. A functional 12T-Insertion Polymorphism in the ATP1A1 Promoter Confers Decreased. *PLoS One*. 2015 Jan 23;10(1):e0116724.
- 5 Allen W. Cowley, Jr. The genetic dissection of essential hypertension. *Nature Reviews Genetics* 7, 829-840 (November 2006).
- 6 Johnson JA, Turner ST. Hypertension pharmacogenomics: current status and future directions. *Curr Opin Mol Ther* 2005; 7:218-225.
- 7 Sacks FM, Svetkey LP, Vollmer WM, Appel LJ, Bray GA, Harsha D, Obarzanek E, Conlin PR, Miller ER 3rd, Simons-Morton DG, Karanja N, Lin PH; DASH-Sodium Collaborative Research Group. Effects on blood pressure of reduced dietary sodium and the Dietary Approaches to Stop Hypertension (DASH) diet. *N Engl J Med*. 2001 Jan 4;344(1):3-10.
- 8 Vollmer WM, Sacks FM, Ard J, Appel LJ, Bray GA, Simons-Morton DG, Conlin PR, Svetkey LP, Erlinger TP, Moore TJ, Karanja N; DASH-Sodium Trial Collaborative Research Group. Effects of diet and sodium intake on blood pressure: subgroup analysis of the DASH-sodium trial. *Ann Intern Med*. 2001 Dec18;135(12):1019-28.
- 9 Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, Cushman WC, Green LA, Izzo JL Jr, et al. The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure: the JNC 7 report. *JAMA* 2003; 289:2560-2572.
- 10 He J, Whelton PK, Appel LJ, Charleston J, Klag MJ. Long-term effects of weight loss and dietary sodium reduction on incidence of hypertension. *Hypertension*. 2000 Feb;35(2):544-9.

11 Whelton SP, Chin A, Xin X, He J. Effect of aerobic exercise on blood pressure: a meta-analysis of randomized, controlled trials. *Ann Intern Med.* 2002 Apr 2;136(7):493-503.

12 Xin X1, He J, Frontini MG, Ogden LG, Motsamai OI, Whelton PK. Effects of alcohol reduction on blood pressure: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Hypertension.* 2001 Nov;38(5):1112-7.

13 Arnett DK1, Claas SA, Glasser SP. Pharmacogenetics of antihypertensive treatment. *Vascul Pharmacol.* 2006 Feb;44(2):107-18.

14 Harrison, Kasper, Braunwald, Fauci, Hauser, Longo, Jameson, 16a edizione, vol. 2, cap. 230 pag. 1667.

15 Pickkers P, Garcha RS, Schachter M, Smits P, Hughes AD. Inhibition of carbonic anhydrase accounts for the direct vascular effects of hydrochlorothiazide. *Hypertension* 1999; 33:1043-1048.

16 Johnson JA, Turner ST. Hypertension pharmacogenomics: current status and future directions. *Curr Opin Mol Ther* 2005; 7:218-225.

17 Cusi D, Barlassina C, Azzani T. Polymorphisms of alpha-adducin and salt sensitivity in patients with essential hypertension. *Lancet* 1997; 349:1353-1357.

18 Glorioso N, Manunta P, Filigheddu F, Troffa C, Stella P, Barlassina C, et al. The role of alpha-adducin polymorphism in blood pressure and sodium handling regulation may not be excluded by a negative association study. *Hypertension* 1999; 34:649-654.

19 Sciarrone MT, Stella P, Barlassina C, Manunta P, Lanzani C, Bianchi G, et al. ACE and alpha-adducin polymorphism as markers of individual response to diuretic therapy. *Hypertension* 2003; 41:398-403.

20 Manunta P1, Lavery G, Lanzani C, Braund PS, Simonini M, Bodycote C, et al. Physiological interaction between alpha-adducin and WNK1-NEDD4L pathways on sodium-related blood pressure regulation. *Hypertension* 2008; 52:366-372.

21 Citterio L, Lanzani C, Manunta P. Polymorphisms, hypertension and thiazide diuretics. *Pharmacogenomics* 2011; 12:1587-1604.

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

- 23 Vogel F. Moderne problem der humangenetik. *Ergeb Inn Med U Kinderheilk.* 1959; 12:52-125.
- 24 Glorioso N, Argiolas G, Filigheddu F, Troffa C, Cocco F, Bulla E, et al. Study Group on Cardiovascular Pharmacogenomics of Italian Society of Hypertension. Conceptual basis and methodology of the SOPHIA study. *Pharmacogenomics* 2007; 8:1497-1509.
- 25 Frau F, Zaninello R, Salvi E, Ortu MF, Braga D, Velayutham D, Argiolas G, Fresu G, Troffa C, Bulla E, Bulla P, Pitzoi S, **Piras DA**, Glorioso V, Chittani M, Bernini G, Bardini M, Fallo F, Malatino L, Stancanelli B, Regolisti G, Ferri C, Desideri G, Scioli GA, Galletti F, Sciacqua A, Perticone F, Degli Esposti E, Sturani A, Semplicini A, Veglio F, Mulatero P, Williams TA, Lanzani C, Hiltunen TP, Kontula K, Boerwinkle E, Turner ST, Manunta P, Barlassina C, Cusi D, Glorioso N. Genome-wide association study identifies CAMKID variants involved in blood pressure response to losartan: the SOPHIA study. *Pharmacogenomics.* 2014 Sep;15(13):1643-52.
- 26 Medical Research Council Working Party on Mild Hypertension. Course of blood pressure in mild hypertensives after withdrawal of long term antihypertensive treatment. *Br Med J* 1986; 293:988-992.
- 27 Hiltunen TP, Suonsyrjä T, Hannila-Handelberg T, Paavonen KJ, Miettinen HE, Strandberg 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* 2007; 20:311-318.
- 28 Chapman AB, Schwartz GL, Boerwinkle E, Turner ST. Predictors of antihypertensive response to a standard dose of hydrochlorothiazide for essential hypertension. *Kidney Int* 2002; 6:1047-1055.
- 29 Hansson L, Hedner T, Lund-Johansen P, Kjeldsen SE, Lindholm LH, Syvertsen JO, et al. Randomised trial of effects of calcium antagonists compared with diuretics and beta-blockers on cardiovascular morbidity and mortality in hypertension: the Nordic Diltiazem (NORDIL) study. *Lancet* 2000; 356:359-365.
- 30 Johnson JA, Boerwinkle E, Zineh I, Chapman AB, Bailey K, Cooper-DeHoff RM, et al. Pharmacogenomics of antihypertensive drugs: rationale and design of the Pharmacogenomic Evaluation of Antihypertensive Responses (PEAR) study. *Am Heart J* 2009; 157:442-449.
- 31 Rivera NV, Carreras-Torres R, Roncarati R, Viviani-Anselmi C, De Micco F, Mezzelani A, et al. Assessment of the 9p21.3 locus in severity of coronary artery disease in the presence and absence of type 2 diabetes. *BMC Med Genet* 2013; 14:11.
- 32 De Luca N, Izzo R, Iaccarino G, Malini PL, Morisco C, Rozza F, et al. The use of a telematic connection for the follow-up of hypertensive patients improves the cardiovascular prognosis. *J Hypertens* 2005; 23:1417-1423.

- 33 Suonsyrjä T, Hannila-Handelberg T, Miettinen HE, Donner K, Strandberg T, et al. Laboratory tests as predictors of the antihypertensive effects of amlodipine, bisoprolol, hydrochlorothiazide and losartan in men: results from the randomized, double-blind, crossover GENRES Study. *J Hypertens* 2008; 26:1250-1256.
- 34 Turner ST, Boerwinkle E, O'Connell JR, Bailey KR, Gong Y, Chapman AB, et al. Genomic association analysis of common variants influencing antihypertensive response to hydrochlorothiazide. *Hypertension* 2013; 62:391-397.
- 35 Salvi E, Kutalik Z, Glorioso N, Benaglio P, Frau F, Kuznetsova T, et al. 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; 59:248-255.
- 36 Howie B, Fuchsberger C, Stephens M, Marchini J, Abecasis GR. Fast and accurate genotype imputation in genome-wide association studies through pre-phasing. *Nat Genet* 2012; 44:955-959.
- 37 Anderson CA, Petterson FH, Clarke GM, Cardon LR, Morris AP, Zondervan KT. Data quality control in genetic case-control association studies. *Nat Protoc* 2010; 5:1564-1573.
- 38 Purcell S, Neale B, Todd-Brown K, Thomas L, Ferreira MA, Bender D, et al. PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *Am J Hum Genet* 2007; 81:559-575.
- 39 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* 2006; 38:904-909.
- 40 Patterson N, Price AL, Reich D. Population structure and eigenanalysis. *PLoS Genet* 2006; 2:2074-2093.
- 41 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* 2012; 59:1204-1211.
- 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* 2010; 34:816-834.
- 43 Li Y, Willer CJ, Sanna S, Abecasis GR. Genotype Imputation. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2009; 10:387-406.
- 44 Willer CJ, Li Y, Abecasis GR. METAL: fast and efficient meta-analysis of genomewide association scans. *Bioinformatics* 2010; 26:2190-2191.

- 45 Tahiliani M, Koh KP, Shen Y, Pastor WA, Bandukwala H, Brudno Y, et al. Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science* 2009; 324:930-935.
- 46 Yu Z, Kong Q, Kone BC. Aldosterone reprograms promoter methylation to regulate α ENaC transcription in the collecting duct. *Am J Physiol Renal Physiol* 2013; 305:F1006-1013.
- 47 Korte S, Sträter AS, Drüppel V, Oberleithner H, Jeggle P, Grossmann C, et al. Feedforward activation of endothelial ENaC by high sodium. *FASEB J.* 2014 Sep;28(9):4015-25.
- 48 Kusche-Vihrog K, Jeggle P, Oberleithner H. The role of ENaC in vascular endothelium. *Pflugers Arch* 2014; 466:851-859.
- 49 Velayos-Baeza A, Vettori A, Copley RR, Dobson-Stone C, Monaco AP. Analysis of the human VPS13 gene family. *Genomics* 2004; 84:536-549.
- 50 Kristiansen M, Kozyraki R, Jacobsen C, Nexø E, Verroust PJ, Moestrup SK. Molecular dissection of the intrinsic factor-vitamin B12 receptor, cubilin, discloses regions important for membrane association and ligand binding. *J Biol Chem* 1999; 274:20540-20544.
- 51 Lau WL, Scholnick SB. Identification of two new members of the CSMD gene family. *Genomics* 2003; 82:412-415.
- 52 Koriyama H, Nakagami H, Katsuya T, Sugimoto K, Yamashita H, Takami Y, et al. Identification of evidence suggestive of an association with peripheral arterial disease at the OSBPL10 locus by genome-wide investigation in the Japanese population. *J Atheroscler Thromb* 2010; 17:1054-1062.
- 53 Nock NL, Wang X, Thompson CL, Song Y, Baechle D, Raska P, et al. Defining genetic determinants of the Metabolic Syndrome in the Framingham Heart Study using association and structural equation modelling methods. *BMC Proc* 2009; 3 (suppl 7):S50.
- 54 Hong KW, Go MJ, Jin HS, Lim JE, Lee JY, Han BG, et al. Genetic variations in ATP2B1, CSK, ARSG and CSMD1 loci are related to blood pressure and/or hypertension in two Korean cohorts. *J Hum Hypertens* 2010; 24:367-372.
- 55 Takeda Y, Seko A, Hachisu M, Daikoku S, Izumi M, Koizumi A, et al. Both isoforms of human UDP-glucose: glycoprotein glucosyltransferase are enzymatically active. *Glycobiology* 2014; 24: 344-350.
- 56 Turner ST, Schwartz GL, Chapman AB, Boerwinkle E. C825T polymorphism of the G-protein $\beta(3)$ -subunit and antihypertensive response to a thiazide diuretic. *Hypertension* 2001; 37:739-743.

- 57 Schwartz GL, Turner ST, Chapman AB, Boerwinkle E. Interacting effects of gender and genotype on blood pressure response to hydrochlorothiazide. *Kidney Int* 2002; 62:1718-1723.
- 58 Turner ST, Chapman AB, Schwartz GL, Boerwinkle E. Effects of endothelial nitric oxide synthase, α -adducin, and other candidate gene polymorphisms on blood pressure response to hydrochlorothiazide. *Am. J. Hypertens* 2003; 16:834-839.
- 59 Turner ST, Schwartz GL, Chapman AB, Boerwinkle E. WNK1 kinase polymorphism and blood pressure response to a thiazide diuretic. *Hypertension* 2005; 46:758-765.
- 60 Luo F, Wang Y, Wang X, Sun K, Zhou X, Hui R. A functional variant of NEDD4L is associated with hypertension, antihypertensive response, and orthostatic hypotension. *Hypertension* 2009; 54:796-801.
- 61 Duarte JD, Lobbmeyer MT, Wang Z, Chapman AB, Gums JG, Langaee TY, hypertension and blood pressure response to hydrochlorothiazide. *Am J Hypertens* 2010; 24:340-346.
- 62 Wang Y, O'Connell JR, McArdle PF, Wade JB, Dorff SE, Shah SJ, et al. From the cover: whole-genome association study identifies STK39 as a hypertension susceptibility gene. *Proc. Natl Acad Sci USA* 2009; 106:226-231.
- 63 Han YF, Fan XH, Wang XJ, Sun K, Xue H, Li WJ, et al. Association of intergenic polymorphism of organic anion transporter 1 and 3 genes with hypertension and blood pressure response to hydrochlorothiazide. *Am J Hypertens* 2010; 24:340-346.
- 64 Lobbmeyer MT, Wang L, Zineh I, Turner ST, Gums JG, Chapman AB, et al. Polymorphisms in genes coding for GRK2 and GRK5 and response differences in antihypertensive-treated patients. *Pharmacogenet Genom* 2011; 21:42-49.
- 65 Turner ST, Bailey KR, Fridley BL, Chapman AB, Schwartz GL, Chai HS, et al. Genomic association analysis suggests chromosome 12 locus influencing antihypertensive response to thiazide diuretic. *Hypertension* 2008; 52:359-365.
- 66 Duarte JD, Zineh I, Burkley B, Gong Y, Langaee TY, Turner ST, et al. Effects of genetic variation in H3K79 methylation regulatory genes on clinical blood pressure and blood pressure response to hydrochlorothiazide. *J Transl Med* 2012; 10:56.
- 67 McDonough CW, Burbage SE, Duarte JD, Gong Y, Langaee TY, Turner ST, et al. Association of variants in NEDD4L with blood pressure response and adverse cardiovascular outcomes in hypertensive patients treated with thiazide diuretics. *J Hypertens* 2013; 31:698-704.

RINGRAZIAMENTI

Desidero ringraziare il Prof. Nicola Glorioso per avermi insegnato tutto quello che so sull'ipertensione, per avermi dato fiducia e per la professionalità e disponibilità con cui si è occupato della mia tesi.

Grazie in particolare a Roberta, Maria Francesca, Giovanni, Cesare, Giada e Wanda che mi hanno incoraggiato e hanno speso parte del proprio tempo per leggere e discutere con me le bozze del lavoro.

Desidero inoltre ringraziare l'intero Ambulatorio di ipertensione: la Dottoressa Troffa, il Dottor Argiolas, le infermiere e gli specializzandi della scuola di Medicina d'Emergenza-Urgenza che negli anni si sono avvicinati, che con la loro disponibilità e gentilezza mi hanno fatto sempre sentire a casa.

Ringrazio il mio amico Massimo e la mia amica Daria che già dai tempi dell'università mi hanno dato preziosi consigli e che hanno creduto in me e mi hanno aiutato ad affrontare più serenamente questo percorso.

Mio marito Franco che mi ha aiutato e sostenuto in ogni mia scelta, condividendo con me i momenti di successo e di gioia e spronandomi nei momenti di difficoltà.

“La presente tesi di dottorato è stata prodotta nell'ambito della scuola di dottorato in Scienze Biomediche indirizzo Fisiopatologia Medica dell'Università degli Studi di Sassari, a.a. 2014/2015 – XXVII ciclo, con il supporto di una borsa di studio finanziata con le risorse del P.O.R. SARDEGNA F.S.E. 2007-2013 - Obiettivo competitività regionale e occupazione, Asse IV Capitale umano, Linea di Attività I.3.1”.

Daniela Antonella Piras “Genetic variants involved in Blood Pressure response to hydrochlorothiazide identified by GWAS methodology”, Tesi di dottorato in Fisiopatologia Medica, Università degli studi di Sassari.