



A.D. MDLXII

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI SASSARI

Scuola di Dottorato di Ricerca in Scienze Biomediche
Indirizzo di Fisiopatologia Medica
Direttore: Prof. Eusebio Tolu

XXV Ciclo

Genome-wide 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

Direttore:
Prof. Eusebio Tolu

Referente di Indirizzo:
Prof. Roberto Manetti

Relatore:
Prof. Nicola Glorioso

Tesi di dottorato di:
Dr.ssa Maria Francesca Ortu

Anno Accademico 2011-2012

INDICE

1. INTRODUZIONE	2
2. OBIETTIVI	5
3. MATERIALI E METODI	6
3.1 Study Population	6
3.2 Genotipizzazione e Imputazione	7
3.3 Assemblaggio del Custom chip	8
3.4 Genotipizzazione e data filtering nella Validation	9
3.5 Illumina HumanCVD Genotype data of rs3918226 for meta-analysis <i>in silico</i>	9
3.6 Quality Control	10
3.7 Principal Component Analysis	11
3.8 Analisi Statistica	12
4. RISULTATI	14
5. DISCUSSIONE	18
6. PROSPETTIVE	22
FIGURE E TABELLE	23
BIBLIOGRAFIA	43
RINGRAZIAMENTI	

1. INTRODUZIONE

L'ipertensione essenziale (EH) è una condizione clinica che interessa gran parte (25-30%) della popolazione adulta, è un fattore di rischio per malattie cardiovascolari e renali^{1,2} e deriva dall'interazione tra fattori genetici, ambientali e stile di vita³. Per capire l'origine così composita di questa malattia dobbiamo innanzitutto arrivare a stabilire la via che dal genotipo ci porta all'espressione di quel determinato fenotipo. Questo richiede un approccio "genomico" globale che non era possibile sino a poco tempo fa.

Negli ultimi anni, enormi sforzi sono stati fatti nel reclutamento e nella genotipizzazione di decine di migliaia di individui e nella meta-analisi di molti studi di popolazione cross-sectional. Nonostante questo, la ricerca sulla genetica dell'EH è stata scoraggiata dal piccolo valore predittivo delle varianti genetiche scoperte e dal fatto che tali varianti spiegavano una piccola parte della variazione fenotipica.⁴⁻¹³ L'EH è una malattia a insorgenza tardiva e di conseguenza il piccolo effect sizes scoperto potrebbe in parte essere dovuto ad un'errata classificazione del campione, ad un bias nella selezione e ad una fenotipizzazione inadeguata di casi e controlli.^{9, 14,15} La selezione dei casi e dei controlli può avere effetti importanti sui risultati poiché un'errata classificazione può portare a una perdita di potere dello studio. Per i tratti comuni, come l'EH, questa deformazione può essere risolta definendo criteri di selezione più stringenti, reclutando controlli hyper-normal e adottando una definizione più rigorosa di caso.^{14, 15}

Tutti gli studi sin qui condotti che prendevano in considerazione una sola parte di tutto l'insieme (per esempio un singolo gene), per quanto abbiano portato a scoperte rilevanti, mancavano di una visione ampia della malattia, in tutta la sua complessità. Per superare questo limite si è pensato di applicare delle nuove ma ben collaudate tecnologie di "high throughput genotyping", analizzate con sofisticati modelli matematico-statistici, a delle coorti

Maria Francesca Ortu, "Genome-wide 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", Tesi di dottorato in Fisiopatologia Medica, Università degli Studi di Sassari

preesistenti di soggetti con ipertensione arteriosa essenziale (EH).

E' evidente come fosse necessario cambiare completamente approccio indirizzandolo non più alla ricerca di un singolo gene, ma, tramite una genotipizzazione completa, all'osservazione del genoma nella sua interezza. Si è dunque scelto, per perseguire questo obiettivo, l'approccio basato sul Polimorfismo a Singolo Nucleotide (SNP) visto il suo alto potere nell'individuazione dei geni suscettibili, indiscutibilmente maggiore se paragonato alla mappatura per microsatelliti per bassa densità. Si è dunque utilizzata la tecnologia *Illumina* per marcare gli SNPs e ottenere la Genotipizzazione Totale del Genoma (Whole Genome Genotyping – WGG) perché l'uso dei “chips” con cui funziona la macchina “Illumina” assicura la possibilità di generalizzare i risultati. WGG fornisce una rappresentazione uniforme dei loci che consente l'accesso alla quasi totalità degli SNPs del genoma. Questa metodologia si propone di analizzare più di 1 milione di “Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs)” cioè singole variazioni di basi a distanza di circa 2500-3000 paia di basi (bp) lungo tutto il genoma. In questo modo si rende identificabile qualunque variante genica (mutazione) possa insistere in un singolo gene o in una “area genomica” molto ristretta. Inoltre la tecnologia *Illumina*, oltre che la genotipizzazione, permette una facile valutazione della Variazione del Numero di Copie (Copy Number Variation – CNV) e della Perdita dell'Eterozigosi (Loss Of Heterozygosity – LOH), meccanismi fondamentali nella genetica delle popolazioni e negli studi di associazione. Le CNV, il cui schema in tutto il genoma è stato recentemente descritto, sono definite come un segmento di DNA di 1kb o più che mostra un numero di copie differente rispetto al genoma di riferimento. Questi riarrangiamenti genomici possono trovarsi all'interno di regioni interessate 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

Maria Francesca Ortu, “Genome-wide 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”, Tesi di dottorato in Fisiopatologia Medica, Università degli Studi di Sassari

patologie multifattoriali.

WGG è stato sviluppato in parallelo dall'Università degli Studi di Milano (UNIMI) e dal Centre Hospitalier Universitaire Vaudois Lausanne (CHUV). I dati genetici sono prelevati direttamente dai file generati dal *BeadStudio* e includono genotipi con parametri di qualità assieme a dati demografici, clinici e identificazione genica. I grossi file con i dati sul genotipo generati con il platform Illumina sono caricati nel database permettendo l'integrazione del genotipo con i dati sul fenotipo e le mappature genetiche. Grazie ad una "pipeline" altamente produttiva vengono generati automaticamente i file per l'analisi genetica. Questa viene eseguita tramite programmi come PLINK, R e StataSE e il risultato dell'analisi può essere facilmente visualizzato con l'applicazione di semplici software già a disposizione della comunità scientifica (per es: *Haploview*).

E' così che nasce lo studio HYPERGENES che s'inquadra nell'ambito di uno dei *Priority Themes* del 7° Programma Quadro dell'Unione Europea per il settore Salute nel 2007 in particolare per il punto HEALTH-2007-2.1.1-2: "*Molecular epidemiological studies in existing well characterised European (and/or other) population cohorts*". Questo studio ha l'obiettivo di individuare i geni responsabili dell'ipertensione e delle patologie ad essa associate, creare un nuovo approccio che, andando oltre l'ipertensione, ci permetta di capire le basi genetiche delle comuni malattie multifattoriali usando un processo sistematico, coordinato e multidisciplinare e ci consenta inoltre di progettare nuove strategie di prevenzione e trattamento.

Il Progetto HYPERGENES ha sviluppato uno studio a due fasi per studiare nuovi approcci genetici dell'ipertensione essenziale. Casi e controlli sono stati reclutati nel corso di molti anni da coorti ampiamente caratterizzate in diverse regioni europee usando accertamenti clinici standardizzati.

Maria Francesca Ortu, "Genome-wide 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", Tesi di dottorato in Fisiopatologia Medica, Università degli Studi di Sassari

2. OBIETTIVI

- 1) Individuare i geni responsabili dell'ipertensione arteriosa essenziale (EH) usando un approccio “whole genome association/entropy based”.
- 2) Sviluppare un modello integrato di malattia considerando l'ambiente, usando un approccio bioinformatico avanzato.
- 3) Validare la capacità del modello concettuale per identificare gli individui a rischio.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Study Population

Casi e controlli sono stati reclutati da coorti ampiamente caratterizzate utilizzando accertamenti clinici standardizzati, raccolti nel corso degli anni in diverse regioni europee (bilanciate tra Nord Europa, Italia continentale e Sardegna). Abbiamo definito casi gli individui di origine caucasica, non imparentati con altri partecipanti, che avessero sviluppato l'ipertensione (pressione sanguigna sistolica SBP>140 mmHg e pressione diastolica DBP>90 mmHg) o iniziato il trattamento antiipertensivo prima dei 50 anni. Gli individui con ipertensione secondaria sono stati esclusi.

I controlli sono individui normotesi (pressione arteriosa sistolica<135 e diastolica<85 mmHg) almeno fino all'età di 55 anni.

Tutti i soggetti ipertesi e normotesi erano in buona salute, non obesi (indice di massa corporea <30), non dislipidemicici (colesterolo <250; trigliceridi <200 mg/dl - valori ottenuti allo screening prima dell'inclusione nello studio).

Particolare attenzione è stata dedicata alla selezione dei controlli, gran parte del campione ha un follow-up di 5-10 anni dopo l'estrazione del DNA, che permette l'esclusione dei controlli che abbiano sviluppato l'ipertensione tardivamente, in modo da definire i controlli hyper-normal. Il DNA è stato estratto da sangue periferico, con le procedure standard.

Al fine di eseguire un'associazione genetica con fenotipi BP continui, abbiamo preso in considerazione due coorti aggiuntive: FLEMENGHO-EPOGH, n = 1514 e WHSS, n = 306, già ampiamente utilizzate per studi di epidemiologia genetica dell'ipertensione.

3.2 Genotipizzazione e Imputazione

In fase di Discovery, i campioni sono stati sottoposti a genotipizzazione con l'Illumina 1M-duo array e l'imputazione è stata effettuata con MACH¹⁶ usando come riferimento i 1000 Genome haplotypes (versione giugno 2010). Per validare e mappare con precisione i geni trovati associati con l'EH nella fase di Discovery è stato creato un Illumina custom chip di 14.055 marcatori a partire dall'elenco dei best-associati e di SNPs candidati sulla base di una conoscenza biologica a priori.

Per la fase di replica, abbiamo usato i dati in-silico di rs3918226 da ASCOT/AIBIII/NBS, BRIGHT, EPIC Torino, HYPEST e NORDIL /MDC.

Nella fase di Discovery tutti i campioni sono stati genotipizzati utilizzando l'Illumina 1M-duo array (Illumina Inc, San Diego, CA, USA). Il chip cattura 1199187 SNPs. In aggiunta ai marcatori necessari per un'ampia copertura del genoma il chip contiene 21877 SNPs non-synonymous, 51207 SNPs nei cromosomi sessuali, 138 nel DNA mitocondriale, 35969 SNPs che coprono le regioni recentemente riportate come varianti nel numero di copie, 30908 SNPs nelle regioni MHC e ADME.

La genotipizzazione è stata effettuata in due diversi centri di genotipizzazione: l'Università di Milano (UNIMI) e l'Università di Losanna (UNIL). L'UNIMI ha genotipizzato 2064 soggetti (1270 controlli e 794 casi), mentre l'UNIL ha eseguito la genotipizzazione di 1995 soggetti (665 casi e 1330 controlli).

Tutti i dati grezzi sono stati raccolti nel centro di genotipizzazione di Milano e analizzati con l'Illumina Software Genome Studio per chiamate genotipiche, utilizzando l'Illumina cluster file di riferimento. Una soglia di call rate del DNA è stata fissata a 0,95 e i DNA con call rate $\leq 0,95$ sono stati esclusi dal data set finale. Per ciascun DNA, dati dal cromosoma X sono stati utilizzati per verificare la discordanza con il sesso dichiarato.

Dopo l'analisi di associazione, è stata effettuata una valutazione finale di

Maria Francesca Ortu, "Genome-wide 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", Tesi di dottorato in Fisiopatologia Medica, Università degli Studi di Sassari

qualità del genotipo per gli SNPs significativamente associati ($p\text{-value} < 1 \cdot 10^{-4}$) mediante un controllo visivo del cluster plot, con l'obiettivo di escludere qualunque SNPs ambiguo.

Poiché la genotipizzazione è stata eseguita in due laboratori, le repliche sono state programmate in modo da stimare il tasso di errore di genotipizzazione tra i due centri. Il DNA di 20 individui è stato genotipizzato con l'1M-duo Illumina's BeadChips.

Tra i campioni con Call Rates $> 0,95$, il 99,624% delle chiamate genotipiche erano concordanti e lo 0,376% erano discordanti.

E' stata eseguita anche una verifica incrociata tra le prestazioni di scansione delle due piattaforme Illumina iScan. Dieci chip (20 campioni) sono stati elaborati e analizzati presso l'UNIMI (tasso medio di chiamata DNA 0,994). Gli stessi chip sono stati ri-scansionati presso l'UNIL. Abbiamo potuto dimostrare che tra le due piattaforme il 99,189% delle chiamate erano concordanti e lo 0,0053% erano discordanti. Per lo 0,805% delle chiamate non è stato possibile effettuare un confronto.

La Genome-wide imputation è stata effettuata mediante MACH utilizzando come riferimento i 1000 Genome haplotypes (versione giugno 2010). Gli SNPs con call rate $> 90\%$, la frequenza dell'allele minore $> 1\%$, e il p-value di Hardy-Weinberg $> 1E-7$ sono stati inclusi come set di input. Nella successiva analisi gli SNPs con una bassa qualità d'imputazione ($r^2\text{-hat} < 0,3$ o MAF $< 1\%$) sono stati ignorati. Ogni volta che il genotipo misurato era disponibile, esso replicava il valore di imputazione.

3.3 Assemblaggio del Custom chip

Al fine di ripetere il test e mappare i geni trovati associati a l'EH abbiamo selezionato circa 15000 SNPs per un custom iSelect HD Illumina.

La selezione si è basata su:

Maria Francesca Ortu, "Genome-wide 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", Tesi di dottorato in Fisiopatologia Medica, Università degli Studi di Sassari

1. Una lista di SNPs significativamente associati all'ipertensione nell'analisi caso-controllo: p-value $<1 \cdot 10^{-4}$. D'ora in poi questi SNPs saranno segnalati come *BEST SNPs*.
2. Una lista di geni candidati e SNPs storicamente studiati nell'ipertensione o di geni selezionati in base al loro ruolo funzionale e per il loro coinvolgimento in percorsi biologici rilevanti per l'ipertensione. Questi SNPs sono stati inclusi indipendentemente dai loro risultati di associazione (cioè indipendentemente dal p-value di associazione) e se non già inclusi nella lista dei *Best SNPs*. Da ora in poi questi SNPs saranno segnalati come SNPs candidati.

3.4 Genotipizzazione e data filtering nella Validation

La genotipizzazione è stata effettuata su un totale di 2869 campioni dall'Università di Milano (UNIMI) e dall'Università di Losanna (UNIL) che hanno genotipizzato 1700 e 1169 campioni rispettivamente.

Nella fase di Validation la soglia di call rate del DNA è stata fissata a 0,98 e questo ha portato all'esclusione di 173 DNA dal data set finale che era composto da 2696 DNA.

3.5 Illumina HumanCVD Genotype data di rs3918226 per meta-analisi *in silico*

Noi abbiamo effettuato una meta-analisi di rs3918226 utilizzando i dati *in silico* degli studi HYPEST, ASCOT/AIBIII/NBS, BRIGHT e NORDIL/MDC genotipizzati con l'Illumina HumanCVD BeadArray.

L'Human BeadChip CVD è il primo pannello standard di genotipizzazione di SNP ad alta densità specificamente mirato per studi sulle malattie cardiovascolari (CVD). Il BeadChip presenta 49.452 marcatori che catturano la diversità genetica tra circa 2.100 geni associati con i processi coinvolti nelle

Maria Francesca Ortu, "Genome-wide 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", Tesi di dottorato in Fisiopatologia Medica, Università degli Studi di Sassari

malattie cardiovascolari come i cambiamenti della pressione sanguigna, l'insulino-resistenza, i disordini metabolici, la dislipidemia, e l'infiammazione.

3.6 Quality Control

Tutti i controlli di qualità e le analisi statistiche sono state effettuate secondo i protocolli scritti da C.A. Anderson¹⁷ e G.M. Clarke¹⁸.

Il campione di Discovery composto da 4059 individui genotipizzati è stato sottoposto a controllo di qualità. 143 campioni con Call Rate <0,95 sono stati esclusi. I genotipi di 56 soggetti sex mismatch (differenza tra il genere riportato nei dati clinici e quello stimato con la genotipizzazione degli SNP legati al sesso) sono stati identificati e rimossi dall'analisi.

Utilizzando la stima genome-wide IBD (Plink versione 1.7¹⁷) abbiamo identificato e rimosso dall'analisi 64 duplicati e 156 soggetti imparentati (44 famigliari, 63 fratelli, 23 genitori/figli, 26 di secondo grado). Utilizzando il pacchetto di EIGENSOFT (versione 2.0)^{18,19}, abbiamo rimosso 25 outliers definiti come individui che superano un valore predefinito di deviazioni standard (6,0) da tutto il campione. Dopo il controllo di qualità il campione finale caso-controllo è composto da 3615 soggetti: 1865 casi ipertesi e 1750 controlli sani (2.294 maschi, 1.321 femmine).

Secondo l'etnia il campione di Hypergenes è composto da 906 soggetti del Nord Europa (25,06%), 1399 Sardi (38,70%) e 1310 provenienti dall'Italia continentale (36,24%). La **tabella 1** mostra la distribuzione del campione nelle diverse coorti suddivise tra i casi e i controlli.

SNPs con una frequenza dell'allele minore (MAF) <1%, in un significativo disequilibrio di Hardy-Weinberg ($p\text{-value} < 1 \cdot 10^{-8}$) e con aliquota <99% sono stati rimossi lasciando 882.564 SNPs per l'analisi. Abbiamo valutato la struttura della popolazione all'interno dei dati mediante l'analisi delle componenti principali (PCA).

Maria Francesca Ortu, "Genome-wide 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", Tesi di dottorato in Fisiopatologia Medica, Università degli Studi di Sassari

Il campione di Validation era composto da 2696 individui genotipizzati.

Dopo il controllo di qualità dei dati per parentela /duplicati (32 soggetti duplicati e 33 imparentati), il campione finale caso-controllo era composto da 2631 soggetti: 1385 ipertesi e 1.246 controlli (1.417 maschi e 1.214 femmine). Secondo l'etnia, il campione Hypergenes era composto da 1262 Nord europei (47,97%), 788 Sardi (29,95%) e 581 Italiani continentali (22,08%). La **tabella 2** mostra la distribuzione del campione in diverse coorti suddivise tra i casi e i controlli.

Abbiamo filtrato 335 SNPs, sulla base del call rate di genotipizzazione dello SNP (<99%), 2641 SNPs per MAF <0,01 e 39 marcatori che non superano HWE test nei controlli (p-value <1 • 10⁻⁶). Dopo la scrematura per frequenza e genotipizzazione, 10684 SNPs autosomici sono disponibili per l'analisi di associazione.

3.7 Principal Component Analysis

Nel campione di Discovery, abbiamo effettuato l'Analisi delle Componenti Principali (PCA) su 1M di SNPs utilizzando il pacchetto EIGENSOFT (versione 2.0)^{18,19}. Abbiamo rimosso dall'intero campione 25 genetic outliers definiti come individui che superano di 6 le deviazioni standard in ognuna delle componenti principali.

I risultati delle prime 2 PCs sono descritte nella **figura 1**. Il grafico mostra chiaramente la clasterizzazione dei soggetti in base alla loro provenienza geografica. Nella **figura 1A** i campioni sono rappresentati come macro-gruppi (Nord Europa, Italia Continentale e Sardegna). La **figura 1B** mostra gli stessi cluster con i soggetti indicati, secondo i centri di reclutamento.

Abbiamo scelto come significative le prime 10 PC (p-value <1•10⁻⁷) per includerle come covariate nel modello di regressione logistica.

Nel campione di Validation, l'analisi delle PCA è stata effettuata utilizzando

Maria Francesca Ortu, "Genome-wide 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", Tesi di dottorato in Fisiopatologia Medica, Università degli Studi di Sassari

10684 SNPs. Sono stati esclusi 21 soggetti come outliers.

I risultati, per le prime 2 PCs, sono mostrati nella **figura 2**. La distribuzione dei tre macro-gruppi è molto simile tra Discovery e Validation. Tuttavia, a causa del numero limitato di SNPs, i cluster non sono così ben definiti come nella Discovery. Per convalidare l'utilizzo delle PCs come covariate nella regressione logistica, abbiamo ri-eseguito la PCA sul campione di Discovery utilizzando solo gli SNPs in comune tra le due fasi di studio. Abbiamo potuto replicare correttamente la distribuzione dei soggetti della Discovery nelle tre macro-aree (dati non mostrati).

Per uniformare questa fase di analisi con quella della Discovery, abbiamo utilizzato come covariate nell'analisi di associazione le prime 10 PCs (p-value $< 1 \cdot 10^{-2}$).

3.8 Analisi statistica

Nella fase di Discovery, abbiamo testato ogni SNP per associazione con l'ipertensione utilizzando una regressione logistica mediante un modello additivo con aggiustamento per sesso e per le prime 10 PC, come implementato in plink¹⁷. La residual inflation (1,04) del test statistico è stata corretta tramite il controllo genomico.

Nella fase di Validation, l'analisi di regressione logistica è stata effettuata utilizzando un modello genetico additivo aggiustata per sesso e per le prime 10 PCs.

L'analisi combinata dei risultati di Hypergenes Discovery, Hypergenes Validation, HYPEST, ASCOT/AIBIII/NBS, BRIGHT e NORDIL/MDC è stata condotta utilizzando sia Z-score che inverse variance weighting meta-analysis come implementato in METAL²⁰.

Il Q-test di Cochran è stato utilizzato per analizzare l'eterogeneità. I test

Maria Francesca Ortu, "Genome-wide 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", Tesi di dottorato in Fisiopatologia Medica, Università degli Studi di Sassari

METAL di analisi di eterogeneità se osservati per effect sizes (o test statistici) sono omogenei nei campioni. La risultante eterogeneità statistica ha $n-1$ gradi di libertà per n campioni. Nella meta-analisi, una soglia di significatività genome-wide di $5 \cdot 10^{-8}$ è stata considerata come genome-wide significativa.

Abbiamo testato l'interazione tra lo SNP di eNOS scoperto (rs3918226) e le zone che in modo più plausibile possono interagire con il gene eNOS: i geni dell'actina (ACTA1, ACTA2, ACTB, ACTG1, ACTG2) e i geni dell'Heat Shock Protein-90 (HSP90: HSP90AA1, HSP90AA2, HSP90AB1). In totale 159 SNPs sono stati testati per interazione.

Le covariate comuni, il sesso e le componenti principali ancestrali sono stati inclusi nella regressione logistica. Per valutare il significato, sono state applicate le correzioni per test multipli. Poiché molti SNPs sono in LD con altri, noi abbiamo permutato il fenotipo 100 volte per controllare il tasso di "falsi". Abbiamo usato una soglia media del 20% per permettere interazioni suggestive con evidenze più deboli.

4. RISULTATI

Il progetto prevede uno studio caso-controllo diviso in due fasi. Nella fase di Discovery i 1865 casi e i 1.750 controlli (2.294 maschi, 1.321 femmine) sono stati tutti genotipizzati sull'Illumina 1M Duo chip. Il campione è costituito da una popolazione etnicamente diversificata (25,06% Nord Europei, 38,70% Sardi e 36,24% Italia Continentale). Questa fase è stata seguita da una fase di Validation di ulteriori 1.385 casi e 1.246 controlli (1.417 maschi e 1.214 femmine). Secondo l'etnia, il campione di Validation era composto da 1262 Nord Europei (47,97%), 788 Sardi (29,95%) e 581 Italiani Continentali (22,08%).

L'Analisi delle Componenti Principali (PCA) dei dati del genotipo è stata effettuata per individuare i principali assi di variazione usate come covariate per correggere per stratificazione della popolazione²³. La popolazione della Discovery nella mappa delle componenti principali ha mostrato (circa) tre gruppi distinti di uguale dimensione corrispondenti ai tre principali gruppi etnici, come previsto dal disegno dello studio (**figura 1**). Tutte le analisi di associazione sono state corrette per le componenti principali e il sesso, includendole come covariate nel modello della regressione logistica. In aggiunta è stata applicata la correzione del controllo genomico (GC) (fattore genomico di inflazione 1,04). Nella fase di Discovery, dopo GC sono stati identificati 90 SNPs (57% intragenica) con $p\text{-value} < 1 \cdot 10^{-4}$ (**figura 3, tabella 3**). Gli SNPs più promettenti sono stati genotipizzati nella popolazione di Validation tramite un chip Illumina Infinium Custom. La meta-analisi dei dati della Discovery e della Validation ha rivelato che lo SNP rs3918226 è associato all'EH nei caucasici, raggiungendo un P_{combined} di $2,58 \cdot 10^{-13}$ e OR di 1,54 per allele T (95% CI, 1,37-1,73) con un modello additivo (**figura 4, tabella 4 e figura 5**). Gli odds ratios stimati nelle popolazioni di Discovery e

di Validation erano costanti tra le diverse popolazioni caucasiche del campione HYPERGENES (**figura 6**).

Il polimorfismo rs3918226 mappa nella regione del promotore del gene eNOS (-665 C>T, NOS3).^{24,25} Le frequenze dell'allele T nel presente studio sono il 13,8% nei casi e 8,9% nei controlli. Lo SNP rs3918226 è monomorfo nei campioni di HYPERGENES non caucasici (Wandsworth Heart & coorte Stroke Study, WHSS) e nei campioni HapMap africani e asiatici.

Il secondo miglior risultato si localizza sul cromosoma 7: 150,314,954 (G/A SNP, MAF allele A=3%) con P-value di $2,46 \cdot 10^{-6}$ e OR 2,25, è stato ottenuto by imputation basandosi sui 1000 Genomes haplotypes (versione giugno 2010), la qualità di imputation era molto alta ($r^2\text{-hat} = 0.94$). Purtroppo non abbiamo potuto replicare l'osservazione nella Validation a causa di una bassa qualità di imputation. Altri 7 SNPs all'interno del gene eNOS hanno mostrato significativi valori di p ($1 \cdot 10^{-3} < p\text{-value} < 1 \cdot 10^{-5}$): rs2853792 (intronic, $P_{\text{combined}}=7.76 \cdot 10^{-5}$), rs1549758 (codificante, $P_{\text{combined}}=3.32 \cdot 10^{-4}$), rs1800779 (intronic, $P_{\text{combined}}=1.16 \cdot 10^{-3}$), rs6951150 (intergenico, $P_{\text{combined}}=1.64 \cdot 10^{-3}$), rs743507 (intronic, $P_{\text{combined}}=1.76 \cdot 10^{-3}$), rs1800780 (intronic, $P_{\text{combined}}=1.96 \cdot 10^{-3}$), rs1800783 (intronic, $P_{\text{combined}}=2,89 \cdot 10^{-3}$) (**figura 4**).

La **tabella 4** mostra anche altri SNP significativi con p-value compresi tra $1 \cdot 10^{-3}$ e $1 \cdot 10^{-5}$ che mappano in diversi geni come la subunità alfa-1 del canale del potassio calcio-attivato (KCNMA1), il plasminogeno (PLG), il recettore orfano alfa retinoide-correlato (RORA) e la proteina 1 contenete il dominio WW (WWC1).

Inoltre, i segnali di SNP precedentemente presentati in letteratura sono nel nostro studio nella stessa direzione degli studi originali^{5,6,8} mostrando una prova di una associazione marginalmente significativa in HYPERGENES (**tabella 5**).

Abbiamo fatto una meta-analisi sull' rs3918226 utilizzando i dati *in-silico*

Maria Francesca Ortu, "Genome-wide 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", Tesi di dottorato in Fisiopatologia Medica, Università degli Studi di Sassari

provenienti dai campioni ASCOT/AIBIII/NBS, BRIGHT, EPIC-Torino, HYPEST e NORDIL/MDC che ha dato come risultato un overall OR di 1,34 per l'allele T (95% CI 1,25-1,44, $P_{\text{combined}} = 1,032 \cdot 10^{-14}$) (**tabella 6 e figura 7**) per un totale di 21714 soggetti.

Dal momento che le definizioni di caso e di controllo differivano tra i campioni di HYPERGENES e quelli di replica *in-silico*, gli ORs non sono direttamente confrontabili. Nel nostro studio, il p-value di eterogeneità calcolato per i campioni di HYPERGENES è 0,13. Esso è diminuito leggermente, ma è rimasto non significativo, come previsto, anche quando EPIC-Torino è stata considerata insieme nella meta-analisi ($p=0,092$), in quanto i criteri di reclutamento per i casi ei controlli erano identici.

Al contrario, l'eterogeneità è aumentata in modo significativo ($p=0.005$) quando i campioni di HYPERGENES sono stati meta-analizzati con tutti gli altri campioni (ASCOT/AIBIII/NBS, BRIGHT, HYPEST e NORDIL/MDC).

Per quanto riguarda l'interazione tra lo SNP di eNOS scoperto (rs3918226), i geni dell'actina (ACTA1, ACTA2, ACTB, ACTG1, ACTG2) e i geni dell'Heat Shock Protein-90 (HSP90: HSP90AA1, HSP90AA2, HSP90AB1), sono state osservate interazioni significative tra rs3918226 e rs13447427 ($p\text{-value} = 1.34 \cdot 10^{-3}$) nel gene actina- β (ACTB), rs7503750 ($p\text{-value} = 1.57 \cdot 10^{-3}$) in actina- γ 1 (ACTG1) e rs4922796 e rs17309979 ($p\text{-value} = 3.47 \cdot 10^{-3}$, $p\text{-value} = 4.88 \cdot 10^{-3}$) in HSP- α 2 (HSP90AA2) **tabella 7**.

L'analisi quantitativa ha confermato l'osservazione qualitativa. Infatti, il coefficiente β della regressione tra SBP o DBP con rs3918226 è rispettivamente di 1.91 (95% CI 0,16-3,66) e 1,40 (IC 95% 0,25-2,55) per allele T. Il coefficiente è l'ampiezza dell'effetto sulla pressione arteriosa in mmHg per allele codificato basato su un modello genetico additivo. La distribuzione della BP in accordo al genotipo di rs3918226 è mostrato nella **tabella 8**.

Dal momento che rs3918226 mappa nella regione del promotore di eNOS,

Maria Francesca Ortu, "Genome-wide 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", Tesi di dottorato in Fisiopatologia Medica, Università degli Studi di Sassari

abbiamo testato se esso possa cadere in un sito di legame di regolazione. Utilizzando l'algoritmo PATCH del database²¹ TRANSFAC abbiamo caratterizzato un presunto sito di legame per i fattori di trascrizione della famiglia-ETS direttamente accanto all' rs3918226. I membri della famiglia ETS sono presenti nelle cellule endoteliali e partecipato all'attivazione del promotore eNOS.³¹ Utilizzando lo strumento TFSEARCH²² abbiamo confermato questo risultato con uno score di 87,3.

Abbiamo anche testato il grado di conservazione evolutiva del locus rs3918226 nei primati e mammiferi placentati utilizzando il "conservation track" del UCSC Genome browser. La **figura 8** mostra che la regione nella quale si trova lo snp rs3918226 è conservato dai mammiferi placentati ai primati.

5. DISCUSSIONE

L'ipertensione essenziale (EH) è una condizione clinica complessa che rappresenta il principale fattore di rischio responsabile di complicanze renali e cardiovascolari. Il Progetto HYPERGENES ha esaminato le associazioni non ancora conosciute tra le varianti genetiche e l'EH portando avanti uno studio a due fasi attraverso il reclutamento di casi e controlli da coorti ampiamente caratterizzate arruolate in diverse regioni europee.

Abbiamo identificato un nuovo locus (rs3918226) di suscettibilità per l'ipertensione nella regione del promotore del gene (eNOS) responsabile della sintesi dell'ossido nitrico endoteliale (odds ratio 1.54; 95% CI 1.37-1.73; combinato $p=2.58 \cdot 10^{-13}$). Il risultato è stato confermato da una meta-analisi, eseguita utilizzando dati di genotipizzazione *in-silico/de novo* per un totale di 21714 soggetti, che ha dato come risultato un overall odds ratio di 1.34 (95% CI 1.25-1.44, $p=1,032 \cdot 10^{-14}$).

Abbiamo osservato eterogeneità nelle conclusioni della meta-analisi ($p=0,005$ per Q-test di eterogeneità) che potrebbe essere dovuto a due differenti dimensioni del campione e criteri di reclutamento non direttamente confrontabili tra HYPERGENES e i campioni di replica *in-silico* (**figura 7**).

L'effetto quantitativo dell'rs3918226 è stato stimato in continuo sui fenotipi BP, dando come risultato un coefficiente β di 1,91 per SBP e 1,40 per DBP, nonostante i bassi p-value della regressione probabilmente dovuta alla piccola dimensione del campione. Questa scoperta rafforza l'osservazione qualitativa sul fenotipo.

Abbiamo identificato un presunto sito di legame per i fattori di trascrizione della famiglia-ETS direttamente accanto all'rs3918226. I membri della famiglia ETS, come ETS-1 e ELF-1, sono fattori essenziali per l'attivazione del promotore di eNOS.³¹ Questo suggerisce che, influenzando l'affinità di legame al fattore di trascrizione, rs3918226 potrebbe modulare la trascrizione

Maria Francesca Ortu, "Genome-wide 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", Tesi di dottorato in Fisiopatologia Medica, Università degli Studi di Sassari

del gene eNOS.

E' anche interessante notare che la regione in cui si trova rs3918226 è conservata dai mammiferi placentati ai primati.

Proponiamo l'rs3918226 come un nuovo SNP di suscettibilità in quanto tra i GWASs finora pubblicati questo è il primo che conduca a eNOS: la novità nella scoperta dell' rs3918226 è che l'associazione tra eNOS e l'ipertensione è stata trovata nei Caucasicci utilizzando un approccio GWAS.

L'uso dell'array Illumina 1M e dell'Human CVD BeadArray è stato fondamentale nel rilevare l' associazione poiché rs3918226 non è presente su altri arrays in commercio.³² Oltre ad essere scarsamente coperta da altre piattaforme di genotipizzazione, la regione ha un tasso di ricombinazione relativamente alto verso la regione codificante (**Figura 4**). Questo ha portato un basso linkage disequilibrium (LD) con i marcatori presenti sulle vecchie piattaforme (ad esempio $RSQ\text{-}hat < 0,2$ per Affy500K piattaforma). Questi fatti hanno in gran parte limitato la possibilità di replicare i nostri risultati utilizzando dati provenienti da altri campioni GWAS, la maggior parte dei quali ricavati su vecchie piattaforme.

Infatti, eNOS è stato trovato poco associato incoerente a l' ipertensione in diversi studi di piccole dimensioni su geni candidati, molti dei quali solo focalizzati su poche varianti e con un numero relativamente ridotto di casi e controlli, rispetto ai campioni di grandi dimensioni del GWAS. Gli studi sono stati sostanzialmente positivi su coorti asiatiche^{33,34,35}, mentre la maggioranza sono risultati negativi in caucasicci, come riassunto in una recente meta-analisi.³⁶ I polimorfismi studiati nel nostro campione Caucasicco, G894T (rs1799983) e T-786C (rs2070744) non hanno raggiunto un genome-wide di associazione significativo con l'ipertensione. Se considerato con soglia del gene candidato, il p-value e la dimensione del campione del presente studio superano di gran lunga tutti gli altri finora pubblicati. L'rs1799983 era associato con l'EH con un valore $p = 2,63 \cdot 10^{-3}$ (OR = 1,038) e rs2070744, con

Maria Francesca Ortu, "Genome-wide 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", Tesi di dottorato in Fisiopatologia Medica, Università degli Studi di Sassari

un valore di $p = 6.42 \cdot 10^{-4}$ (OR = 1.04), come mostrato nella **tabella 9**. In sintesi, le ORs sono clinicamente irrilevanti. Vorremmo sottolineare il basso LD tra rs3918226 e rs1799983 ($R^2 = 0,16$) e rs2070744 ($R^2 = 0,17$) suggerendo che questi due SNP sono indipendenti dall' rs3918226 e non hanno alcun effetto aggiuntivo sul fenotipo.

Vi è una notevole prova biologica che collega eNOS con l'ipertensione e con il danno d'organo cardiovascolare ipertensione-associato.³⁷ eNOS, che catalizza la sintesi di ossido nitrico (NO) dall' endotelio vascolare, è responsabile della vasodilatazione che è fondamentale per la regolazione della pressione sanguigna. Inoltre, eNOS è un mediatore critico dell'omeostasi cardiovascolare attraverso la regolamentazione del diametro dei vasi sanguigni e del mantenimento di un ambiente anti-proliferativo e anti-apoptotico.

Poiché NO è altamente attivo, non può essere conservato all'interno delle cellule produttrici. Infatti, la capacità di segnalazione di eNOS deve essere controllata, almeno in parte, mediante la regolazione del suo targeting dall'apparato del Golgi alla membrana plasmatica, attraverso la sua compartimentalizzazione all'interno della membrana plasmatica e dalla sua successiva internalizzazione dalla membrana plasmatica al citoplasma. eNOS è una proteina di membrana doppiamente acilata che è bersagliata alle caveolae del plasma lemma endoteliale attraverso un' interazione con la proteina strutturale della caveolae Caveolina-1 (CAVI).^{26,27} L'inibizione CAV1 di eNOS è diminuita dalla Calmodulina (*calm*) che causa la dissociazione di eNOS dalla Caveolina.

Questo meccanismo di regolazione è ulteriormente alterato da Heat Shock Protein-90 (HSP90)²⁷, che si lega a eNOS e facilita lo spostamento di Cav1 da Calm. Inoltre, eNOS interagisce direttamente con l'actina del citoscheletro.²⁹ Recentemente, Kondrikov ha aggiunto che la beta-actina è associata con il dominio dell'ossigenasi eNOS incrementando l'attività di eNOS e la

Maria Francesca Ortu, "Genome-wide 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", Tesi di dottorato in Fisiopatologia Medica, Università degli Studi di Sassari

produzione di NO.³⁰ Per studiare questo percorso abbiamo testato l'interazione tra lo SNP di eNOS scoperto e i suoi più plausibili partner d'interazione. Abbiamo osservato interazioni nominalmente significative tra rs3918226 e rs13447427 in beta actina (ACTB), rs7503750 nell'actina gamma 1 (ACTG1) e rs4922796 e rs17309979 nel gene Heat Shock Protein-90 alfa-2 (HSP90AA2).

In conclusione, con un rigoroso disegno caso-controllo e uno studio basato sulla popolazione, abbiamo identificato un nuovo locus di suscettibilità per l'ipertensione nella regione del promotore di eNOS con un effect size di dimensioni relativamente elevate. La nostra scoperta potrebbe fornire una nuova visione del meccanismo di regolazione vascolare e potrebbe aiutare a comprendere meglio la genetica dell'EH. Inoltre, riteniamo che questa indicazione possa essere utile per ottimizzare i tentativi di fine-mapping e di sequenziamento per individuare varianti causali.

6. PROSPETTIVE

Ulteriori indagini e high-throughput sequencing della regione di interesse contribuirà a identificare la variante causale reale e a chiarire il ruolo funzionale di eNOS nell'ipertensione essenziale.

Il lavoro scientifico che riassume i dati sopra citati è stato pubblicato su *Hypertension*.

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.

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

Hypertension. 2012 Feb;59(2):248-55. Epub 2011 Dec 19.

PMID: 22184326 [PubMed – indexed for MEDLINE]

FIGURE E TABELLE

Maria Francesca Ortu, "Genome-wide 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", Tesi di dottorato in Fisiopatologia Medica, Università degli Studi di Sassari

	North Europe		Continental Italy		Sardinia	
Affection status	Hypertensives	Normotensives	Hypertensives	Normotensives	Hypertensives	Normotensives
number of individuals	563	343	574	736	728	671
per cent women (%)	46.91	53.09	22.3	41.7	32.83	33.08
age (yrs)	48.3 (8.6)	60.0 (5.0)	45.2 (8.8)	59.5 (6.1)	50.9 (12.4)	62.9 (12.0)
body mass index (kg/m ²)	27.9 (5.2)	26.1 (3.8)	26.4 (3.1)	24.6 (2.9)	27.5 (3.9)	26.0 (3.7)
SBP (mm Hg)	143.1 (16.9)	119.2 (9.9)	148.7 (8.9)	125.0 (7.0)	158.5 (14.5)	123.9 (9.8)
SBP after G BP Gen adjustment for treatment ¹ (mm Hg)	150.2 (14.4)	119.2 (9.9)	148.8 (8.9)	125.0 (7.0)	158.5 (14.5)	123.9 (9.8)
DBP (mm Hg)	89.8 (10.5)	74.0 (6.3)	96.4 (6.1)	79.5 (4.6)	102.1 (9.1)	77.1 (6.9)
DBP after G BP Gen adjustment for treatment ¹ (mm Hg)	94.6 (9.0)	74.0 (6.3)	96.5 (6.0)	79.5 (4.6)	102.1 (9.1)	77.1 (6.9)
per cent treated for hypertension (%)	46.71	0	1.05	0	0	0

Tabella 1. Descrizione demografica e clinica della popolazione di Discovery nelle tre macro-aree (Nord Europa, Italia Continentale e Sardegna) diviso tra casi e controlli. La tabella riporta i valori medi e, tra parentesi, le deviazioni standard.

¹ Tobin MD, et al. Adjusting for treatment effects in studies of quantitative traits: antihypertensive therapy and systolic blood pressure. *Stat. Med.* 24, 2911–2935 (2005).

	North Europe		Continental Italy		Sardinia	
affection status	Hypertensives	Normotensives	Hypertensives	Normotensives	Hypertensives	Normotensives
number of individuals	757	505	256	325	372	416
per cent women (%)	44.78	36.63	19.53	58.46	48.66	64.66
age (yrs)	46.66 (8.46)	62.89 (6.6)	43.06 (8.39)	62.92 (7.22)	50.18 (10.14)	60.59 (6.15)
body mass index (kg/m ²)	26.20 (4.19)	25.68 (3.75)	26.30 (3.22)	25.21 (3.47)	27.42 (4.31)	25.05 (4.46)
SBP (mm Hg)	153.38 (19.80)	119.77 (7.68)	149.78 (14.64)	121.81 (7.20)	158.96 (13.84)	123.49 (9.23)
SBP after G BP Gen adjustment for treatment ² (mm Hg)	162.22 (20.84)	119.77 (7.68)	152.25 (14.65)	121.81 (7.20)	158.96 (13.84)	123.49 (9.23)
DBP (mm Hg)	97.20 (12.36)	73.43 (7.15)	96.75 (9.99)	72.47 (6.04)	101.83 (7.96)	75.43 (7.2)
DBP after G BP Gen adjustment for treatment ² (mm Hg)	103.10 (12.35)	73.43 (7.15)	98.24 (9.28)	72.47 (6.04)	101.83 (7.96)	75.43 (7.2)
per cent treated for hypertension (%)	60.50	0	14.84	0	0	0

Tabella 2: Descrizione demografica e clinica della popolazione di Validation nelle tre macro-aree (Nord Europa, Italia Continentale e Sardegna) diviso tra casi e controlli. La tabella riporta i valori medi e, tra parentesi, le deviazioni standard.

² Tobin MD, et al. Adjusting for treatment effects in studies of quantitative traits: antihypertensive therapy and systolic blood pressure. *Stat. Med.* 24, 2911–2935 (2005).

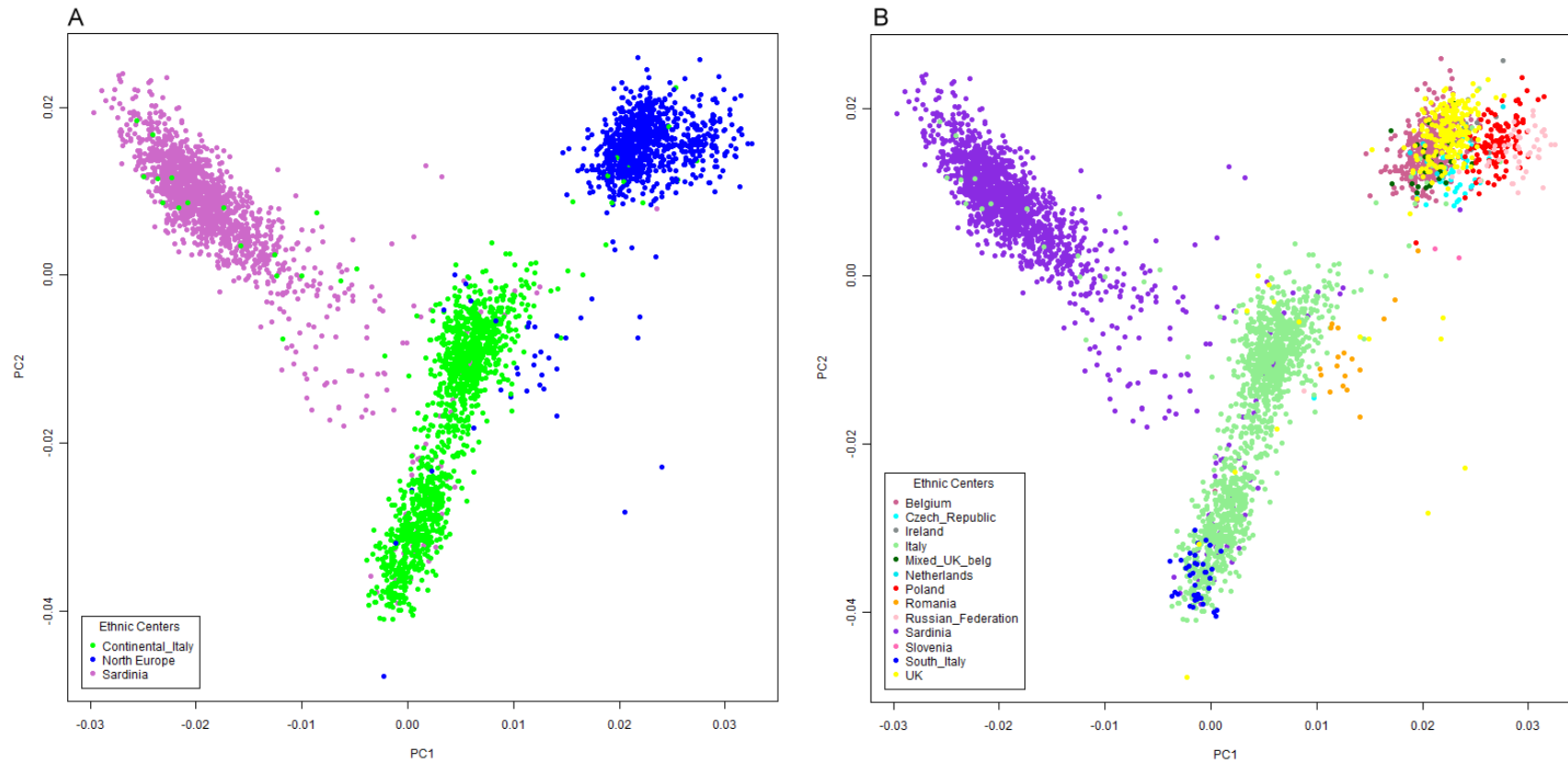


Figure 1. Principal component plot of Discovery sample.

2. Le popolazioni sono rappresentate come macro-gruppi: in blu il Nord Europa, in verde l'Italia Continentale e in viola la Sardegna.
- B: Le popolazioni sono contrassegnate secondo i centri di reclutamento.

Maria Francesca Ortu, "Genome-wide 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", Tesi di dottorato in Fisiopatologia Medica, Università degli Studi di Sassari

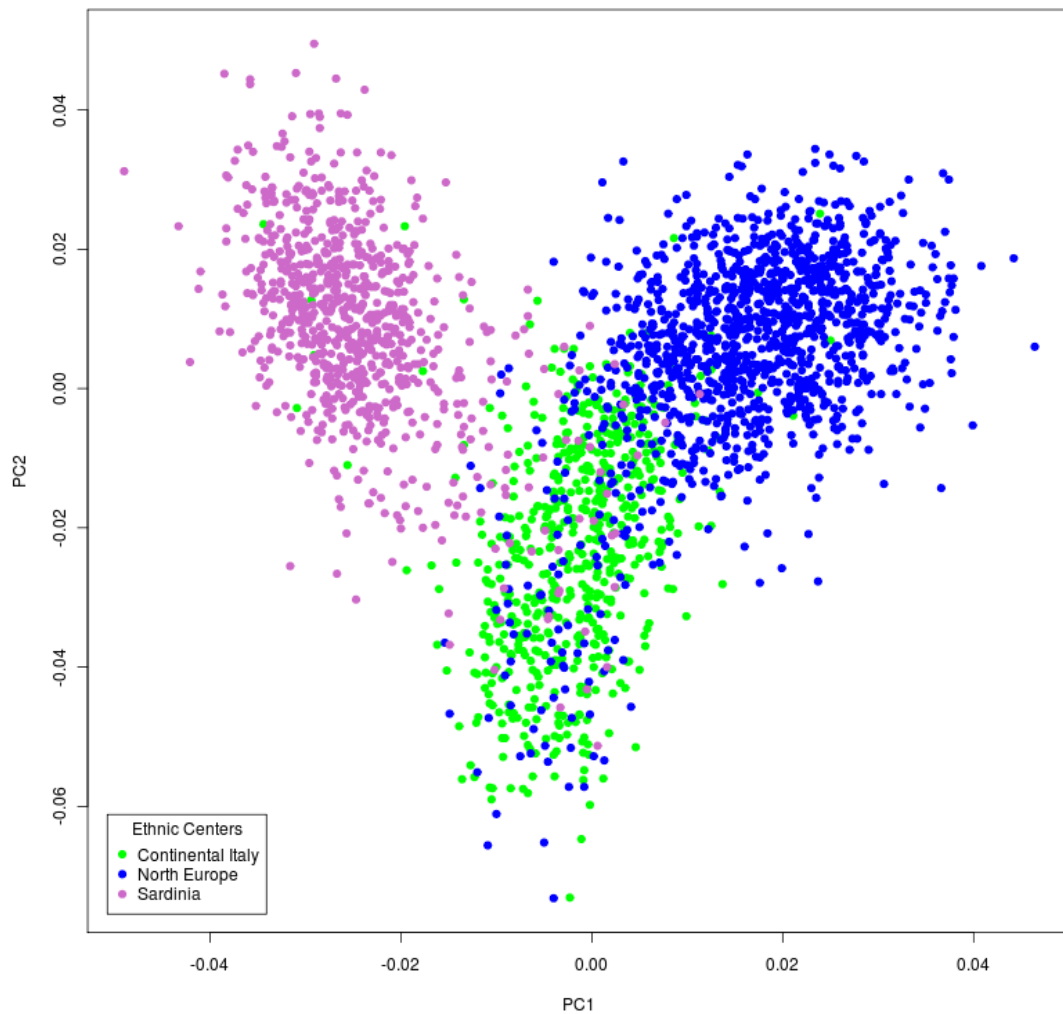


Figura 2. Principal component plot of Validation sample.

Le popolazioni sono rappresentate come macro-gruppi: in blu il Nord Europa, in verde l'Italia continentale e in viola la Sardegna.

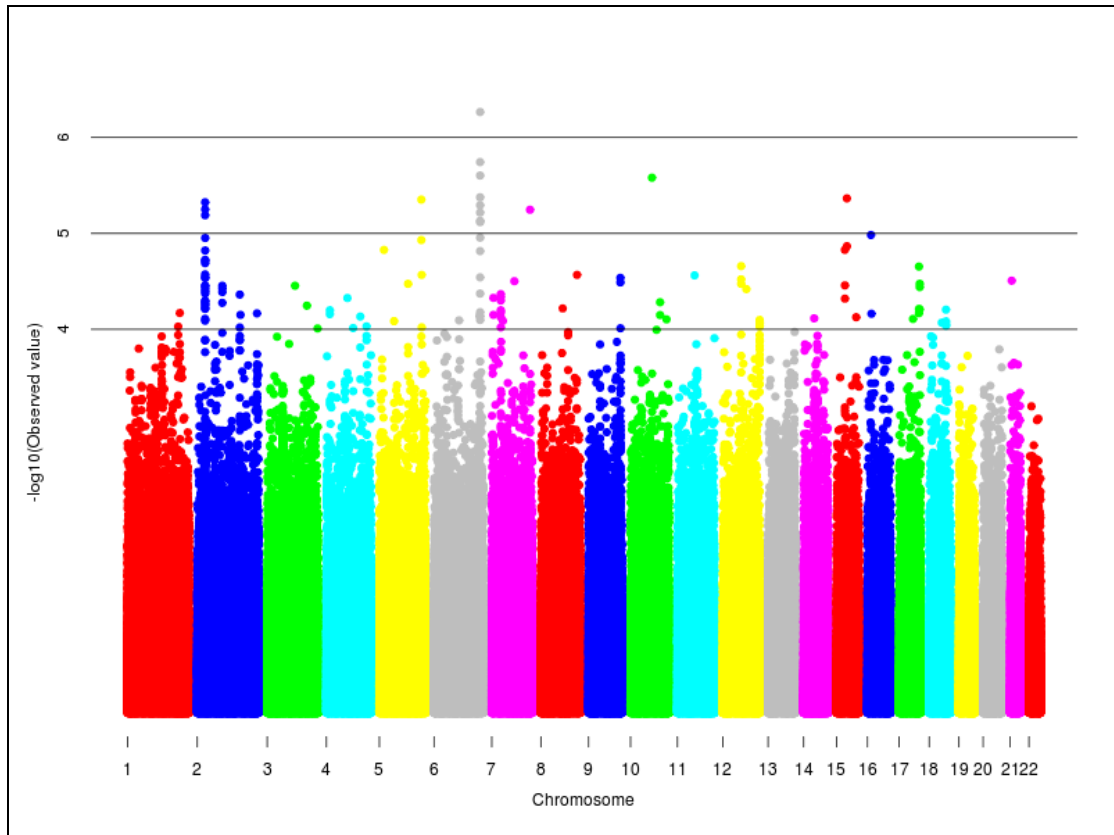


Figura 3. Manhattan plot di test statistico di regressione logistica del singolo SNP, aggiustato per sesso e PCs, nell'analisi GWA della Discovery. I risultati sono riportati come $-\log_{10}(\text{P-value})$ da posizione genomica

Genome wide association results for hypertension-associated SNPs with p-value adjusted for GC < 1e-04

SNP	CHR	Position (bp)	Location	Nearest gene	Coded Allele	Non coded Allele	MAF	OR	Lower limit, CI 95	Upper limit, CI 95	P	P duste for GC
rs783145	6	161072439	intronic	PLG	A	G	0.50	1.27	1.15	1.40	8.53E-07	1.41E-06
rs341408	15	58928982	intronic	RORA	A	G	0.38	1.27	1.15	1.40	1.74E-06	2.79E-06
rs7907270	10	78550949	intronic	KCNMA1	G	A	0.40	1.27	1.15	1.40	2.35E-06	3.73E-06
rs783182	6	1.61E+08	intronic	PLG	A	G	0.49	1.25	1.14	1.38	2.95E-06	4.64E-06
rs4976593	5	1.68E+08	intronic	WWC1	G	A	0.33	1.27	1.15	1.41	3.75E-06	5.84E-06
rs1406891	6	1.61E+08	intergenic	PLG	G	A	0.49	1.25	0.73	0.88	3.99E-06	6.20E-06
rs3918226	7	1.5E+08	intronic	NOS3	T	C	0.12	1.42	1.22	1.66	4.81E-06	7.42E-06
rs10519080	15	58925751	intronic	RORA	G	A	0.14	1.37	1.20	1.57	5.79E-06	8.87E-06
rs11686131	2	27362214	intronic	TRIM54	G	A	0.18	1.34	0.66	0.85	5.93E-06	9.08E-06
rs1084656	6	1.61E+08	intergenic	PLG	C	A	0.50	1.24	1.13	1.37	6.67E-06	1.02E-05
rs4665962	2	27368609	intronic	TRIM54	A	G	0.18	1.33	0.66	0.85	7.09E-06	1.08E-05
rs631208	16	9307225	intergenic	LOC653737	A	G	0.41	1.25	0.72	0.88	8.09E-06	1.22E-05
rs1975384	2	27395545	intronic	MPV17	G	A	0.18	1.33	0.66	0.85	8.15E-06	1.23E-05
rs1247558	6	1.61E+08	intergenic	PLG	G	A	0.50	1.24	1.13	1.36	8.30E-06	1.26E-05
rs783165	6	1.61E+08	intergenic	PLG	C	A	0.50	1.24	1.13	1.36	9.73E-06	1.46E-05
rs1621801	6	1.61E+08	intergenic	PLG	C	A	0.49	1.24	0.73	0.89	1.10E-05	1.64E-05
GA006079	6	1.61E+08	intergenic	PLG	C	G	0.50	1.24	1.13	1.36	1.12E-05	1.67E-05
rs6555802	5	1.68E+08	intronic	WWC1	A	C	0.34	1.25	1.13	1.38	1.13E-05	1.69E-05
rs1992291	2	27357816	intergenic	DNAJC5G	A	G	0.20	1.31	0.68	0.86	1.38E-05	2.04E-05
rs2366947	2	85941520	intronic	ST3GAL5	A	G	0.34	1.25	0.73	0.89	1.54E-05	2.27E-05
rs2565721	6	1.61E+08	intergenic	PLG	G	A	0.48	1.23	0.74	0.89	1.71E-05	2.51E-05
rs6721125	2	85958240	intronic	ST3GAL5	G	A	0.35	1.25	0.73	0.89	1.71E-05	2.52E-05
rs6753350	2	85959009	intronic	ST3GAL5	A	G	0.35	1.25	0.73	0.89	1.78E-05	2.61E-05
rs895314	5	13900984	intronic	DNAH5	G	A	0.17	1.32	0.67	0.86	1.83E-05	2.69E-05
rs1511789	15	52442052	intronic	UNC13C	A	G	0.29	1.26	1.13	1.40	1.88E-05	2.76E-05
rs11787445	8	1.35E+08	intergenic	LOC729395	A	G	0.24	1.28	1.14	1.43	1.89E-05	2.77E-05
rs2023843	7	27209746	intergenic	HOXA13	A	G	0.06	1.58	0.51	0.78	2.01E-05	2.94E-05
rs4665960	2	27321102	intergenic	CAD	G	A	0.22	1.29	0.69	0.87	2.03E-05	2.97E-05
rs2930120	12	66600079	intergenic	LOC341333	A	G	0.25	1.27	1.14	1.41	2.03E-05	2.97E-05
rs7733887	5	1.69E+08	intergenic	SLIT3	G	A	0.10	1.42	1.21	1.68	2.13E-05	3.10E-05
rs929250	7	27211626	intergenic	HOXA13	A	C	0.06	1.58	0.51	0.78	2.13E-05	3.11E-05
rs1561535	2	27324529	intergenic	CAD	G	A	0.28	1.26	0.71	0.88	2.18E-05	3.18E-05
rs1122227	2	27397789	intronic	MPV17	G	A	0.18	1.31	0.67	0.86	2.32E-05	3.37E-05
rs783156	6	1.61E+08	intergenic	PLG	G	A	0.49	1.23	0.74	0.90	2.37E-05	3.44E-05
rs7209417	17	72877103	intronic	SEPT9	G	A	0.37	1.24	0.73	0.89	2.42E-05	3.51E-05
rs4553826	2	85948712	intronic	ST3GAL5	G	A	0.35	1.24	0.73	0.89	2.44E-05	3.54E-05
rs2580761	2	27279866	intronic	SLC5A6	G	A	0.22	1.29	0.69	0.87	2.60E-05	3.76E-05
rs2908764	12	66598283	intergenic	LOC341333	A	G	0.25	1.26	1.13	1.40	2.79E-05	4.03E-05
rs4962095	9	1.35E+08	intronic	GBGT1	C	A	0.47	1.23	1.12	1.35	2.89E-05	4.16E-05
rs2073927	9	1.35E+08	intronic	GBGT1	A	G	0.47	1.23	1.12	1.35	2.90E-05	4.18E-05

Maria Francesca Ortu, "Genome-wide 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", Tesi di dottorato in Fisiopatologia Medica, Università degli Studi di Sassari

Genome wide association results for hypertension-associated SNPs with p-value adjusted for GC < 1e-04

SNP	CHR	Position (bp)	Location	Nearest gene	Coded Allele	Non coded Allele	MAF	OR	Lower limit, CI 95	Upper limit, CI 95	P	P duste for GC
rs501630	11	65393849	intronic	EFEMP2	A	G	0.43	1.23	1.12	1.35	2.93E-05	4.22E-05
rs2160243	12	66602263	intergenic	LOC341333	G	A	0.25	1.26	1.13	1.40	3.00E-05	4.31E-05
rs4722675	7	27210487	intergenic	HOXA13	G	A	0.06	1.56	0.52	0.79	3.20E-05	4.59E-05
rs9653564	2	27326122	intergenic	SLC30A3	G	A	0.23	1.27	0.70	0.88	3.26E-05	4.67E-05
rs7276718	21	19329160	intergenic	PPIAL3	G	A	0.45	1.23	1.11	1.35	3.36E-05	4.82E-05
rs13404446	2	27372758	intronic	TRIM54	G	A	0.24	1.27	0.70	0.88	3.39E-05	4.86E-05
rs3735533	7	27212418	intergenic	HOXA13	G	A	0.06	1.56	0.52	0.79	3.49E-05	5.00E-05
rs7658173	4	89401542	intergenic	PPM1K	A	G	0.37	1.23	1.12	1.36	3.54E-05	5.06E-05
rs7808249	7	86821651	intronic	CROT	A	G	0.26	1.26	1.13	1.40	3.68E-05	5.25E-05
rs11126918	2	27292214	intronic	C2orf28	G	A	0.22	1.28	0.70	0.88	3.70E-05	5.28E-05
rs7223756	17	74794846	intronic	HRNBP3	G	A	0.47	1.22	1.11	1.35	3.89E-05	5.54E-05
rs1659685	2	27274194	intergenic	SLC5A6	A	G	0.29	1.25	0.72	0.89	4.08E-05	5.80E-05
rs1563447	17	74805025	intronic	HRNBP3	G	A	0.30	1.24	0.73	0.89	4.13E-05	5.88E-05
rs4665376	2	27362536	intronic	TRIM54	A	G	0.24	1.26	0.71	0.88	4.15E-05	5.90E-05
rs1640235	7	5609157	intronic	FSCN1	A	G	0.09	1.44	1.21	1.71	4.19E-05	5.96E-05
rs6880706	5	1.18E+08	intergenic	DTWD2	G	A	0.47	1.22	1.11	1.35	4.31E-05	6.12E-05
rs13404327	2	27372657	intronic	TRIM54	C	A	0.24	1.26	0.71	0.89	4.43E-05	6.28E-05
rs563881	15	52449942	intronic	UNC13C	A	G	0.29	1.25	1.12	1.38	4.52E-05	6.40E-05
rs4665963	2	27382196	intronic	TRIM54	A	G	0.25	1.26	0.71	0.89	4.73E-05	6.69E-05
rs10858918	12	88620476	intergenic	LOC338758	G	A	0.37	1.23	0.73	0.90	4.74E-05	6.71E-05
rs7575245	2	27380825	intronic	TRIM54	G	A	0.24	1.26	0.71	0.89	4.75E-05	6.72E-05
rs10264581	7	27221942	intergenic	HOXA13	A	G	0.04	1.65	0.48	0.77	4.85E-05	6.86E-05
rs4789997	17	74799181	intronic	HRNBP3	A	G	0.34	1.23	0.74	0.90	4.87E-05	6.88E-05
rs9849845	3	1.09E+08	intergenic	BBX	A	C	0.49	1.22	0.75	0.90	4.92E-05	6.94E-05
rs813641	6	1.61E+08	intronic	PLG	A	G	0.15	1.32	1.15	1.51	5.05E-05	7.13E-05
rs1533605	2	85945764	intronic	ST3GAL5	A	G	0.35	1.23	0.73	0.90	5.16E-05	7.28E-05
rs1517331	2	1.69E+08	intronic	STK39	G	A	0.13	1.35	1.17	1.55	5.36E-05	7.55E-05
rs7751252	6	79019345	intergenic	IRAK1BP1	G	A	0.08	1.44	1.21	1.72	5.49E-05	7.73E-05
rs4665965	2	27389884	intronic	MPV17	A	G	0.24	1.26	0.71	0.89	5.68E-05	7.98E-05
rs9888336	12	1.32E+08	5UTR	ZNF26	A	G	0.03	1.82	1.36	2.44	6.03E-05	8.45E-05
rs1993643	10	1.07E+08	intergenic	SORCS3	A	G	0.31	1.24	1.12	1.37	6.14E-05	8.60E-05
rs3769143	2	27304228	intronic	CAD	G	A	0.29	1.24	0.72	0.90	6.20E-05	8.68E-05
rs529565	9	1.35E+08	intronic	ABO	A	G	0.32	1.23	0.73	0.90	6.25E-05	8.75E-05
rs1401283	2	1.71E+08	intronic	MYO3B	G	A	0.38	1.23	0.74	0.90	6.26E-05	8.76E-05
rs1275522	2	27280382	intronic	SLC5A6	A	G	0.29	1.24	0.72	0.90	6.33E-05	8.85E-05
rs11996335	8	77536681	intergenic	ZFHX4	G	A	0.49	1.22	1.10	1.34	6.33E-05	8.86E-05
rs2847579	18	46616662	intergenic	MRO	C	A	0.41	1.22	1.11	1.34	6.34E-05	8.87E-05
rs7221079	17	72856622	intronic	SEPT9	A	G	0.35	1.23	0.73	0.90	6.48E-05	9.06E-05
rs13241373	7	5789747	intergenic	RNF216	A	G	0.10	1.40	1.19	1.66	6.58E-05	9.19E-05
rs608270	12	1.32E+08	intronic	ZNF84	A	G	0.03	1.84	1.36	2.49	6.62E-05	9.25E-05

Maria Francesca Ortu, "Genome-wide 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", Tesi di dottorato in Fisiopatologia Medica, Università degli Studi di Sassari

Genome wide association results for hypertension-associated SNPs with p-value adjusted for GC < 1e-04

SNP	CHR	Position (bp)	Location	Nearest gene	Coded Allele	Non coded Allele	MAF	OR	Lower limit, CI 95	Upper limit, CI 95	P	P duste for GC
rs601679	12	1.32E+08	3UTR	ZNF84	A	G	0.03	1.84	1.36	2.49	6.62E-05	9.25E-05
rs11655079	17	72860270	intronic	SEPT9	G	A	0.35	1.23	0.74	0.90	6.65E-05	9.29E-05
rs7794193	7	27261226	intergenic	EVX1	G	A	0.04	1.66	0.47	0.77	6.71E-05	9.37E-05
rs4680062	3	1.55E+08	intergenic	LOC152118	A	G	0.14	1.33	1.16	1.53	6.72E-05	9.38E-05
rs11147244	12	1.32E+08	intergenic	ZNF10	G	A	0.03	1.85	1.37	2.51	6.83E-05	9.53E-05
rs1275501	2	27272786	intergenic	SLC5A6	C	A	0.29	1.24	0.72	0.90	6.92E-05	9.65E-05
rs4722670	7	27196074	intergenic	HOXA11S	A	G	0.08	1.44	0.58	0.83	6.93E-05	9.67E-05
rs11608	2	27288878	5UTR	C2orf28	A	G	0.29	1.24	0.73	0.90	7.01E-05	9.77E-05
rs573740	15	52470723	intronic	UNC13C	A	G	0.30	1.24	1.11	1.37	7.10E-05	9.90E-05
rs623100	12	1.32E+08	coding	ZNF84	A	C	0.03	1.84	1.36	2.48	7.12E-05	9.92E-05

Tabella 3: Lista dei Best Discovery results (p-value aggiustato per Genomic Control 10^{-4}) Per recuperare informazioni sugli SNPs e il loro contesto genomico (il gene più vicino) è stato utilizzato il hg18 (NCBI 36) assembly.

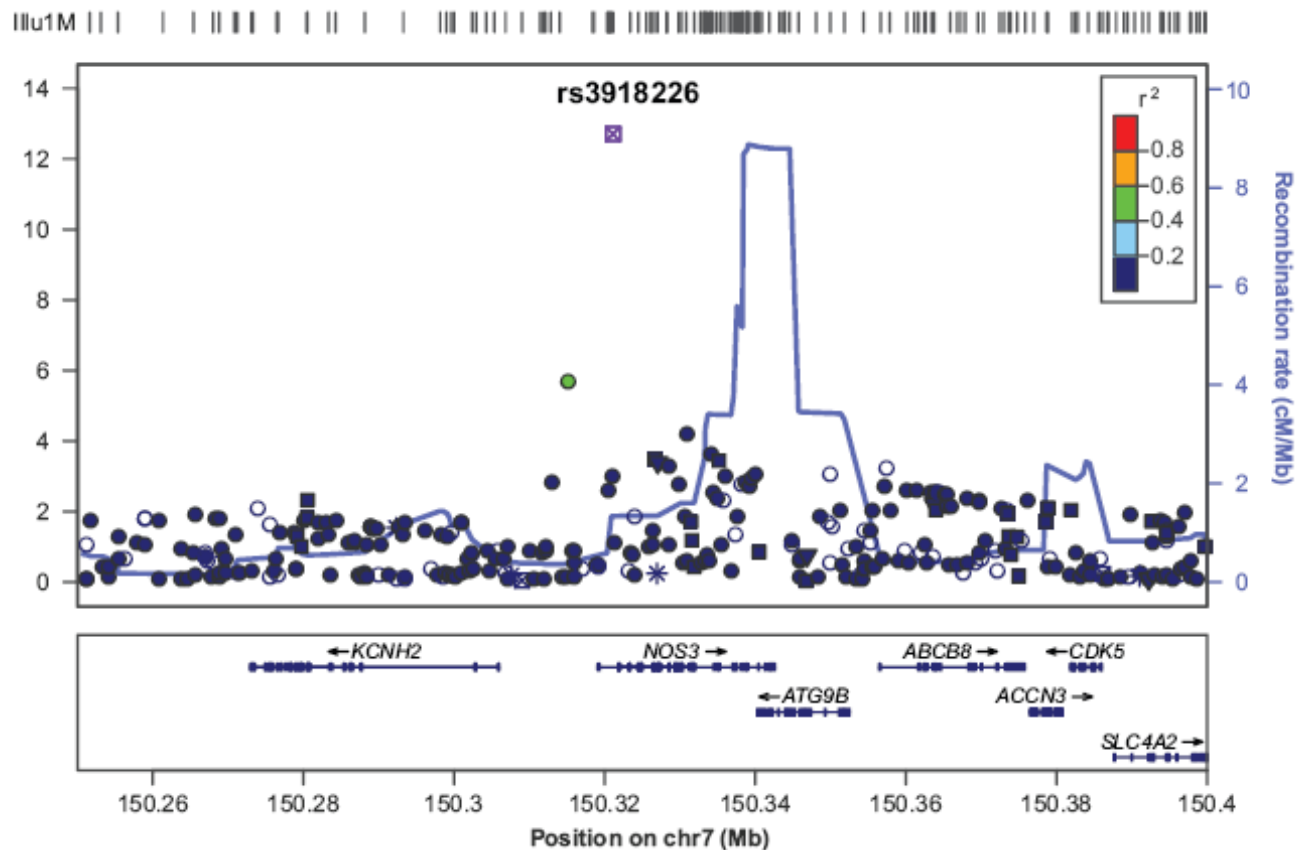


Figura 4. Local Manhattan plot for the NOS3 region. Ogni cerchio rappresenta uno SNP, la sua coordinata y è il $-\log_{10}$ del P-value dell'associazione per l'ipertensione, la coordinata x rappresenta la posizione fisica sul cromosoma (sulla build 36). Quando i dati di replica erano disponibili abbiamo fornito il P- value combinato, in caso contrario il P- value della discovery. I Cerchi sono colorati con diverse sfumature di rosso a seconda del LD (r^2) tra lo SNP dato ed il lead SNP (rs3918226, cerchio verde). La linea blu indica il tasso di ricombinazione. Il secondo migliore P-value di $2.46E-6$ (in posizione 150.314.954) è stato trovato per imputazione in base al 1000 Genomes haplotypes (versione giugno 2010), la sua qualità imputazione è stata molto alta ($r^2\text{-hat} = 0.94$).

Maria Francesca Ortu, "Genome-wide 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", Tesi di dottorato in Fisiopatologia Medica, Università degli Studi di Sassari

Marker Name	Chr	Position	Effect allele	Other allele	Gene	OR (Discovery)	P (Discovery)	OR (Validation)	P (Validation)	OR (combined)	CI (combined)	Inverse variance weighted P (combined)	Z-score P (combined)
rs3918226	7	150321109	T	C	NOS3	1.425	4.81E-06	0.585	2.55E-09	1.538	[1.372-1.726]	1.98E-13	2.58E-13
rs341408	15	58928982	G	A	RORA	0.786	1.74E-06	0.956	4.29E-01	0.856	[0.7949-0.9219]	3.98E-05	2.79E-05
rs4976593	5	167710021	G	A	WWC1	1.270	3.75E-06	1.045	4.60E-01	1.169	[1.0826-1.2622]	6.64E-05	5.29E-05
rs631208	16	9307225	G	A	RP11-47311.1	0.798	8.09E-06	0.951	3.84E-01	0.862	[0.8001-0.9284]	8.89E-05	6.36E-05
rs7907270	10	78550949	G	A	KCNMA1	1.270	2.35E-06	0.989	8.53E-01	1.141	[1.0585-1.2301]	5.75E-04	4.25E-04
rs10519080	15	58925751	G	A	RORA	1.369	5.79E-06	0.979	7.95E-01	1.187	[1.0710-1.3158]	1.09E-03	8.49E-04
rs1406891	6	161107070	G	A	PLG	1.251	3.99E-06	0.949	3.50E-01	1.112	[1.0348-1.1953]	3.87E-03	2.97E-03
rs783182	6	161088538	G	A	PLG	0.797	2.95E-06	1.068	2.42E-01	0.902	[0.8395-0.9700]	5.31E-03	4.15E-03
rs1084656	6	161101282	C	A	PLG	1.243	6.67E-06	0.936	2.39E-01	1.103	[1.0264-1.1859]	7.66E-03	6.35E-03
rs783145	6	161072439	G	A	PLG	0.788	8.53E-07	1.102	8.45E-02	0.909	[0.8459-0.9767]	9.27E-03	6.85E-03
rs1247558	6	161110189	G	A	PLG	1.240	8.30E-06	0.932	2.14E-01	1.100	[1.0237-1.1827]	9.42E-03	7.93E-03

Tabella 4. Risultati della Meta-analysis per i top SNPS nello studio Hypergenes. La tabella mostra i risultati di associazione (OR e p-values) della Discovery, della Validation e dell'analisi combinata (sia inverse variance weighting sia Z-score meta-analysis). I P values e gli Ors con il relativo IC 95% associato sono stati calcolati con un modello additivo utilizzando la regressione logistica aggiustata per sesso e PCs. Per recuperare informazioni sugli SNPs e il loro contesto genomico (il gene più vicino) è stato utilizzato il hg18 (NCBI 36) assembly.

Maria Francesca Ortu, "Genome-wide 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", Tesi di dottorato in Fisiopatologia Medica, Università degli Studi di Sassari

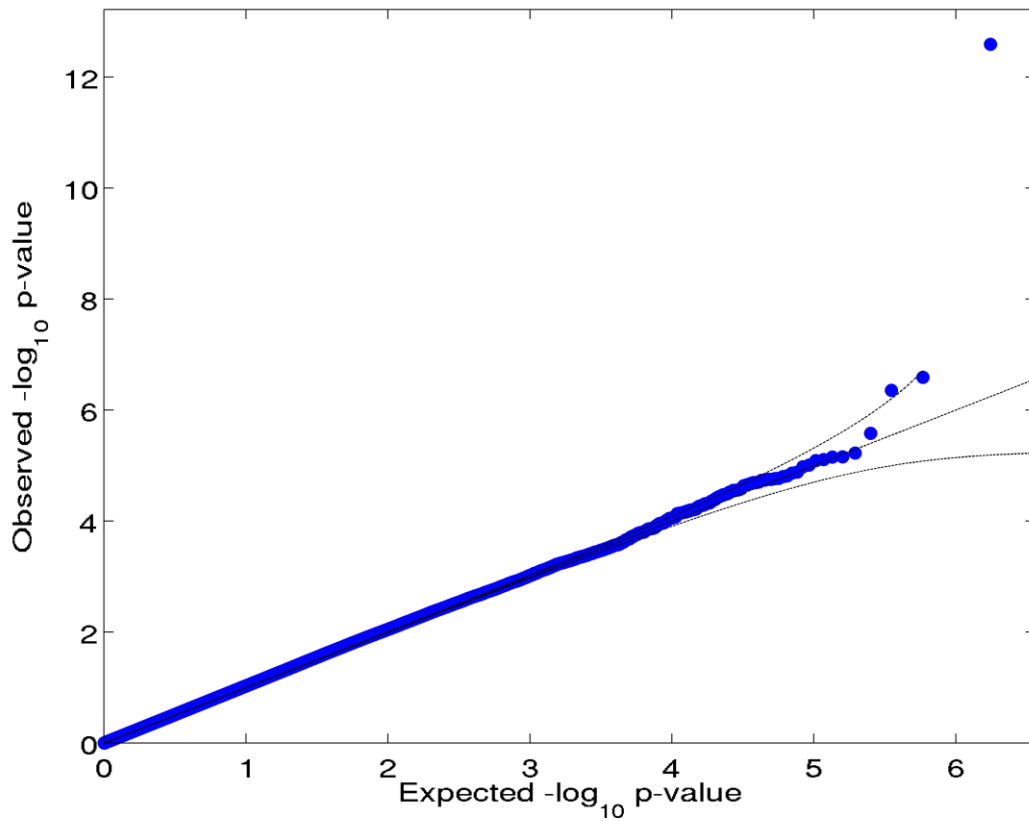


Figura 5: Q-Q plot dell'analisi combinata

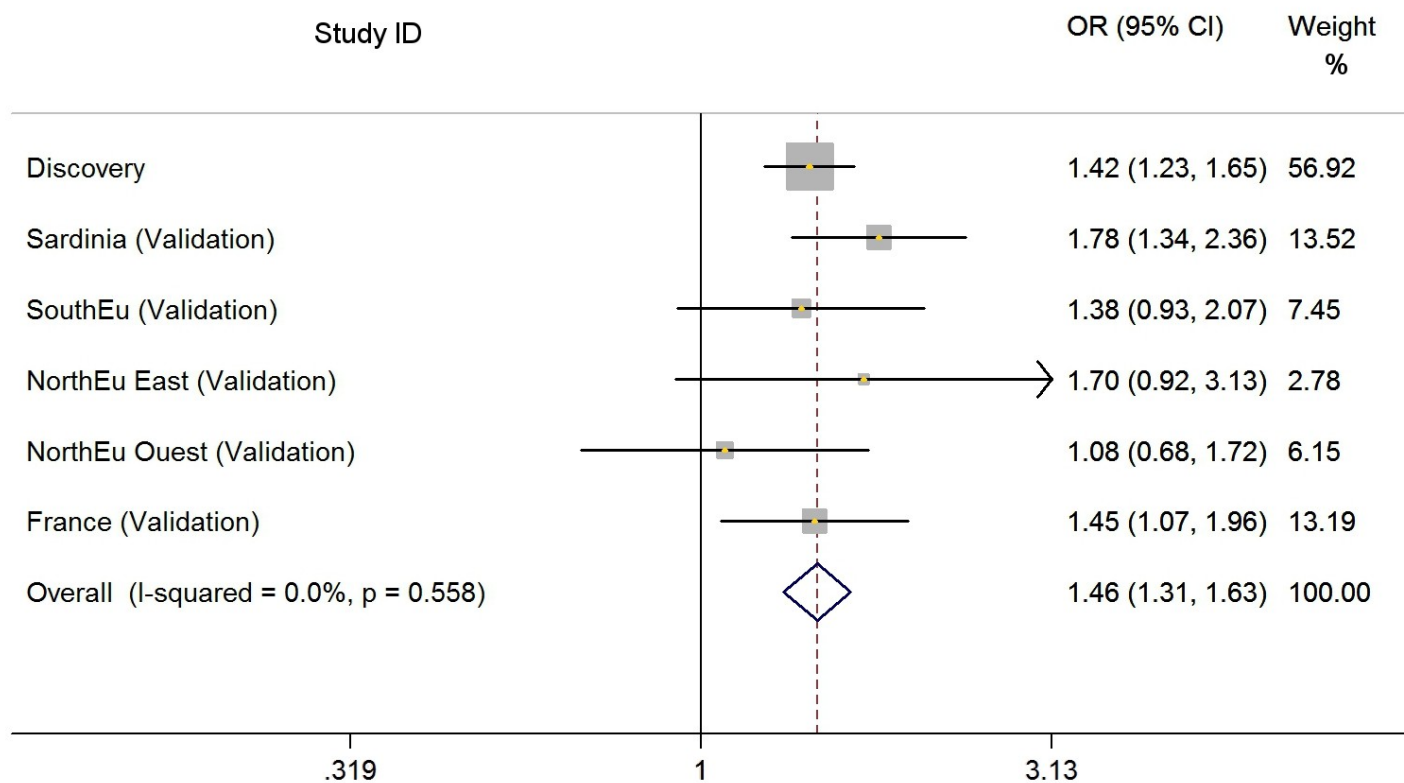


Figura 6: Forest plot della meta-analisi tra i campioni della Discovery e i sub-campioni della Validation. Il campione della Validation è diviso in Sardegna, Italia Continentale, EPOGH, coorte Progress with Victorian Family Heart Study e sottogruppi Francesi. I quadrati e le linee orizzontali corrispondono agli OR e IC 95%, e il diamante rappresenta l' OR e il CI 95% combinato. Il test di eterogeneità è stato applicato (I-squared e p-value).

Maria Francesca Ortu, "Genome-wide 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", Tesi di dottorato in Fisiopatologia Medica, Università degli Studi di Sassari

SNP	Alleles (coded/other)	CHR	GENE	LOCATION	DISTANCE TO GENE	STUDY (SAMPLE)	OR	P VALUE	OR HYPERGENES	P HYPERGENES	OR COMBINED	P COMBINED
rs2681472	A/G	12	ATP2B1	Intronic	-1620	Levy et Al (CHARGE)	1.17	1.65E-08	1.14	4.00E-02	1.16	1.89E-09
rs11105354	G/A	12	ATP2B1	Intronic	-2032	Levy et Al (CHARGE)	0.85	1.80E-08	0.88	3.79E-02	0.86	1.97E-09
rs2681492	G/A	12	ATP2B1	Intronic	-687	Levy et Al (CHARGE)	0.87	8.40E-08	0.88	4.04E-02	0.87	9.76E-09
rs11105328	G/A	12	WDR51B	intergenic	-22613	Levy et Al (CHARGE)	0.86	7.10E-07	0.90	8.74E-02	0.87	1.56E-07
rs653178	A/G	12	ATXN2	Intronic	-14033	Newton-Cheh et Al (Global Bpgen)	0.93	7.00E-07	0.87	2.81E-03	0.93	1.69E-08
rs17367504	A/G	1	MTHFR	Intronic	-160	Newton-Cheh et Al (Global Bpgen)	0.89	2.00E-09	0.89	1.39E-01	0.89	7.19E-10
rs1378942	C/A	15	CSK	intronic	-2306	Newton-Cheh et Al (Global Bpgen)	1.1	2.00E-14	1.03	5.60E-01	1.06	8.80E-14
rs13333226	G/A	16	UROMOD	intergenic	-1617	Padmanabhan et Al	0.85	1.50E-13	0.84	8.72E-03	0.85	4.88E-15

Tabella 5: meta-analisi dei top SNPs precedentemente pubblicati in letteratura come associati con l'ipertensione in studi di associazione Genome-wide e risultati HYPERGENES.

Maria Francesca Ortu, "Genome-wide 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", Tesi di dottorato in Fisiopatologia Medica, Università degli Studi di Sassari

	Study	Sample Size	OR	SE	95% CI	P-value
Hypergenes Samples	HYPERGENES_DISCOVERY	3596	1.43	0.11	1.224-1.657	4.81E-06
	HYPERGENES_VALIDATION	2610	1.71	0.155	1.440-2.049	2.55E-09
	Combined Analysis HYPERGENES	6206	1.54	0.038	1.372-1.726	2.58E-13
Replication Samples	ASCOT_AIBIII_NBS	4049	1.06	0.092	0.895-1.256	4.97E-01
	BRIGHT	3641	1.39	0.126	1.168-1.663	2.32E-04
	EPIC Turin	2714	1.28	0.126	1.050-1.551	1.44E-02
	HYPEST	1204	1.13	0.236	0.754-1.705	5.45E-01
	NORDIL_MDC	3900	1.25	0.124	1.030-1.519	2.40E-02
	Combined Analysis of Replication Samples	15508	1.23	0.056	1.125-1.344	6.50E-06

	Sample Size	OR (combined)	95% CI (combined)	Combined P (Z-score)	Combined P (Inverse variance weighted)
META-ANALYSIS	21714	1.34	1.248-1.437	1.032E-14	6.198E-16

Tabella 6. Risultati della meta-analysis *In silico* per l' rs3918226 (T/C, effect allele/other allele). Sopra: I risultati dell'associazione (odds ratio, errori standard, intervalli di confidenza e p-values) per Discovery, Validation e analisi combinata dei campioni HYPERGENES. **Al centro:** I risultati per studi ASCOT / AIBIII / NBS, BRIGHT, Epic Turin, HYPEST e NORDIL / MDC e l'analisi combinata di replicazione dei campioni *in silico*. **Sotto:** Risultati della Meta-analisi per tutti i campioni utilizzando i metodi sia z-score sia inverse variance weighted p-value.

Maria Francesca Ortu, "Genome-wide 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", Tesi di dottorato in Fisiopatologia Medica, Università degli Studi di Sassari

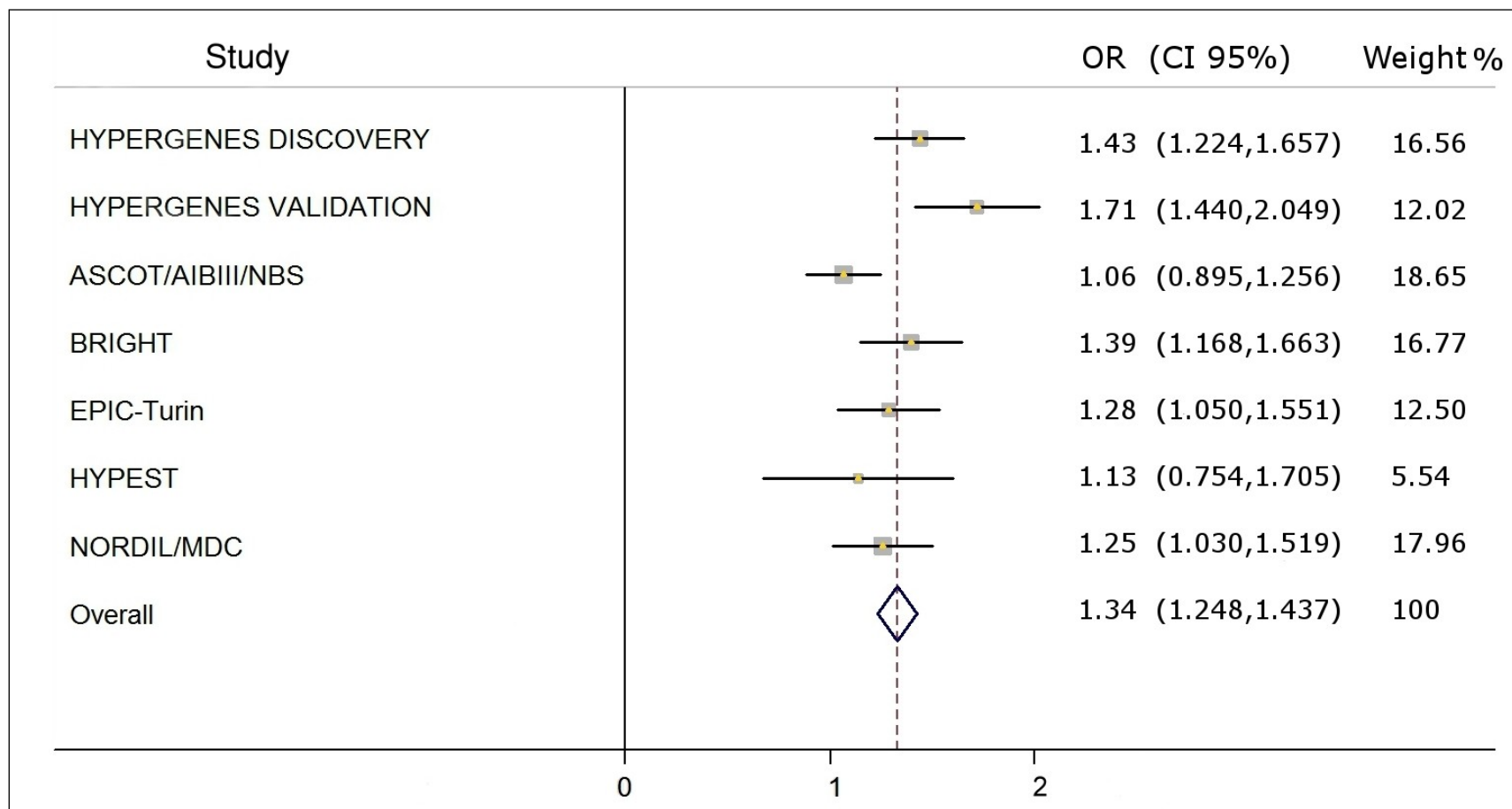


Figura 7. Forest plot della meta-analysis tra Discovery Hypergenes, Validation Hypergenes, e studi ASCOT/AIBIII/NBS, BRIGHT, EPIC Turin, HYPEST e NORDIL/MDC.

Maria Francesca Ortu, "Genome-wide 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", Tesi di dottorato in Fisiopatologia Medica, Università degli Studi di Sassari

rsSNP1-allele	Gene1	rsSNP2-allele	Gene2	Interaction effect size	Interaction p-value (20% FDR)
rs13447427-G	ACTB	rs3918226-T	NOS3	0.47	1.34E-03
rs7503750-G	ACTG1	rs3918226-T	NOS3	-0.42	1.57E-03
rs4922796-G	HSP90AA2	rs3918226-T	NOS3	-0.36	3.47E-03
rs17309979-G	HSP90AA2	rs3918226-T	NOS3	0.35	4.88E-03

Tabella 7: Analisi dell'Interazione di *ACTB* (Beta Actina), *ACTG1* (Gamma 1 Actina) e *HSP90AA2* (heat shock protein 90kDa alpha (citosolica) con eNOS. Gli Interacting alleles, effects size e P-values sono riportati. Gli SNPs mostrati sono stati selezionati , controllando il False discovery Rate al 20%.

A.

SBP			
rs3918226	Mean	Std. Dev.	Freq.
GG	125.4	16.2	1523
GT	126.7	16.7	276
TT	131.9	19.2	21
Total	125.7	16.4	1820

B.

DBP			
rs3918226	Mean	Std. Dev.	Freq.
GG	78.7	10.6	1523
GT	79.6	10.7	276
TT	85.3	12.6	21
Total	78.9	10.7	1820

Tabella 8: Distribuzione della BP secondo il genotipo rs3918226. La tabella riporta i valori medi, le deviazioni standard e le frequenze di SBP (A) e DBP (B) per ciascun genotipo. Nell'analisi di regressione lineare, aggiustata sesso, BMI, età e età², abbiamo ottenuto un coefficiente β di 1,91 (IC 95% 0,16-3,66, p-value = 0,032) per SBP (A) e di 1,40 (95% CI 0,25 -2,55, p-value = 0,017) per il DBP (B), rispettivamente

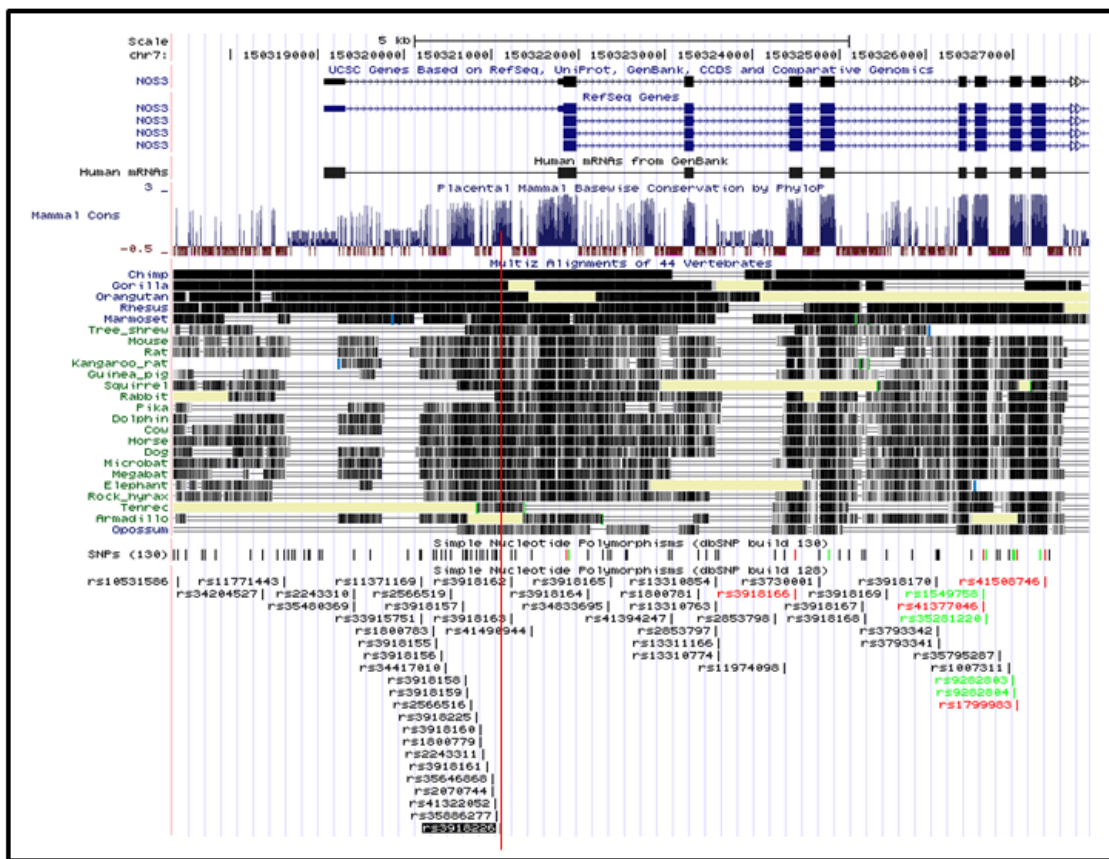


Figura 8: Conservazione della regione di eNOS3. Misura di conservazione evolutiva nei primati e nei mammiferi placentati utilizzando il conservation track dell' UCSC genome browser. La linea rossa rappresenta la posizione del rs3918226. I rettangoli neri sotto indicano che il locus è conservato nelle diverse specie.

Maria Francesca Ortu, "Genome-wide 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", Tesi di dottorato in Fisiopatologia Medica, Università degli Studi di Sassari

Marker Name	Alleles	OR (Discovery)	P (Discovery)	OR (Validation)	P (Validation)	OR (Combined)	IC (Combined)	Inverse Variance weighted P (Combined)	Z-score P(Combined)
rs2070744	C/T	1.088	9.40E-02	1.162	7.51E-03	1.04	1.038-1.041	6.88E-04	6.42E-04
rs3918226	T/C	1.425	4.81E-06	1.71	2.55E-09	1.538	1.372-1.726	1.98E-13	2.58E-13
rs1799983	T/G	1.202	4.08E-04	1.068	2.66E-01	1.038	1.034-1.043	2.40E-03	2.63E-03

Tabella 9. Risultati della Meta-analisi per i polimorfismi di eNOS: rs2070744 (T-786C, 150321012 bp), rs3918226 (T-665C, 150321109bp) e rs1799983 (G894T, 150327044 bp). Gli SNPs sono classificati in base alla posizione (BP). Rs2070744 ha una frequenza dell'allele minore (MAF) di 0,47 nella Discovery e di 0,45 nella Validation, rs3918226 ha un MAF di 0,12 sia nella Discovery che nella Validation e rs1799983 di 0,41 nella Discovery e di 0,40 nella Validation. La tabella mostra i risultati dell'associazione (OR e p-value) per i campioni della Discovery (n = 3615), della Validation (n = 2610), e per l'analisi combinata (sia inverse variance weighting sia Z-score meta-analysis). I P-values e gli Ors con il relativo IC 95% sono stati calcolati con un modello additivo utilizzando una regressione logistica aggiustata per sesso e PCs. Per recuperare informazioni sugli SNPs e il loro contesto genomico (il gene più vicino) è stato utilizzato il hg18 (NCBI 36) assembly.

Maria Francesca Ortu, "Genome-wide 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", Tesi di dottorato in Fisiopatologia Medica, Università degli Studi di Sassari

BIBLIOGRAFIA

1. Kearney PM, Whelton M, Reynolds K, Muntner P, Whelton PK, He J. Global burden of hypertension: analysis of worldwide data. *Lancet*. 2005; 365:217–223. [PubMed: 15652604]
2. Lawes CM, Vander Hoorn S, Rodgers A, International Society of Hypertension. Global burden of blood-pressure-related disease, 2001. *Lancet*. 2008; 371:1513–1518. [PubMed: 18456100]
3. Kunes J, Zicha J. The interaction of genetic and environmental factors in the etiology of hypertension. *Physiol Res*. 2009; 58:S33–41. [PubMed: 20131935]
4. Wellcome Trust Case Control Consortium. Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature*. 2007; 447:661–678. [PubMed:17554300]
5. Newton-Cheh C, Johnson T, Gateva V, Tobin MD, Bochud M, Coin L, Najjar SS, Zhao JH, Heath SC, Eyheramendy S, Papadakis K, Voight BF, Scott LJ, Zhang F, Farrall M, Tanaka T, Wallace C, Chambers JC, Khaw KT, Nilsson P, van der Harst P, Polidoro S, Grobbee DE, Onland-Moret NC, Bots ML, Wain LV, Elliott KS, Teumer A, Luan J, Lucas G, Kuusisto J, Burton PR, Hadley D, McArdle WL, Wellcome Trust Case Control Consortium. Brown M, Dominiczak A, Newhouse SJ, Samani NJ, Webster J, Zeggini E, Beckmann JS, Bergmann S, Lim N, Song K, Vollenweider P, Waeber G, Waterworth DM, Yuan X, Groop L, Orho-Melander M, Allione A, Di Gregorio A, Guarrera S, Panico S, Ricceri F, Romanazzi V, Sacerdote C, Vineis P, Barroso I, Sandhu MS, Luben RN, Crawford GJ, Jousilahti P, Perola M, Boehnke M, Bonnycastle LL, Collins FS, Jackson AU, Mohlke KL, Stringham HM, Valle TT, Willer CJ, Bergman RN, Morcken MA, Döring A, Gieger C, Illig T, Meitinger T, Org E, Pfeufer A, Wichmann HE, Kathiresan S, Marrugat J, O'Donnell CJ, Schwartz SM, Siscovick DS, Subirana I, Freimer NB, Hartikainen AL, McCarthy MI, O'Reilly PF, Peltonen L, Pouta A, de Jong PE, Snieder H, van Gilst WH, Clarke R, Goel A, Hamsten A, Peden JF, Seedorf U, Syvänen AC, Tognoni G, Lakatta EG, Sanna S, Scheet P, Schlessinger D, Scuteri A, Dörr M, Ernst F, Felix SB, Homuth G, Lohrer R, Reffelmann T, Rettig R, Völker U, Galan P, Gut IG, Herberg S, Lathrop GM, Zelenika D, Deloukas P, Soranzo N, Williams FM, Zhai G, Salomaa V, Laakso M, Elosua R, Forouhi NG, Völzke H, Uiterwaal CS, van der Schouw YT, Numans ME, Matullo G, Navis G, Berglund G, Bingham SA, Kooner JS, Connell JM, Bandinelli S, Ferrucci L, Watkins H, Spector TD, Tuomilehto J, Altshuler D, Strachan DP, Laan M, Meneton P, Wareham NJ, Uda M, Jarvelin MR, Mooser V, Melander O, Loos RJ, Elliott P, Abecasis GR, Caulfield M, Munroe PB. Genome-wide association study identifies eight loci associated with blood pressure. *Nat Genet*. 2009; 41:666–676. [PubMed: 19430483]
6. Levy D, Ehret GB, Rice K, Verwoert GC, Launer LJ, Dehghan A, Glazer NL, Morrison AC, Johnson AD, Aspelund T, Aulchenko Y, Lumley T, Köttgen A, Vasani

Maria Francesca Ortu, "Genome-wide 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", Tesi di dottorato in Fisiopatologia Medica, Università degli Studi di Sassari

- RS, Rivadeneira F, Eiriksdottir G, Guo X, Arking DE, Mitchell GF, Mattace-Raso FU, Smith AV, Taylor K, Scharpf RB, Hwang SJ, Sijbrands EJ, Bis J, Harris TB, Ganesh SK, O'Donnell CJ, Hofman A, Rotter JI, Coresh J, Benjamin EJ, Uitterlinden AG, Heiss G, Fox CS, Witteman JC, Boerwinkle E, Wang TJ, Gudnason V, Larson MG, Chakravarti A, Psaty BM, van Duijn CM. Genome-wide association study of blood pressure and hypertension. *Nat Genet.* 2009; 41:677–687. [PubMed: 19430479]
7. Munroe PB, Johnson T, Caulfield M. The Genetic Architecture of Blood Pressure Variation. *Current Cardiovascular Risk Reports.* 2009; 3:418–425.
 8. Padmanabhan S, Melander O, Johnson T, Di Blasio AM, Lee WK, Gentilini D, Hastie CE, Menni C, Monti MC, Delles C, Laing S, Corso B, Navis G, Kwakernaak AJ, van der Harst P, Bochud M, Maillard M, Burnier M, Hedner T, Kjeldsen S, Wahlstrand B, Sjögren M, Fava C, Montagnana M, Danese E, Torffvit O, Hedblad B, Snieder H, Connell JM, Brown M, Samani NJ, Farrall M, Cesana G, Mancia G, Signorini S, Grassi G, Eyheramendy S, Wichmann HE, Laan M, Strachan DP, Sever P, Shields DC, Stanton A, Vollenweider P, Teumer A, Völzke H, Rettig R, Newton-Cheh C, Arora P, Zhang F, Soranzo N, Spector TD, Lucas G, Kathiresan S, Siscovick DS, Luan J, Loos RJ, Wareham NJ, Penninx BW, Nolte IM, McBride M, Miller WH, Nicklin SA, Baker AH, Graham D, McDonald RA, Pell JP, Sattar N, Welsh P, Global Bpgen Consortium. Munroe P, Caulfield MJ, Zanchetti A, Dominiczak AF. Genome-Wide Association Study of Blood Pressure Extremes Identifies Variant near UMOD Associated with Hypertension. *PLoS Genet.* 2010; 6:e1001177. [PubMed: 21082022]
 9. Ehret GB. Genome-wide association studies: contribution of genomics to understanding blood pressure and essential hypertension. *Curr Hypertens Rep.* 2010; 12:17–25. [PubMed: 20425154]
 10. Hong KW, Jin HS, Lim JE, Kim S, Go MJ, Oh B. Recapitulation of two genome-wide association studies on blood pressure and essential hypertension in the Korean population. *J Hum Genet.* 2010; 55:336–341. [PubMed: 20414254]
 11. Fox ER, Young JH, Li Y, Dreisbach AW, Keating BJ, Musani SK, Liu K, Morrison AC, Ganesh S, Kutlar A, Ramachandran VS, Polak JF, Fabsitz RR, Dries DL, Farlow DN, Redline S, Adeyemo A, Hirschorn JN, Sun YV, Wyatt SB, Penman AD, Palmas W, Rotter JI, Townsend RR, Doumatey AP, Tayo BO, Mosley TH Jr, Lyon HN, Kang SJ, Rotimi CN, Cooper RS, Franceschini N, Curb JD, Martin LW, Eaton CB, Kardia SL, Taylor HA, Caulfield MJ, Ehret GB, Johnson T, International Consortium for Blood Pressure Genome-wide Association Studies (ICBP-GWAS); Chakravarti A, Zhu X, Levy D, Munroe PB, Rice KM, Bochud M, Johnson AD, Chasman DI, Smith AV, Tobin MD, Verwoert GC, Hwang SJ, Pihur V, Vollenweider P, O'Reilly PF, Amin N, Bragg-Gresham JL, Teumer A, Glazer NL, Launer L, Zhao JH, Aulchenko Y, Heath S, Söber S, Parsa A, Luan J, Arora P, Dehghan A, Zhang F, Lucas G, Hicks AA, Jackson AU, Peden JF, Tanaka T, Wild SH, Rudan I, Igl W, Milaneschi Y, Parker AN, Fava C, Chambers JC, Kumari M, Go MJ, van der Harst P, Kao WH, Sjögren M, Vinay DG, Alexander M, Tabara Y, Shaw-Hawkins S, Whincup PH, Liu Y, Shi G, Kuusisto J, Seielstad M, Sim X, Nguyen KD, Lehtimäki T, Matullo G, Wu Y, Gaunt

Maria Francesca Ortu, "Genome-wide 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", Tesi di dottorato in Fisiopatologia Medica, Università degli Studi di Sassari

TR, Onland-Moret NC, Cooper MN, Platou CG, Org E, Hardy R, Dahgam S, Palmen J, Vitart V, Braund PS, Kuznetsova T, Uiterwaal CS, Campbell H, Ludwig B, Tomaszewski M, Tzoulaki I, Palmer ND, CARDIoGRAM consortium; CKDGen consortium; KidneyGen consortium; EchoGen consortium; CHARGE-HF consortium. Aspelund T, Garcia M, Chang YP, O’Connell JR, Steinle NI, Grobbee DE, Arking DE, Hernandez D, Najjar S, McArdle WL, Hadley D, Brown MJ, Connell JM, Hingorani AD, Day IN, Lawlor DA, Beilby JP, Lawrence RW, Clarke R, Collins R, Hopewell JC, Ongen H, Bis JC, Kähönen M, Viikari J, Adair LS, Lee NR, Chen MH, Olden M, Pattaro C, Bolton JA Hoffman, Köttgen A, Bergmann S, Mooser V, Chaturvedi N, Frayling TM, Islam M, Jafar TH, Erdmann J, Kulkarni SR, Bornstein SR, Grässler J, Groop L, Voight BF, Kettunen J, Howard P, Taylor A, Guarrera S, Ricceri F, Emilsson V, Plump A, Barroso I, Khaw KT, Weder AB, Hunt SC, Bergman RN, Collins FS, Bonnycastle LL, Scott LJ, Stringham HM, Peltonen L, Perola M, Vartiainen E, Brand SM, Staessen JA, Wang TJ, Burton PR, Artigas M Soler, Dong Y, Snieder H, Wang X, Zhu H, Lohman KK, Rudock ME, Heckbert SR, Smith NL, Wiggins KL, Shriner D, Veldre G, Viigimaa M, Kinra S, Prabhakaran D, Tripathy V, Langefeld CD, Rosengren A, Thelle DS, Corsi AM, Singleton A, Forrester T, Hilton G, McKenzie CA, Salako T, Iwai N, Kita Y, Ogihara T, Ohkubo T, Okamura T, Ueshima H, Umemura S, Eyheramendy S, Meitinger T, Wichmann HE, Cho YS, Kim HL, Lee JY, Scott J, Sehmi JS, Zhang W, Hedblad B, Nilsson P, Smith GD, Wong A, Narisu N, Stanáková A, Raffel LJ, Yao J, Kathiresan S, O’Donnell C, Schwartz SM, Ikram MA, Longstreth WT Jr, Seshadri S, Shrine NR, Wain LV, Morken MA, Swift AJ, Laitinen J, Prokopenko I, Zitting P, Cooper JA, Humphries SE, Danesh J, Rasheed A, Goel A, Hamsten A, Watkins H, Bakker SJ, van Gilst WH, Janipalli C, Mani KR, Yajnik CS, Hofman A, Mattace-Raso FU, Oostra BA, Demirkan A, Isaacs A, Rivadeneira F, Lakatta EG, Orru M, Scuteri A, Ala-Korpela M, Kangas AJ, Lyytikäinen LP, Soininen P, Tukiainen T, Würz P, Ong RT, Dörr M, Kroemer HK, Völker U, Völzke H, Galan P, Herceberg S, Lathrop M, Zelenika D, Deloukas P, Mangino M, Spector TD, Zhai G, Meschia JF, Nalls MA, Sharma P, Terzic J, Kumar MJ, Denniff M, Zukowska-Szzechowska E, Wagenknecht LE, Fowkes FG, Charchar FJ, Schwarz PE, Hayward C, Guo X, Bots ML, Brand E, Samani N, Polasek O, Talmud PJ, Nyberg F, Kuh D, Laan M, Hveem K, Palmer LJ, van der Schouw YT, Casas JP, Mohlke KL, Vineis P, Raitakari O, Wong TY, Tai ES, Laakso M, Rao DC, Harris TB, Morris RW, Dominiczak AF, Kivimaki M, Marmot MG, Miki T, Saleheen D, Chandak GR, Coresh J, Navis G, Salomaa V, Han BG, Kooner JS, Melander O, Ridker PM, Bandinelli S, Gyllensten UB, Wright AF, Wilson JF, Ferrucci L, Farrall M, Tuomilehto J, Pramstaller PP, Elosua R, Soranzo N, Sijbrands EJ, Altshuler D, Loos RJ, Shuldiner AR, Gieger C, Meneton P, Uitterlinden AG, Wareham NJ, Gudnason V, Rettig R, Uda M, Strachan DP, Witteman JC, Hartikainen AL, Beckmann JS, Boerwinkle E, Boehnke M, Larson MG, Järvelin MR, Psaty BM, Abecasis GR, Elliott P, van Duijn CM, Newton-Cheh C. Association of genetic variation with systolic and diastolic blood pressure among African Americans: the Candidate Gene Association Resource study. *Hum Mol Genet.* 2011; 20:2273–2284. [PubMed: 21378095]

12. Lettre G, Palmer CD, Young T, Ejebe KG, Allayee H. Genome-wide association study of coronary heart disease and its risk factors in 8,090 African Americans: the

13. International Consortium for Blood Pressure Genome-Wide Association Studies; Ehret GB, Munroe PB, Rice KM, Bochud M, Johnson AD, Chasman DI, Smith AV, Tobin MD, Verwoert GC, Hwang SJ, Pihur V, Vollenweider P, O'Reilly PF, Amin N, Bragg-Gresham JL, Teumer A, Glazer NL, Launer L, Zhao JH, Aulchenko Y, Heath S, Söber S, Parsa A, Luan J, Arora P, Dehghan A, Zhang F, Lucas G, Hicks AA, Jackson AU, Peden JF, Tanaka T, Wild SH, Rudan I, Igl W, Milaneschi Y, Parker AN, Fava C, Chambers JC, Fox ER, Kumari M, Go MJ, van der Harst P, Kao WH, Sjögren M, Vinay DG, Alexander M, Tabara Y, Shaw-Hawkins S, Whincup PH, Liu Y, Shi G, Kuusisto J, Tayo B, Seielstad M, Sim X, Nguyen KD, Lehtimäki T, Matullo G, Wu Y, Gaunt TR, Onland-Moret NC, Cooper MN, Platou CG, Org E, Hardy R, Dahgam S, Palmen J, Vitart V, Braund PS, Kuznetsova T, Uiterwaal CS, Adeyemo A, Palmas W, Campbell H, Ludwig B, Tomaszewski M, Tzoulaki I, Palmer ND, CARDIoGRAM consortium; CKDGen Consortium; KidneyGen Consortium; EchoGen consortium; CHARGE-HF consortium. Aspelund T, Garcia M, Chang YP, O'Connell JR, Steinle NI, Grobbee DE, Arking DE, Kardia SL, Morrison AC, Hernandez D, Najjar S, McArdle WL, Hadley D, Brown MJ, Connell JM, Hingorani AD, Day IN, Lawlor DA, Beilby JP, Lawrence RW, Clarke R, Hopewell JC, Ongen H, Dreisbach AW, Li Y, Young JH, Bis JC, Kähönen M, Viikari J, Adair LS, Lee NR, Chen MH, Olden M, Pattaro C, Bolton JA, Köttgen A, Bergmann S, Mooser V, Chaturvedi N, Frayling TM, Islam M, Jafar TH, Erdmann J, Kulkarni SR, Bornstein SR, Grässler J, Groop L, Voight BF, Kettunen J, Howard P, Taylor A, Guarrera S, Ricceri F, Emilsson V, Plump A, Barroso I, Khaw KT, Weder AB, Hunt SC, Sun YV, Bergman RN, Collins FS, Bonnycastle LL, Scott LJ, Stringham HM, Peltonen L, Perola M, Vartiainen E, Brand SM, Staessen JA, Wang TJ, Burton PR, Artigas MS, Dong Y, Snieder H, Wang X, Zhu H, Lohman KK, Rudock ME, Heckbert SR, Smith NL, Wiggins KL, Doumatey A, Shriner D, Veldre G, Viigimaa M, Kinra S, Prabhakaran D, Tripathy V, Langefeld CD, Rosengren A, Thelle DS, Corsi AM, Singleton A, Forrester T, Hilton G, McKenzie CA, Salako T, Iwai N, Kita Y, Ogihara T, Ohkubo T, Okamura T, Ueshima H, Umemura S, Eyheramendy S, Meitinger T, Wichmann HE, Cho YS, Kim HL, Lee JY, Scott J, Sehmi JS, Zhang W, Hedblad B, Nilsson P, Smith GD, Wong A, Narisu N, Stancáková A, Raffel LJ, Yao J, Kathiresan S, O'Donnell CJ, Schwartz SM, Ikram MA, Longstreth WT Jr, Mosley TH, Seshadri S, Shrine NR, Wain LV, Morken MA, Swift AJ, Laitinen J, Prokopenko I, Zitting P, Cooper JA, Humphries SE, Danesh J, Rasheed A, Goel A, Hamsten A, Watkins H, Bakker SJ, van Gilst WH, Janipalli CS, Mani KR, Yajnik CS, Hofman A, Mattace-Raso FU, Oostra BA, Demirkan A, Isaacs A, Rivadeneira F, Lakatta EG, Orru M, Scuteri A, Ala-Korpela M, Kangas AJ, Lyttikäinen LP, Soininen P, Tukiainen T, Würtz P, Ong RT, Dörr M, Kroemer HK, Völker U, Völzke H, Galan P, Herberg S, Lathrop M, Zelenika D, Deloukas P, Mangino M, Spector TD, Zhai G, Meschia JF, Nalls MA, Sharma P, Terzic J, Kumar MV, Denniff M, Zukowska-Szczechowska E, Wagenknecht LE, Fowkes FG, Charchar FJ, Schwarz PE, Hayward C, Guo X, Rotimi C, Bots ML, Brand E, Samani NJ, Polasek O, Talmud PJ, Nyberg F, Kuh D, Laan M, Hveem K, Palmer LJ, van der Schouw YT, Casas JP, Mohlke KL, Vineis P, Raitakari O, Ganesh SK, Wong TY, Tai ES, Cooper RS, Laakso M, Rao DC, Harris TB, Morris RW, Dominiczak AF, Kivimäki M, Marmot MG, Miki T, Saleheen D, Chandak GR, Coresh J, Navis G, Salomaa V, Han BG, Zhu X, Kooner JS, Melander O, Ridker PM,

Maria Francesca Ortu, "Genome-wide 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", Tesi di dottorato in Fisiopatologia Medica, Università degli Studi di Sassari

Bandinelli S, Gyllensten UB, Wright AF, Wilson JF, Ferrucci L, Farrall M, Tuomilehto J, Pramstaller PP, Elosua R, Soranzo N, Sijbrands EJ, Altshuler D, Loos RJ, Shuldiner AR, Gieger C, Meneton P, Uitterlinden AG, Wareham NJ, Gudnason V, Rotter JI, Rettig R, Uda M, Strachan DP, Witteman JC, Hartikainen AL, Beckmann JS, Boerwinkle E, Vasani RS, Boehnke M, Larson MG, Jarvelin MR, Psaty BM, Abecasis GR, Chakravarti A, Elliott P, van Duijn CM, Newton-Cheh C, Levy D, Caulfield MJ, Johnson T, Tang H, Knowles J, Hlatky M, Fortmann S, Assimes TL, Quertermous T, Go A, Iribarren C, Absher D, Risch N, Myers R, Sidney S, Ziegler A, Schillert A, Bickel C, Sinning C, Rupperecht HJ, Lackner K, Wild P, Schnabel R, Blankenberg S, Zeller T, Münzel T, Perret C, Cambien F, Tiret L, Nicaud V, Proust C, Dehghan A, Hofman A, Uitterlinden A, van Duijn C, Levy D, Witteman J, Cupples LA, Demissie-Banjaw S, Ramachandran V, Smith A, Gudnason V, Boerwinkle E, Folsom A, Morrison A, Psaty BM, Chen IY, Rotter JI, Bis J, Volcik K, Rice K, Taylor KD, Marcante K, Smith N, Glazer N, Heckbert S, Harris T, Lumley T, Kong A, Thorleifsson G, Thorgeirsson G, Holm H, Gulcher JR, Stefansson K, Andersen K, Gretarsdottir S, Thorsteinsdottir U, Preuss M, Schreiber S, Meitinger T, König IR, Lieb W, Hengstenberg C, Schunkert H, Erdmann J, Fischer M, Grosshennig A, Medack A, Stark K, Linsel-Nitschke P, Bruse P, Aherrahrou Z, Peters A, Loley C, Willenborg C, Nahrstedt J, Freyer J, Gulde S, Doering A, Meisinger C, Wichmann HE, Klopp N, Illig T, Meitinger A, Tomaschitz A, Halperin E, Dobnig H, Scharnagl H, Kleber M, Laaksonen R, Pilz S, Grammer TB, Stojakovic T, Renner W, März W, Böhm BO, Winkelmann BR, Winkler K, Hoffmann MM, O'Donnell CJ, Voight BF, Altshuler D, Siscovick DS, Musunuru K, Peltonen L, Barbalic M, Melander O, Elosua R, Kathiresan S, Schwartz SM, Salomaa V, Guiducci C, Burt N, Gabriel SB, Stewart AF, Wells GA, Chen L, Jarinova O, Roberts R, McPherson R, Dandona S, Pichard AD, Rader DJ, Devaney J, Lindsay JM, Kent KM, Qu L, Satler L, Burnett MS, Li M, Reilly MP, Wilensky R, Waksman R, Epstein S, Matthai W, Knouff CW, Waterworth DM, Hakonarson HH, Walker MC, Mooser V, Hall AS, Balmforth AJ, Wright BJ, Nelson C, Thompson JR, Samani NJ, Braund PS, Ball SG, Smith NL, Felix JF, Morrison AC, Demissie S, Glazer NL, Loehr LR, Cupples LA, Dehghan A, Lumley T, Rosamond WD, Lieb W, Rivadeneira F, Bis JC, Folsom AR, Benjamin E, Aulchenko YS, Haritunians T, Couper D, Murabito J, Wang YA, Stricker BH, Gottdiener JS, Chang PP, Wang TJ, Rice KM, Hofman A, Heckbert SR, Fox ER, O'Donnell CJ, Uitterlinden AG, Rotter JI, Willerson JT, Levy D, van Duijn CM, Psaty BM, Witteman JC, Boerwinkle E, Vasani RS, Köttgen A, Pattaro C, Böger CA, Fuchsberger C, Olden M, Glazer NL, Parsa A, Gao X, Yang Q, Smith AV, O'Connell JR, Li M, Schmidt H, Tanaka T, Isaacs A, Ketkar S, Hwang SJ, Johnson AD, Dehghan A, Teumer A, Paré G, Atkinson EJ, Zeller T, Lohman K, Cornelis MC, Probst-Hensch NM, Kronenberg F, Tönjes A, Hayward C, Aspelund T, Eiriksdottir G, Launer LJ, Harris TB, Rampersaud E, Mitchell BD, Arking DE, Boerwinkle E, Struchalin M, Cavalieri M, Singleton A, Giallauria F, Metter J, de Boer J, Haritunians T, Lumley T, Siscovick D, Psaty BM, Zillikens MC, Oostra BA, Feitosa M, Province M, de Andrade M, Turner ST, Schillert A, Ziegler A, Wild PS, Schnabel RB, Wilde S, Münzel TF, Leak TS, Illig T, Klopp N, Meisinger C, Wichmann HE, Koenig W, Zgaga L, Zemunik T, Kolcic I, Minelli C, Hu FB, Johansson A, Igl W, Zaboli G, Wild SH, Wright AF, Campbell H, Ellinghaus D, Schreiber S, Aulchenko YS, Felix JF, Rivadeneira F, Uitterlinden AG, Hofman A, Imboden M, Nitsch D,

Maria Francesca Ortu, "Genome-wide 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", Tesi di dottorato in Fisiopatologia Medica, Università degli Studi di Sassari

Brandstätter A, Kollerits B, Kedenko L, Mägi R, Stumvoll M, Kovacs P, Boban M, Campbell S, Endlich K, Völzke H, Kroemer HK, Nauck M, Völker U, Polasek O, Vitart V, Badola S, Parker AN, Ridker PM, Kardina SL, Blankenberg S, Liu Y, Curhan GC, Franke A, Rochat T, Paulweber B, Prokopenko I, Wang W, Gudnason V, Shuldiner AR, Coresh J, Schmidt R, Ferrucci L, Shlipak MG, van Duijn CM, Borecki I, Krämer BK, Rudan I, Gyllensten U, Wilson JF, Witteman JC, Pramstaller PP, Rettig R, Hastie N, Chasman DI, Kao WH, Heid IM, Fox CS, Vasan RS, Glazer NL, Felix JF, Lieb W, Wild PS, Felix SB, Watzinger N, Larson MG, Smith NL, Dehghan A, Grosshennig A, Schillert A, Teumer A, Schmidt R, Kathiresan S, Lumley T, Aulchenko YS, König IR, Zeller T, Homuth G, Struchalin M, Aragam J, Bis JC, Rivadeneira F, Erdmann J, Schnabel RB, Dörr M, Zweiker R, Lind L, Rodeheffer RJ, Greiser KH, Levy D, Haritunians T, Deckers JW, Stritzke J, Lackner KJ, Völker U, Ingelsson E, Kullo I, Haerting J, O'Donnell CJ, Heckbert SR, Stricker BH, Ziegler A, Reffelmann T, Redfield MM, Werdan K, Mitchell GF, Rice K, Arnett DK, Hofman A, Gottdiener JS, Uitterlinden AG, Meitinger T, Blettner M, Friedrich N, Wang TJ, Psaty BM, van Duijn CM, Wichmann HE, Munzel TF, Kroemer HK, Benjamin EJ, Rotter JI, Witteman JC, Schunkert H, Schmidt H, Völzke H, Blankenberg S, Chambers JC, Zhang W, Lord GM, van der Harst P, Lawlor DA, Sehmi JS, Gale DP, Wass MN, Ahmadi KR, Bakker SJ, Beckmann J, Bilo HJ, Bochud M, Brown MJ, Caulfield MJ, Connell JM, Cook HT, Cotlarciuc I, Davey Smith G, de Silva R, Deng G, Devuyst O, Dikkeschei LD, Dimkovic N, Dockrell M, Dominiczak A, Ebrahim S, Eggermann T, Farrall M, Ferrucci L, Floege J, Forouhi NG, Gansevoort RT, Han X, Hedblad B, van der Heide JJ Homan, Hepkema BG, Hernandez-Fuentes M, Hypponen E, Johnson T, de Jong PE, Kleefstra N, Lagou V, Lapsley M, Li Y, Loos RJ, Luan J, Luttrupp K, Maréchal C, Melander O, Munroe PB, Nordfors L, Parsa A, Peltonen L, Penninx BW, Perucha E, Pouta A, Prokopenko I, Roderick PJ, Ruukonen A, Samani NJ, Sanna S, Schalling M, Schlessinger D, Schlieper G, Seelen MA, Shuldiner AR, Sjögren M, Smit JH, Snieder H, Soranzo N, Spector TD, Stenvinkel P, Sternberg MJ, Swaminathan R, Tanaka T, Ubink-Veltmaat LJ, Uda M, Vollenweider P, Wallace C, Waterworth D, Zerres K, Waeber G, Wareham NJ, Maxwell PH, McCarthy MI, Jarvelin MR, Mooser V, Abecasis GR, Lightstone L, Scott J, Navis G, Elliott P, Kooner JS. Genetic variants in novel pathways influence blood pressure and cardiovascular disease risk. *Nature*. 2011; 478:103–109. [PubMed: 21909115]

14. McCarthy MI, Abecasis GR, Cardon LR, Goldstein DB, Little J, Ioannidis JP, Hirschhorn JN. Genome-Wide association studies for complex traits: consensus, uncertainty and challenges. *Nature Review Genetics*. 2008; 9:356–369. [PubMed: 18398418]
15. Padmanabhan S, Melander O, Hastie C, Menni C, Delles C, Connell JM, Dominiczak AF. Hypertension and genome-wide association studies: combining high fidelity phenotyping and hypercontrols. *J Hypertens*. 2008; 26:1275–1281. [PubMed: 18550997]
16. Li Y, Willer CJ, Ding J, Scheet P, Abecasis GR. MaCH: using sequence and genotype

Maria Francesca Ortu, "Genome-wide 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", Tesi di dottorato in Fisiopatologia Medica, Università degli Studi di Sassari

- data to estimate haplotypes and unobserved genotypes. *Genet Epidemiol.* 2010; 34:816–834. [PubMed: 21058334]
17. Anderson CA, Pettersson FH, Clarke GM, Cardon LR, Morris AP, Zondervan KT. Data quality control in genetic case-control association studies. *Nat Protoc.* 2010; 5:1564–1573. [PubMed: 21085122]
 18. Clarke GM, Anderson CA, Pettersson FH, Cardon LR, Morris AP, Zondervan KT. Basic statistical analysis in genetic case-control studies. *Nat Protoc.* 2011; 6:121–133. [PubMed: 21293453]
 19. Willer CJ, Li Y, Abecasis GR. METAL: fast and efficient meta-analysis of genomewide association scans. *Bioinformatics.* 2010; 26:2190–2191. [PubMed: 20616382]
 20. Heinemeyer T, Wingender E, Reuter I, Hermjakob H, Kel AE, Kel OV, Ignatieva EV, Ananko EA, Podkolodnaya OA, Kolpakov FA, Podkolodny NL, Kolchanov NA. Databases on Transcriptional Regulation: TRANSFAC, TRRD, and COMPEL. *Nucleic Acids Res.* 1998; 26:364–370.
 21. Matys V, Fricke E, Geffers R, Gössling E, Haubrock M, Hehl R, Hornischer K, Karas D, Kel AE, Kel-Margoulis OV, Kloos DU, Land S, Lewicki-Potapov B, Michael H, Münch R, Reuter I, Rotert S, Saxel H, Scheer M, Thiele S, Wingender E. TRANSFAC: transcriptional regulation, from patterns to profiles. *Nucleic Acids Res.* 2003; 31:374–378. [PubMed: 12520026]
 22. <http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html>
 23. Novembre J, Johnson T, Bryc K, Kutalik Z, Boyko AR, Auton A, Indap A, King KS, Bergmann S, Nelson MR, Stephens M, Bustamante CD. Genes mirror geography within Europe. *Nature.* 2008; 456:98–101. [PubMed: 18758442]
 24. Marsden PA, Heng HH, Scherer SW, Stewart RJ, Hall AV, Shi XM, Tsui LC, Schappert KT. Structure and chromosomal localization of the human constitutive endothelial nitric oxide synthase gene. *J Biol Chem.* 1993; 268:17478–17488. [PubMed: 7688726]
 25. Zhang R, Min W, Sessa WC. Functional analysis of the human endothelial nitric oxide synthase promoter. Sp1 and GATA factors are necessary for basal transcription in endothelial cells. *J Biol Chem.* 1995; 270:15320–15326. [PubMed: 7541039]
 26. Oess S, Icking A, Fulton D, Govers R, Müller-Esterl W. Subcellular targeting and

Maria Francesca Ortu, "Genome-wide 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", Tesi di dottorato in Fisiopatologia Medica, Università degli Studi di Sassari

- trafficking of nitric oxide synthases. *Biochem J.* 2006; 396:401–409. [PubMed: 16722822]
27. Fleming I. Molecular mechanisms underlying the activation of eNOS. *Pflugers Arch.* 2010; 459(6):793–806. [PubMed: 20012875]
 28. Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med.* 1993; 329:2002–2012. [PubMed: 7504210]
 29. Su Y, Edwards-Bennett S, Bubb MR, Block ER. Regulation of endothelial nitric oxide synthase by the actin cytoskeleton. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2003; 284:C1542–C1549. [PubMed: 12734108]
 30. Kondrikov D, Fonseca FV, Elms S, Fulton D, Black SM, Block ER, Su Y. Beta-actin association with endothelial nitric-oxide synthase modulates nitric oxide and superoxide generation from the enzyme. *J Biol Chem.* 2010; 285:4319–4327. [PubMed: 19946124]
 31. Karantzoulis-Fegaras F, Antoniou H, Lai SL, Kulkarni G, D’Abreo C, Wong GK, Miller TL, Chan Y, Atkins J, Wang Y, Marsden PA. Characterization of the human endothelial nitric-oxide synthase promoter. *J Biol Chem.* 1999; 274:3076–3093. [PubMed: 9915847]
 32. Söber S, Org E, Kepp K, Juhanson P, Eyheramendy S, Gieger C, Lichtner P, Klopp N, Veldre G, Viigimaa M, Döring A, Kooperativ Gesundheitsforschung in der Region Augsburg Study; Putku M, Kelgo P, HYPertension in ESTonia Study; Shaw-Hawkins S, Howard P, Onipinla A, Dobson RJ, Newhouse SJ, Brown M, Dominiczak A, Connell J, Samani N, Farrall M, MRC British Genetics of Hypertension Study. Caulfield MJ, Munroe PB, Illig T, Wichmann HE, Meitinger T, Laan M. Targeting 160 candidate genes for blood pressure regulation with a genome-wide genotyping array. *PLoS ONE.* 2009; 4:1–13.
 33. Li J, Cun Y, Tang WR, Wang Y, Li SN, Ouyang HR, Wu YR, Yu HJ, Xiao CJ. Association of eNOS gene polymorphisms with essential hypertension in the Han population in southwestern China. *Genet Mol Res.* 2011; 10:2202–2212. [PubMed: 21968727]
 34. Yan-Yan L. Endothelial Nitric Oxide Synthase G894T Gene Polymorphism and Essential Hypertension in the Chinese Population: a Meta-Analysis Involving 11,248 Subjects. *Intern Med.* 2011; 50:2099–2106. [PubMed: 21963726]
 35. Men C, Tang K, Lin G, Li J, Zhan Y. ENOS-G894T polymorphism is a risk factor for essential hypertension in China. *Indian J Biochem Biophys.* 2011; 48:154–157.

[PubMed: 21793305]

36. Niu W, Qi Y. An updated meta-analysis of endothelial nitric oxide synthase gene: three wellcharacterized polymorphisms with hypertension. *PloS One*. 2011; 6:e24266. [PubMed: 21912683]
37. Huang PL, Huang Z, Mashimo H, Bloch KD, Moskowitz MA, Bevan JA, Fishman MC. Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase. *Nature*. 1995; 377:239–242. [PubMed: 7545787]

RINGRAZIAMENTI

Durante questi tre anni ho avuto il piacere di collaborare con diverse persone che hanno contribuito alla mia crescita umana e professionale, vorrei quindi esprimere a loro tutta la mia gratitudine.

Ringrazio il mio Professore Nicola Glorioso, per avermi consigliato e guidato in un territorio vasto e a me sconosciuto e Lo ringrazio soprattutto per avermi dato fiducia.

Grazie a Wanda e Roberta per essere state le artefici del mio destino.

Grazie a Francesca Frau e al gruppo di lavoro della Fondazione Filarete per la loro gentilezza e ospitalità nei miei giorni milanesi.

Grazie a tutti gli amici e colleghi del gruppo di ricerca di cui ho fatto parte: Chiara, Giuseppe, i miei colleghi biologi Daniela e Giovanni, gli specializzandi della scuola di medicina d'emergenza-urgenza e le infermiere Elisa e Lucia, perché tutti insieme hanno contribuito a rendere l'ambulatorio d'ipertensione un luogo in cui è stato piacevole recarsi quotidianamente.

Maria Francesca