



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΜΑΘΗΜΑΤΙΚΩΝ**

Διδακτορική Διατριβή

**«Γενετική της Αρτηριακής Υπέρτασης: Μεθοδολογική και Κλινική Προσέγγιση»**

Υποψήφιος Διδάκτωρ

**Γεώργιος Δ. Κίτσιος**

Τριμελής συμβουλευτική επιτροπή:

**1) Αναπλ. Καθηγ. Η. Ζιντζαράς, Επιβλέπων**

**2) Καθηγ. Φ. Τρυποσκιάδης**

**3) Αναπλ. Καθηγ. Ι. Στεφανίδης**

Σεπτέμβριος 2009

**Περιεχόμενα:**

I. ΠΕΡΙΛΗΨΗ	3-5
Abstract	5-7
II. ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΥΠΕΡΤΑΣΗΣ	8-12
III. ΕΙΔΙΚΟΙ ΣΚΟΠΟΙ:	13
IV. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΚΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ	
1. Ανάλυση σύνδεσης	14-45
Ειδικός σκοπός 1:	29-45
2. Μελέτες γενετικής συσχέτισης	46-94
i). Μελέτες υποψηφίου γονιδίου	46-94
Ειδικός σκοπός 2:	46-75
Ειδικός σκοπός 3:	76-94
ii) Μελέτες ευρείας γονιδιωματικής συσχέτισης	95-104
Ειδικός σκοπός 4:	95-104
V. ΚΛΙΝΙΚΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ	
Ειδικός σκοπός 5:	105-118
VI. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	
1. Δημοσιεύσεις του Υποψηφίου Διδάκτορα	119-120
2. Εργαστηριακά πρωτόκολλα	121-124
3. Επιπρόσθετες βιβλιογραφικές αναφορές	125-130
VII. ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	131
VIII. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	132-144

## I. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η αρτηριακή υπέρταση αποτελεί το πλέον συχνό καρδιαγγειακό νόσημα παγκοσμίως και συνιστά έναν μειζόνα καρδιαγγειακό παράγοντα κινδύνου. Η αιτιολογία του νοσήματος θεωρείται πολυπαραγοντική, ως αποτέλεσμα αλληλεπιδράσεων μεταξύ γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων.

Οι ερευνητικές προσπάθειες για τη χαρτογράφηση των υπεύθυνων γονιδίων της υπέρτασης έχουν προσανατολιστεί σε δύο κύριες προσεγγίσεις: α) στις μελέτες γενετικής σύνδεσης, οι οποίες διεξάγονται σε οικογένειες με συνάθροιση περιστατικών υπέρτασης, και β) στις μελέτες γενετικής συσχέτισης, οι οποίες διεξάγονται σε πάσχοντες και μάρτυρες από το γενικό πληθυσμό. Παρόλα αυτά, ο προσδιορισμός των υπεύθυνων γενετικών παραγόντων έχει αποδειχθεί δυσχερές και ένας μικρός αριθμός ευρημάτων έχει μέχρι σήμερα επαληθευτεί. Η περιορισμένη πρόοδος στη διαλεύκανση της γενετικής αιτιολογίας του νοσήματος έχει αποδοθεί σε παράγοντες σχετικούς με την πολυγονιδιακή φύση του νοσήματος αλλά και σε μεθοδολογικά ζητήματα, όπως η ελλιπής στατιστική ισχύς των μελετών, ο πτωχός φαινοτυπικός χαρακτηρισμός των ατόμων και η μη αξιολόγηση γενετικών και περιβαλλοντικών αλληλεπιδράσεων.

Δεδομένων των περιορισμών στην κατανόηση της γενετικής αιτιολογίας της υπέρτασης, στην παρούσα διδακτορική διατριβή τέθηκε ως στόχος να επιχειρηθεί μια δίπτυχη προσέγγιση, μεθοδολογική και κλινική, για την ταυτοποίηση γενετικών τόπων σχετιζόμενων με το νόσημα. Κατά τη μεθοδολογική προσέγγιση, εφαρμόστηκαν τεχνικές μοριακής ιατρικής βασισμένης σε ενδείξεις σε διαθέσιμα δεδομένα μελετών γενετικής σύνδεσης και συσχέτισης. Κατά την κλινική προσέγγιση, σχεδιάστηκε και διεξήχθη μια μελέτη γενετικής συσχέτισης του γονιδίου της ενδοθηλιακής συνθετάσης του μονοξειδίου του αζώτου (*NOS3*) σε Θεσσαλικό πληθυσμό.

Για τον προσδιορισμό σημαντικών γενετικών τόπων σχετιζόμενων με τη ρύθμιση της αρτηριακής πίεσης, πραγματοποιήθηκε μια μετα-ανάλυση σαρώσεων ευρείας γονιδιωματικής σύνδεσης για την πίεση παλμού. Η μετα-ανάλυση πραγματοποιήθηκε με μεθοδολογία και εργαλεία βιοπληροφορικής που αναπτύχθηκαν στο Εργαστήριο Βιομαθηματικών. Προσδιορίστηκαν πέντε γενετικοί τόποι με στατιστική υποστήριξη σύνδεσης (21q22, 18q12-21, 18q21-23, 6p22-21 και 10q22-23), εκ των οποίων δύο περιγράφηκαν για πρώτη φορά (6p22-21 και 10q22-23). Οι τόποι αυτοί συνιστούν

περιοχές προτεραιότητας σε μελλοντικές έρευνες καθώς η γονοτύπωση των περιοχών αυτών με επιπλέον γενετικούς δείκτες σε εκτεταμένες οικογένειες θα μπορούσε να συνδράμει στον προσδιορισμό των υπεύθυνων γονιδίων για την πίεση παλμού.

Στον τομέα των μελετών γενετικής συσχέτισης, πραγματοποιήθηκε καταρχήν σύνθεση των μελετών για τα γονίδια που εμπλέκονται στη ρύθμιση της σύνθεσης του μονοξειδίου του αζώτου (NO), ενός μορίου με καθοριστικό ρόλο στην ομοιόσταση του καρδιαγγειακού συστήματος. Η μετα-ανάλυση 35 μελετών για το γονίδιο *NOS3* ανέδειξε συσχέτιση για έναν πολυμορφισμό του γονιδίου (4a/b), με το προγονικό αλληλίο να προσφέρει 15% ελάττωση κινδύνου ανάπτυξης υπέρτασης. Η εργασία αυτή υπογράμμισε και τη σημασία της ανάλυσης απλοτύπων για την πιο περιεκτική περιγραφή της γενετικής ποικιλομορφίας του γονιδίου. Παράλληλα, διεξήχθη μια σύνοψη πεδίου των μελετών υποψηφίου γονιδίου της οικογένειας των αδρενεργικών υποδοχέων στην υπέρταση και δημιουργήθηκε ένα πληροφοριακό σύστημα για την καταχώρηση και διαρκή δυνατότητα επεξεργασίας των δεδομένων. Ανιχνεύθηκε συσχέτιση για πέντε πολυμορφισμούς των γονιδίων *ADRB1*, *ADRB2*, *ADRB3* και *ADRA1A*, ενώ αποκλείστηκε η ύπαρξη σημαντικότητας για άλλα συχνά μελετώμενα αλληλία. Για τις πρόσφατα δημοσιευμένες μελέτες ευρείας γονιδιωματικής συσχέτισης, παραγματοποιήθηκε μια ενδεδειγμένη μεθοδολογική αξιολόγηση των υποθέσεων εργασίας τους και αναδείχθηκαν σημαντικοί περιορισμοί της προσέγγισης, οι οποίοι πρέπει να λαμβάνονται υπόψη κατά το σχεδιασμό, την εκτέλεση και την ερμηνεία των μελετών αυτών. Επιπρόσθετα, εφαρμόστηκε η μεθοδολογία της γονιδιωματικής σύγκλισης προς προσδιορισμό γενετικών τόπων με ταυτόχρονη υποστήριξη από ανεξάρτητες ερευνητικές μεθοδολογίες.

Κατά την κλινική προσέγγιση, σχεδιάστηκε και πραγματοποιήθηκε μια μελέτη γενετικής συσχέτισης πολυμορφισμών και απλοτύπων του γονιδίου *NOS3* με την υπέρταση σε δείγμα πασχόντων και μαρτύρων από το Θεσσαλικό πληθυσμό. Επιπλέον, σε μια δευτερογενή ανάλυση διερευνήθηκε η πιθανή ύπαρξη συσχέτισης του γονιδίου *NOS3* με την εμφάνιση υπερτροφίας της αριστερής κοιλίας σε υπερτασικούς ασθενείς. Η μελέτη μας ανέδειξε τον προστατευτικό ρόλο ενός σπάνιου απλοτύπου του γονιδίου (T-a-G\*) έναντι της ανάπτυξης υπέρτασης ( $p=0.02$ ). Αντίστροφα, ο απλότυπος (C-a-T\*) συσχετίστηκε με την υπερτροφία της αριστερής κοιλίας στους υπερτασικούς ασθενείς ( $p=0.008$ ). Αυτοί οι σπάνιοι απλότυποι είναι δυνατό να παρέχουν σημαντικές πληροφορίες για την αποκάλυψη των υπεύθυνων λειτουργικών πολυμορφισμών που συμμετέχουν στην παθογένεση του νοσήματος και

να αναδείξουν νέους μοριακούς στόχους προς παρέμβαση. Τα αποτελέσματα των μελετών μας χρήζουν όμως επιβεβαίωσης σε διαφορετικές ομάδες πληθυσμού πριν επιχειρηθεί η διαλεύκανση του ακριβούς μοριακού μηχανισμού που αποτελεί τη βάση της παρατηρούμενης συσχέτισης.

## ABSTRACT

Arterial hypertension is the most common cardiovascular disorder globally and represents a major risk factor for cardiovascular events. The etiology of the disorder is currently considered to be multifactorial, stemming from the complex interaction between genetic and environmental factors.

The research efforts to map the predisposing genes and mutations have been divided in two major approaches: 1. Linkage analysis studies, which are performed in extended pedigrees that have shown accumulation of the disease, and 2. Genetic association studies, which are conducted in cases and controls retrieved from the general population. However, the identification of the responsible genetic factors has been proven to be very difficult and few positive findings have shown replication validity. This limited progress has been attributed to factors related to the polygenic nature of the disease and to methodological issues as well, such as the limited statistical power of individual studies, the poor phenotypic characterization of enrolled subjects and the lack of accounting for genetic and environmental interactions.

Given the limited understanding of the genetic etiology of hypertension, the current PhD dissertation aimed to perform a dual approach -methodological and clinical- to the genetics of hypertension, in order to identify responsible genetic loci. According to the methodological approach, molecular evidence-based medicine techniques were applied in available data from genetic linkage and association studies. For the clinical approach, a genetic association study of the endothelial nitric oxide synthase gene (*NOS3*) was designed and conducted in a Thessalian population.

In order to identify genetic loci linked to pulse pressure variation, a meta-analysis of genome-wide linkage scans was performed. Methodologies and bioinformatic tools developed in the Department of Biomathematics were applied for the performance of the meta-analysis. Five genetic loci showing consistent linkage findings were identified (21q22, 18q12-21, 18q21-23, 6p22-21 και 10q22-23), and two of them were described for the first time by the meta-analysis and not in individual studies (6p22-21

και 10q22-23). These genetic loci could merit prioritization in future studies, since further genotyping of these regions with additional markers and in extended pedigrees could contribute in the positional cloning of the responsible genes.

In the field of genetic association studies, a meta-analysis of candidate gene studies was performed for the genes involved in the regulation of nitric oxide synthesis, which is a molecule playing a crucial role in cardiovascular homeostasis. The meta-analysis of 35 studies for the *NOS3* gene has shown association only for the intronic 4a/b polymorphism; the ancestral allele conferred a 15% reduced risk of developing hypertension. This paper also highlighted the importance of haplotype analysis in order to achieve a comprehensive description of the genetic variation. Additionally, a field synopsis of the genetic association studies for the adrenergic receptor family genes in hypertension was conducted and an information system for continuous data analysis and synthesis was created. Association was detected for 5 variants of the *ADRB1*, *ADRB2*, *ADRB3* and *ADRA1A* genes, while implication was declined for other commonly investigated variants. For the recently published genome-wide association studies, a thorough methodological assessment was performed, which revealed that important limitations of this approach during the design, analysis and interpretation stages result from the implicit presumptions of this approach, which were described in detail for the first time by this current work. Additionally, the genomic convergence approach was applied in hypertension studies with a genome-wide setting in order to identify genetic loci with concomitant and independent evidence of implication.

For the clinical approach, a hypertension genetic association study of *NOS3* gene polymorphisms and haplotypes was conducted in cases and controls derived from the Thessalian general population. Additionally, in a secondary analysis, the left ventricular hypertrophy was considered as an endpoint for association with *NOS3* genetic variation in the hypertensive cohort only. Our study detected the protective role of a rare haplotype (T-a-G\*) against the development of hypertension ( $p=0.02$ ). However, the haplotype (C-a-T\*) was associated with left ventricular hypertrophy in the hypertensive patients ( $p=0.008$ ). These rare haplotypes could convey important information regarding the underlying functional genetic variation that is involved in the pathogenesis of the disease and help identify new molecular targets for intervention. Nevertheless, these results warrant replication in independent cohorts

prior mechanistic studies that will aim to determine the functional pathway that constitutes the basis of the observed association.

## II. ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΥΠΕΡΤΑΣΗΣ

Η αρτηριακή υπέρταση, οριζόμενη ως εμμένουσα αύξηση των τιμών συστολικής ή/και διαστολικής αρτηριακής πίεσεως άνω των 140/90mmHg αντίστοιχα, αποτελεί το πλέον συχνό καρδιαγγειακό νόσημα παγκοσμίως, με επιπολασμό 20-30% στους ενήλικες του δυτικού κόσμου (*Kearney et al., 2005*). Η αρτηριακή υπέρταση αποτελεί έναν μειζόνα καρδιαγγειακό παράγοντα κινδύνου για αθηροθρομβωτική νόσο, καρδιακή ανεπάρκεια και νεφρική νόσο τελικού σταδίου. Η ιδιοπαθής υπέρταση, οριζόμενη ως υπέρταση χωρίς προφανή αίτια, αποτελεί το 95% των περιπτώσεων υπέρτασης. Στο υπόλοιπο 5% των περιπτώσεων, η υπέρταση αποτελεί δευτεροπαθή συνέπεια κάποιου νοσήματος όπως ο πρωτοπαθής υπεραλδοστερονισμός, το σύνδρομο Cushing, το φαιοχρωμοκύτωμα ή κάποια νεφρική νόσος.

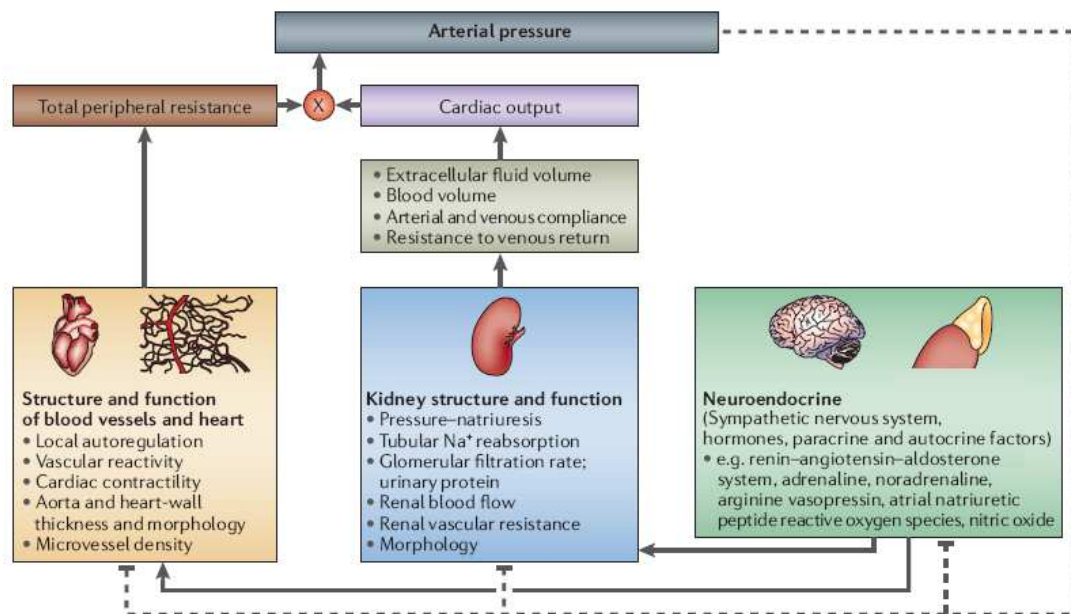
Η υπέρταση θεωρείται σήμερα ως ένα πολυπαραγοντικό νόσημα παραγόμενο από τις πολύπλοκες αλληλεπιδράσεις μεταξύ γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων (*Cowley, Jr., 2006; Mottl et al., 2008; Binder, 2007*).

Μελέτες οικογενειών έχουν αναδείξει ένα σημαντικό ρόλο γενετικών παραγόντων στην ανάπτυξη ιδιοπαθούς υπέρτασης (*Hopkins & Hunt, 2003*). Η συνάθροιση περιστατικών υπέρτασης σε οικογένειες έχει παρατηρηθεί από δεκαετίες, με την κληρονομικότητα του νοσήματος (ποσοστό της φαινοτυπικής διακύμανσης που θεωρείται ότι οφείλεται σε γενετικούς παράγοντες) να εκτιμάται περίπου στο 30-50% (*Mottl et al., 2008*).

Οι προσπάθειες για την ταυτοποίηση των υπεύθυνων γενετικών παραγόντων της υπέρτασης έχουν σε μεγάλο βαθμό καθοριστεί από τη σύγχρονη κατανόηση της υποκείμενης παθοφυσιολογίας του νοσήματος (*Cowley, Jr., 2006*). Η αρτηριακή πίεση ρυθμίζεται από ένα σύνολο παραγόντων, όπως ο όγκος αίματος, η καρδιακή παροχή και η αγγειακή αντίσταση και ευενδοτότητα. Οι παράγοντες αυτοί με τη σειρά τους ρυθμίζονται από νευροενδοκρινικούς και παρακρινικούς μηχανισμούς. Καθοριστικός είναι επίσης και ο ρόλος των νεφρών στη ρύθμιση ισορροπίας υγρών και ηλεκτρολυτών και τελικά στη ρύθμιση της αρτηριακής πίεσεως. Πολλοί παράγοντες είναι δυνατό να καθορίσουν την επάρκεια των νεφρών να φέρουν σε πέρας το έργο τους, συμπεριλαμβανομένων των νεφρικών συμπαθητικών νεύρων,



αυτοκρινικών παραγόντων και πολλών ενδογενών μηχανισμών που ρυθμίζουν την νεφρική ροή αίματος και τη σπειραματική διήθηση (Hall, 2003).



Εικόνα 1. Μηχανισμοί ρύθμισης αρτηριακής πίεσης (Cowley, Jr., 2006).

Οι πιο συχνές μορφές υπέρτασης διαγιγνώσκονται στη μέση ηλικία ως επαναλαμβανόμενες ήπιες ή διαλείπουσες αυξήσεις την αρτηριακής πίεσης άνω των φυσιολογικών ορίων και χαρακτηρίζονται από νεφρική και συστηματική αγγειοσύσπαση. Με την προοδο της ηλικίας, οι δομικές αλλαγές των αγγείων επιτείνουν την αγγειοσύσπαση. Οι μεταβολές αυτές επιμένουν και μετά την απομάκρυνση του αρχικού αιτίου και οδηγούν σε οξειδωτικό στρες και περαιτέρω δομικές βλάβες, ενώ συνήθως στο στάδιο αυτό η υπέρταση χαρακτηρίζεται και από αλατοευαισθησία (Hall, 2003; Cowley, Jr., 2006). Επίσης, παρατηρείται ετερογένεια στο ρυθμό εξέλιξης της νεφρικής βλάβης (ή άλλης βλάβης τελικού οργάνου-στόχου) μεταξύ διαφορετικών πληθυσμών, υποδηλώνοντας την ύπαρξη ξεχωριστής γενετικής προδιάθεσης για την ανάπτυξη υπέρτασης και για την εμφάνιση βλάβης τελικού οργάνου-στόχου. Οι παρατηρήσεις αυτές οδήγησαν σε σημαντικές προσπάθειες για τον προσδιορισμό γονιδίων που να ευθύνονται για την εμφάνιση υπέρτασης στα πρώιμα στάδια του νοσήματος καθώς και για την εμφάνιση αλατοευαισθησίας σε προχωρημένα στάδια (Luft, 2000; Hopkins & Hunt, 2003). Επιπλέον, διεξάγονται σημαντικές ερευνητικές προσπάθειες για τον προσδιορισμό γονιδίων που να

σχετίζονται με ευπάθεια σε βλάβη των τελικών οργάνων-στόχων (*Kato, 2002; Cowley, Jr., 2006*).

Παρόλα αυτά, η μετάβαση από την επιδημιολογική παρατήρηση της κληρονομικότητας του νοσήματος στον προσδιορισμό των υπεύθυνων γενετικών παραγόντων είναι δυσχερής και έχει μέχρι σήμερα επιφέρει περιορισμένα αποτελέσματα (*Hopkins & Hunt, 2003*). Η περιορισμένη πρόοδος στη διαλεύκανση της γενετικής αιτιολογίας του νοσήματος πιθανώς οφείλεται σε μια σειρά από παράγοντες, όπως η πολυγονιδιακή φύση του νοσήματος, με πολλές εκτιμώμενες αλληλεπιδράσεις μεταξύ γονιδίων (επίσταση) ή μεταξύ γονιδίων και περιβαλλοντικών παραγόντων (*Binder, 2007*). Σε μερικές περιπτώσεις ενδεχομένως να εμπλέκονται πολλοί γενετικοί παράγοντες με μικρές μεμονωμένες επιδράσεις, ενώ σε άλλες περιπτώσεις είναι πιθανό η προδιάθεση να οφείλεται σε ένα μικρό μόνο αριθμό γενετικών παραγόντων (*Cowley, Jr., 2006*).

Οι ερευνητικές προσπάθειες για την χαρτογράφηση των υπεύθυνων γονιδίων της υπέρτασης έχουν προσανατολιστεί σε 2 κύριες προσεγγίσεις: 1. τις μελέτες γενετικής σύνδεσης και 2. τις μελέτες γενετικής συσχέτισης, οι οποίες περιγράφονται εκτενώς στο τμήμα της Μεθοδολογικής προσέγγισης της παρούσας διατριβής.

Μια συνοπτική σύγκριση των 2 αυτών προσεγγίσεων παρουσιάζεται στον ακόλουθο Πίνακα 1.

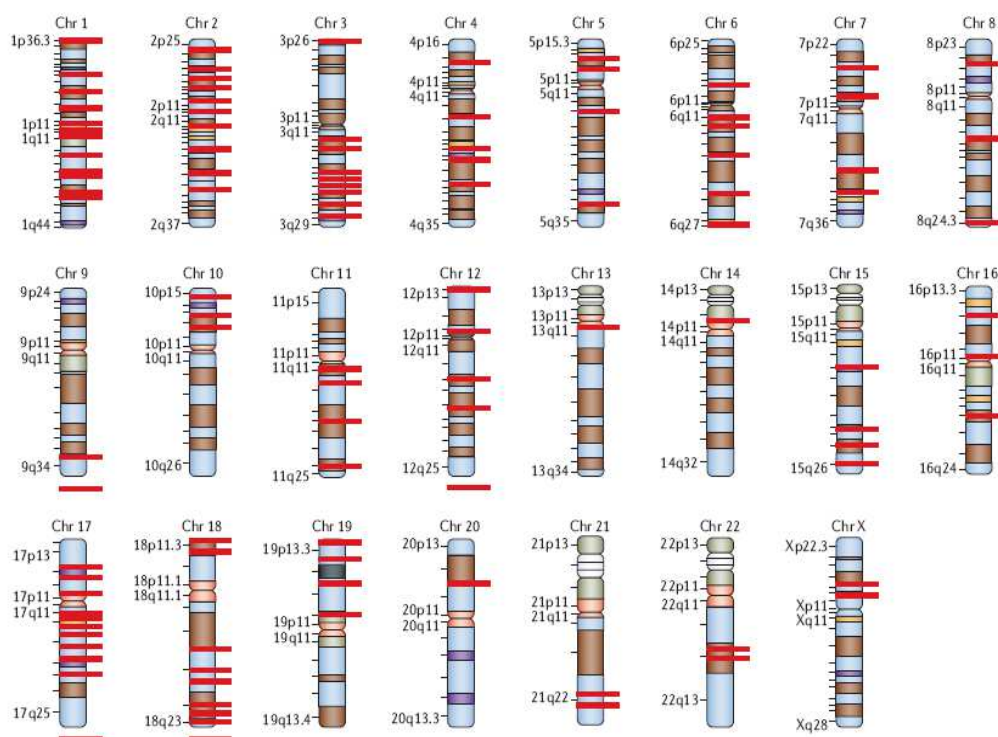
*Πίνακας 1. Σύγκριση των 2 κύριων στρατηγικών που χρησιμοποιούνται για τη διερεύνηση της γενετικής αιτιολογίας της υπέρτασης.*

	Μελέτες Γενετικής Συσχέτισης	Μελέτες Γενετικής Σύνδεσης
Μελετώμενο δείγμα	Μη σχετιζόμενα άτομα σε σχεδιασμό μελέτης πασχόντων/μαρτύρων	2-3 γενεές προσβεβλημένων οικογενειών ή ζευγών-αδελφών
Στατιστική ισχύς	Σχετικά αυξημένη	Πτωχή
Ευαισθησία σε ψευδώς αρνητικά ευρήματα	Σχετικά υψηλή	Σχετικά χαμηλή
Γονίδια στόχος	Συνήθως εστιάζουν σε υπονήφια γονίδια	Συνήθως δεν επιλέγονται υπονήφιες περιοχές/γονίδια
Μέγεθος χρωμοσωμικού τμήματος στο οποίο εκτιμάται ότι ανιχνεύεται σύνδεση	3kb-50kb	10-20cM (10Mb)
Αριθμός γενετικών δεικτών που απαιτείται για τη διεξαγωγή ευρείας γονιδιωματικής μελέτης	>100.000 SNPs	300-400 μικροδορυφορικοί δείκτες

Παρά τις εκτεταμένες προσπάθειες που έχουν πραγματοποιηθεί και με τους 2 τύπους προσεγγίσεων, τα αξιόπιστα και επαληθευμένα ευρήματα είναι πολύ περιορισμένα. Μεθοδολογικά ζητήματα, όπως η ελλιπής στατιστική ισχύς, ο πτωχός

φαινοτυπικός χαρακτηρισμός των ατόμων, η ύπαρξη διαστρωμάτωσης πληθυσμού και η μη αξιολόγηση επιστατικών και περιβαλλοντικών αλληλεπιδράσεων έχουν αναδειχθεί (*Kato, 2002; Binder, 2007; Kitsios & Zintzaras, 2007; Zintzaras & Lau, 2008b; Zintzaras & Lau, 2008a*).

Τα αποτελέσματα των μελετών γενετικής σύνδεσης έχουν χαρακτηριστεί ως απογοητευτικά, δεδομένου ότι διαφορετικές μελέτες έχουν χαρτογραφήσει σύνδεση σε εντελώς διαφορετικές περιοχές του γονιδιώματος, περιγράφοντας μια συγχυτική εικόνα σχετικά με τους υπεύθυνους γενετικούς τόπους (Εικόνα 2) (*Kato, 2002; Hamet & Seda, 2007; Cowley, Jr., 2006*). Οι χαμηλές στατιστικές μετρήσεις σύνδεσης στις περισσότερες μελέτες πιθανώς οφειλόταν σε σχετικά μικρούς αριθμούς μελετώμενων οικογενειών και πασχόντων (*Zintzaras & Ioannidis, 2005b; Zintzaras & Ioannidis, 2005a; Zintzaras et al., 2007*).



Εικόνα 2. Περιοχές που έχουν εμφανίσει σύνδεση με την υπέρταση σε διαφορετικές μελέτες (*Cowley, Jr., 2006*).

Οι μελέτες γενετικής συσχέτισης έχουν κυρίως εστιάσει στη διερεύνηση γενετικών παραλλαγών (πολυμορφισμών) γονιδίων που κρίνονται ως υποψήφια προς μελέτη βάσει πιθανής εμπλοκής τους στην παθοφυσιολογία του νοσήματος (*Hopkins*

& Hunt, 2003;Kato, 2002;Luft, 2000). Μέχρι σήμερα έχουν διερευνηθεί περισσότερα από 700 γονίδια σε περίπου 2.400 δημοσιευμένες μελέτες γενετικής συσχέτισης (Πίνακας 2) (Yu et al., 2008a). Εντούτοις, επαληθευμένα ευρήματα και σταθερότητα στην εμφάνιση συσχέτισης στο χρόνο (όπως εκτιμάται με τεχνικές σύνθεσης δεδομένων και μετα-αναλύσεις) έχει παρατηρηθεί για πολύ λίγα γονίδια και πολυμορφισμούς, με αποτέλεσμα η πλειονότητα των αναφερόμενων συσχετίσεων να θεωρείται ότι συνιστά ψευδώς θετικά ευρήματα (Zintzaras & Lau, 2008a;Zintzaras & Lau, 2008b). Από το 2007 έχει αρχίσει και η δημοσίευση των πρώτων μελετών ευρείας γονιδιωματικής συσχέτισης στην υπέρταση (MEΓΣ), οι οποίες έχουν αλλάξει δραματικά το τοπίο των γενετικών συσχετίσεων (Hindorff et al., 2009). Παρόλα αυτά, η κατανόηση της γενετικής αιτιολογίας της υπέρτασης παραμένει πολύ περιορισμένη, και επομένως απαιτείται περαιτέρω μεθοδολογική και κλινική έρευνα προκειμένου να προσδιοριστούν με ακρίβεια οι υπεύθυνοι γενετικοί παράγοντες (Binder, 2007;Mottl et al., 2008).

Πίνακας 2. Κατάλογος των πλέον συχνά μελετούμενων υποψηφίων γονιδίων υπέρτασης.

Γονίδιο	Μελέτες υποψηφίου γονιδίου	Μετα-αναλύσεις
ACE  	424	4
AGT  	254	7
NOS3  	174	4
AGTR1  	172	2
CYP11B2  	110	3
GNB3  	104	3
APOE  	103	1
MTHFR  	98	7
ADD1  	82	1
ADRB2  	78	1
F5  	47	5
IL6  	40	1
ADRB3  	35	2
PPARG  	33	1
SERPINE1  	32	2
...	...	...
Συνολικά: 734	Συνολικά: 2397	Συνολικά: 39

### III. ΕΙΔΙΚΟΙ ΣΚΟΠΟΙ:

Με δεδομένα τα κενά έρευνας στη γενετική επιδημιολογία της υπέρτασης, το πρωτόκολλο της παρούσας διδακτορικής διατριβής έθεσε τους ακόλουθους ειδικούς σκοπούς, διαχωρισμένους σε μεθοδολογική και κλινική προσέγγιση στη γενετική της υπέρτασης:

#### **A. Μεθοδολογική προσέγγιση**

##### **1. Μελέτες γενετικής σύνδεσης**

**Ειδικός σκοπός 1:** Ο προσδιορισμός σημαντικών γενετικών τόπων συνδεόμενων με την αρτηριακή πίεση παλμού από μετα-αναλύσεις μελετών ευρείας γονιδιωματικής σάρωσης.

##### **2. Μελέτες γενετικής συσχέτισης**

###### **i). Μελέτες υποψηφίου γονιδίου**

**Ειδικός σκοπός 2:** Η σύνθεση των δεδομένων των μελετών γενετικής συσχέτισης του γονιδίου *NOS3* στην υπέρταση ώστε να αποσαφηνιστεί ο ρόλος του γονιδίου και να διερευνηθούν πιθανές πηγές ετερογένειας μεταξύ των επιμέρους μελετών.

**Ειδικός σκοπός 3:** Η σύνθεση των δεδομένων των μελετών γενετικής συσχέτισης των γονιδίων της οικογένειας των αδρενεργικών υποδοχέων στην υπέρταση ώστε να αποσαφηνιστεί ο ρόλος των γονιδίων αυτών καθώς και να διερευνηθούν πιθανές πηγές ετερογένειας μεταξύ των επιμέρους μελετών.

###### **ii). Μελέτες ευρείας γονιδιωματικής συσχέτισης**

**Ειδικός σκοπός 4:** Η μεθοδολογική αξιολόγηση των μελετών ευρείας γονιδιωματικής συσχέτισης και η εφαρμογή τεχνικών γονιδιωματικής σύγκλισης στις μελέτες της υπέρτασης.

#### **B. Κλινική προσέγγιση**

**Ειδικός σκοπός 5:** Η διεξαγωγή μελέτης γενετικής συσχέτισης πολυμορφισμών και απλοτύπων του γονιδίου *NOS3* σε πληθυσμό της Θεσσαλίας σε σχέση 5α.) με την υπέρταση, και 5β.) με την υπερτροφία της αριστερή κοιλίας.

## IV. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΚΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ

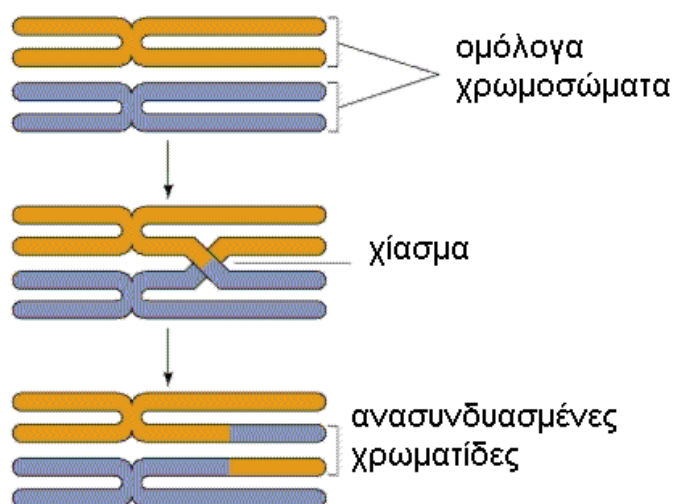
### 1. Ανάλυση σύνδεσης – linkage analysis

#### ΘΕΩΡΗΤΙΚΗ ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ως σύνδεση ορίζεται η τάση των αλληλόμορφων που βρίσκονται κοντά πάνω σε ένα χρωμόσωμα, να μεταβιβάζονται μαζί, ως αδιαίρετη μονάδα κατά τη διάρκεια της μείωσης. Η ανάλυση σύνδεσης χρησιμοποιεί μελέτες οικογενειών για να καθορίσει εάν δύο γονίδια συνδέονται όταν μεταβιβάζονται από τη μία γενία στην επόμενη. Αποτελεί μια ιδιαίτερα σημαντική μεθοδολογία της ιατρικής γενετικής καθώς είναι η μοναδική μέθοδος που επιτρέπει τη χαρτογράφηση γονιδίων τα οποία είναι ανιχνεύσιμα μόνο από τα κληρονομικά τους γνωρίσματα, δηλαδή στις περιπτώσεις νοσημάτων στα οποία το υπεύθυνο γονίδιο δεν έχει απομονωθεί (*Green et al., 1989; Weissenbach, 1993*). Η πλειονότητα των γονιδίων που προκαλούν γενετικά νοσήματα εμπίπτουν σε αυτή την κατηγορία, διότι δεν έχει διευκρινιστεί η βιοχημική και μοριακή τους βάση.

Προκειμένου να γίνουν κατανοητές οι αρχές της ανάλυσης σύνδεσης, είναι απαραίτητη η γνώση βασικών φαινομένων που λαμβάνουν χώρα κατά τη διάρκεια της μείωσης.

Κατά τη διάρκεια της μείωσης I, τα ομόλογα χρωμοσώματα έρχονται σε σύναψη, ανταλλάσσουν χρωμοσωμικά τμήματα σχηματίζοντας χιάσματα και χωρίζονται για να παράγουν 4 γαμέτες. Κάθε χιάσμα αντιστοιχεί σε ένα σημείο διασκελισμού (crossing-over) στο οποίο ο βραχίονας ενός χρωμοσώματος επιχιάζεται με έναν βραχίονα ομολόγου χρωμοσώματος. Μετά το τέλος της μείωσης, αποτέλεσμα κάθε τέτοιου διασκελισμού είναι η παραγωγή 4 τύπων γαμετών, 2 από τους οποίους είναι ίδιοι με τους γονεϊκούς και καλούνται μη ανασυνδυασμένοι (non-recombinants) και 2 είναι διαφορετικοί και καλούνται ανασυνδυασμένοι (recombinants). Περισσότεροι από έναν διασκελισμό αναμένονται σε κάθε ανθρώπινο χρωμόσωμα. (Εικόνα 3)



Εικόνα 3: Διασκελισμός ομολόγων χρωμοσωμάτων κατά τη μείωση I.

Η ανάλυση σύνδεσης εκμεταλλεύεται αυτά τα μοναδικά φαινόμενα της μείωσης μετρώντας τη συχνότητα του ανασυνδυασμού για να εκτιμήσει την εγγύτητα 2 διαφορετικών γενετικών τόπων.

Κλάσμα ανασυνδυασμού  $\theta$  (recombination fraction  $\theta$ ): Ας θεωρήσουμε 2 γενετικές θέσεις, A και B, με 2 ισοεπικρατή αλληλόμορφα A1, A2 και B1, B2 αντίστοιχα. Οι παραγόμενοι γαμέτες είναι τεσσάρων τύπων:

A1B1

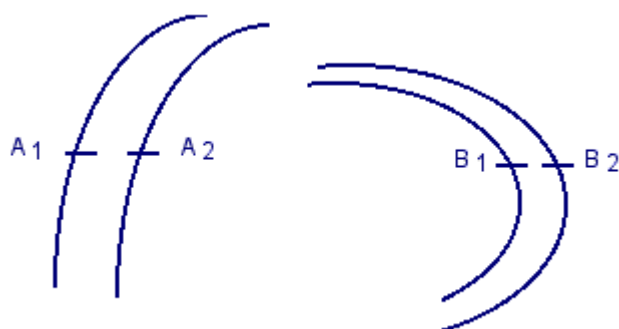
A2B1

A1B2

A2B2

Οι πιθανές περιπτώσεις είναι 3:

1) οι γενετικοί τόποι βρίσκονται σε διαφορετικά ζεύγη χρωμοσωμάτων - ανεξάρτητη κληρονομιά (Εικόνα 4).

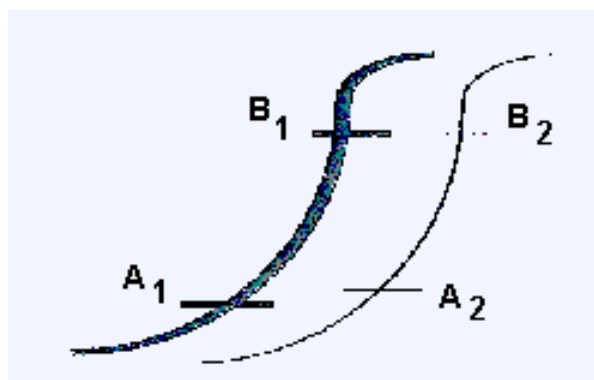


*Εικόνα 4: Ανεξάρτητη κληρονόμηση*

Στην περίπτωση αυτή κάθε γαμέτης έχει την ίδια πιθανότητα να εμφανιστεί:  $\frac{1}{4}$ .

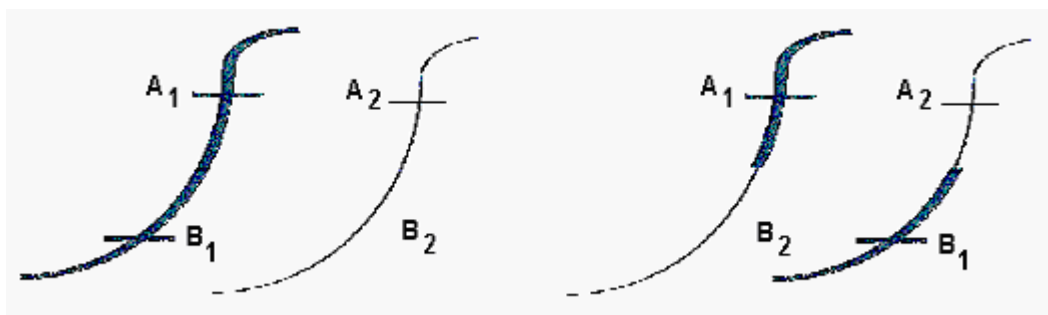
2) οι γενετικοί τόποι εμφανίζουν γενετική σύνδεση μεταξύ τους, δηλ. βρίσκονται στο ίδιο χρωμόσωμα σε πολύ μικρή απόσταση μεταξύ τους. Τότε μεταβιβάζονται μαζί σαν μία γενετική θέση και προκύπτουν μόνο 2 γαμέτες που είναι ίδιοι με τους γονεϊκούς.

3) Οι γενετικοί τόποι βρίσκονται στο ίδιο ζεύγος χρωμοσωμάτων, αλλά σε απόσταση τέτοια που υπάρχει η πιθανότητα επιχiasμού (εικόνα 5)



*Εικόνα 5: Οι γενετικοί τόποι βρίσκονται στα ίδια χρωμοσώματα*

4 τύποι γαμετών είναι δυνατό να παραχθούν:



*Εικόνα 6: Γαμέτες -Γονεϊκοί (μη ανασυνδυασμένοι)- Ανασυνδυασμένοι*



Στην περίπτωση των ανασυνδυασμένων γαμετών, ένα ή περισσότερα φαινόμενα διασκελισμού έχουν επισυμβεί μεταξύ των γενετικών τόπων A και B.

Το κλάσμα των ανασυνδυασμένων γαμετών προς το σύνολο των γαμετών που μεταβιβάζονται καλείται κλάσμα ανασυνδυασμού  $\theta$  (recombination fraction  $\theta$ ).

**$\theta = \text{αριθμός ανασυνδυασμένων γαμετών} / \text{αριθμός γαμετών που μεταβιβάζονται}$**

Το κλάσμα ανασυνδυασμού παίρνει διαφορετικές τιμές, αναλόγως του βαθμού σύνδεσης δύο γενετικών θέσεων. Οι τιμές του  $\theta$  στις παραπάνω 3 περιπτώσεις είναι:

1) οι γενετικοί τόποι βρίσκονται σε διαφορετικά ζεύγη χρωμοσωμάτων - ανεξάρτητη κληρονομηση (εικ.2)

$$\theta = 1/2 \text{ ή } \theta = 50\%$$

2) οι γενετικοί τόποι εμφανίζουν γενετική σύνδεση μεταξύ τους

$$\theta = 0$$

3) Οι γενετικοί τόποι βρίσκονται στο ίδιο ζεύγος χρωμοσωμάτων, αλλά σε απόσταση τέτοια που υπάρχει η πιθανότητα επιχiasμού

$$0 < \theta < 1/2$$

**Lod score:** Ας θεωρήσουμε δύο γενετικούς τόπους A και B και επιθυμούμε να καθορίσουμε το εάν οι δύο τόποι συνδέονται. Θα χρειαστούμε 2 πληροφορίες. Πρώτον, θα καθορίσουμε την τιμή του κλάσματος ανασυνδυασμού  $\theta$ , ελέγχοντας αν η τιμή διαφέρει σημαντικά από την τιμή 0,5 που αναμένουμε για μη συνδεδεμένους τόπους. Δεύτερον, θα πρέπει να καθορίσουμε εάν η απόκλιση από την τιμή 0,5, που βρήκαμε, είναι στατιστικώς σημαντική. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιούμε μια στατιστική δοκιμασία καλούμενη λόγος αναλογιών των πιθανοτήτων (likelihood odds ratio).

Εξετάζοντας δεδομένα σε μελέτες οικογενειών, υπολογίζουμε τον αριθμό των τέκνων που εμφανίζουν ή δεν εμφανίζουν ανασυνδυασμό των γενετικών τόπων και υπολογίζουμε την πιθανότητα παρατήρησης των δεδομένων σε διάφορες πιθανές τιμές του  $\theta$  κυμαινόμενες από 0 (μη ανασυνδυασμός) έως  $1/2$  (απουσία σύνδεσης). Παίρνουμε το λόγο των δύο πιθανοτήτων για να υπολογίσουμε την πιθανότητα (likelihood) ότι οι δύο τόποι συνδέονται με ορισμένο κλάσμα ανασυνδυασμού  $\theta$  [  $L(\theta)$  ] σε σύγκριση με την κατάσταση στην οποία δεν υπάρχει σύνδεση [  $L(1/2)$  ]. Η πιθανότητα ύπαρξης σύνδεσης για μια τιμή  $\theta$  δίνεται από τον τύπο:  $L(\theta) / L(1/2)$ .

Στην πράξη χρησιμοποιείται ο δεκαδικός λογάριθμος του παραπάνω κλάσματος που αποκαλείται **lod score (logarithm of odds)** ή  $z(\theta)$

$$Z(\theta) = \log_{10} [L(\theta)/L(1/2)]$$

Το lod score μας δίνει το λόγο πιθανοτήτων δύο υποθέσεων  $H_1/H_0$ , όπου

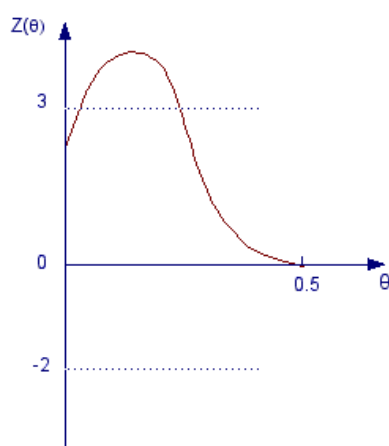
$H_1$ : γενετική σύνδεση δύο θέσεων όπου  $0 < \theta < 1/2$

$H_0$ : ανεξάρτητη κληρονομηση, μη σύνδεση δύο θέσεων ( $\theta=0$ )

Θετικές τιμές του  $z$  είναι ενδεικτικές σύνδεσης ενώ αρνητικές τιμές υποδηλώνουν ότι η σύνδεση είναι λιγότερο πιθανή (για τη δεδομένη τιμή  $\theta$ ) από την πιθανότητα μη σύνδεσης των δύο τόπων.

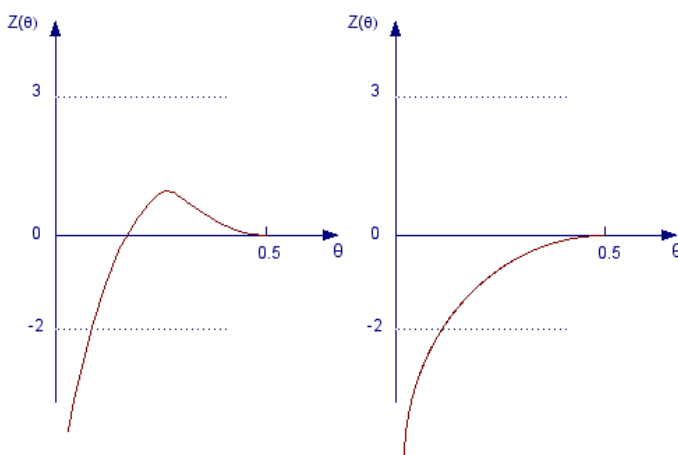
Συμβατικά, έχουμε αποδεχτεί τις παρακάτω τρεις περιπτώσεις με τις αντίστοιχες τυπικές γραφικές παραστάσεις:

1. Αν  $z(\theta) \geq 3$ , τότε έχουμε σύνδεση, γιατί η υπόθεση  $H_1$  είναι 1000 φορές πιο πιθανή από την υπόθεση  $H_0$ . (Γράφημα 1)<sup>5</sup>



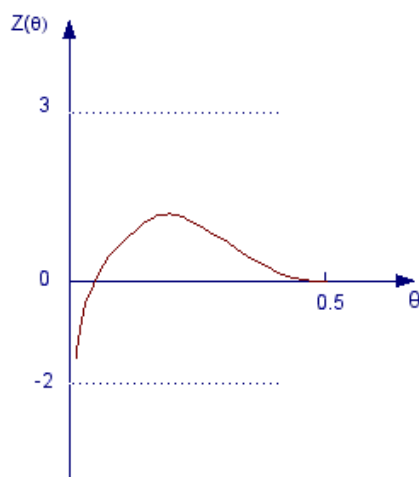
Γράφημα 1:  $z(\theta) \geq 3$

2. Αν  $z(\theta) \leq -2$ , η σύνδεση απορρίπτεται. (Γράφημα 2)<sup>5</sup>



Γράφημα 2:  $z(\theta) \leq -2$

Αν  $-2 < z(\theta) < 3$ , η σύνδεση θεωρείται πιθανή αλλά απαιτείται η περαιτέρω συλλογή και ανάλυση δεδομένων ( Γράφημα 3)<sup>5</sup>



Γράφημα 3:  $-2 < z(\theta) < 3$

Επειδή στην ανάλυση σύνδεσης χρησιμοποιούμε δεδομένα από πολλές οικογένειες, το lod score για πολλές οικογένειες στις οποίες μελετάται η πιθανή γενετική σύνδεση 2 θέσεων A και B, θα είναι το άθροισμα των lod scores για κάθε οικογένεια.

Γενετικοί δείκτες (genetic markers): Είδαμε ότι στην ανάλυση σύνδεσης εκτιμάται η πιθανότητα ανασυνδυασμού κάποιων γενετικών θέσεων στα ομόλογα χρωμοσώματα. Είναι προφανές ότι για να διεξαχθεί μια τέτοιου είδους μελέτη, θα πρέπει οι γενετικές θέσεις να είναι πολυμορφικές, δηλαδή να εμφανίζουν 2 ή

περισσότερα αλληλόμορφα με ικανή συχνότητα. Η διάκριση λοιπόν των ομολόγων χρωμοσωμάτων βασίζεται στη χρησιμοποίηση **γενετικών δεικτών**, οι οποίοι ορίζονται ως κάθε χαρακτηριστικό ενός ομολόγου χρωμοσώματος που επιτρέπει τη διάκρισή του από το άλλο ομόλογο χρωμόσωμα. Στο παρελθόν χρησιμοποιήθηκαν γονίδια που κωδικοποιούσαν αντιγόνα επιφανείας ή πρωτείνες με διαφορετικό ηλεκτροφορητικό προφίλ. Οι σύγχρονοι γενετικοί δείκτες είναι είτε μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί (single nucleotide polymorphisms – SNPs) είτε πολυμορφισμοί δι-, τρι- και τετρα-νουκλεοτιδίων που έχουν βρεθεί σε αφθονία στο ανθρώπινο γονιδίωμα (βραχείες αξονικές επαναλήψεις – short tandem repeats – STRs) (*Green et al., 1989; Weissenbach, 1993; Todd & Farrall, 1996*). Οι SNPs αποτελούν συχνά χρησιμοποιούμενους δείκτες και κατανέμονται ομοιόμορφα σε ολόκληρο το γονιδίωμα (1 πολυμορφισμός ανά 1000 – 2000 νουκλεοτίδια). Συνήθως διαθέτουν 2 αλληλόμορφα που αντιστοιχούν σε 2 διαφορετικές βάσεις να είναι δυνατό να καταλαμβάνουν μία συγκεκριμένη θέση. Πάνω από  $12 \times 10^6$  SNPs έχουν ανακαλυφθεί και καταχωρηθεί στις βάσεις δεδομένων του Human Genome Project.

Οι βραχείες αξονικές επαναλήψεις ή μικροδορυφορικοί δείκτες (microsatellite markers) αποτελούν επαναλήψεις δι-, τρι- και τετρα-νουκλεοτιδίων. Ο αριθμός αυτών των επαναλήψεων ποικίλλει μεταξύ δύο ομολόγων χρωμοσωμάτων και καθιστά τους μικροδορυφορικούς δείκτες ιδιαίτερα χρήσιμους για μελέτες ανάλυσης σύνδεσης. Πρώτον, η ύπαρξη πολλών αλληλίων (δηλ. πολλών μεγεθών επαναλήψεων) σε ένα πληθυσμό, αυξάνει την πιθανότητα ετεροζυγωτίας για κάθε άτομο σε ποσοστό μεγαλύτερο του 70%. Δεύτερον, είναι εύκολη η γονοτύπωση και η δημιουργία τους με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης. Τέλος, δεκάδες χιλιάδων τετοιων δεικτών έχουν προσδιοριστεί σε όλο το μήκος του ανθρώπινου γονιδιώματος, καθιστώντας όλες τις περιοχές του ικανές για μελέτη με ανάλυση σύνδεσης (*Green et al., 1989; Weissenbach, 1993; Todd & Farrall, 1996*).

Γενετική απόσταση: Η γενετική απόσταση προκύπτει από τις μελέτες ανάλυσης σύνδεσης ως εξής: Η μέτρηση της γενετικής απόστασης γίνεται σε μονάδες που καλούνται centiMorgans (cM). Ως cM ορίζεται το γενετικό μήκος στο οποίο κατά μέσον όρο παρατηρείται ανασυνδυασμός στο 1% των περιπτώσεων (*Green et al., 1989*).

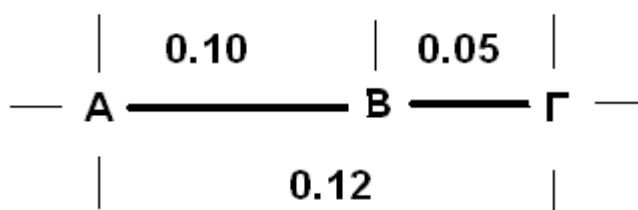
Ας θεωρήσουμε το παράδειγμα δύο γενετικών τόπων και έστω ότι σε μια σειρά μελετών βρέθηκε ότι το 80% των απογόνων είναι μη ανασυνδυασμένοι ενώ το 20%

είναι ανασυνδυασμένοι. Το κλάσμα ανασυνδυασμού  $\theta$  είναι 20%. Μεταφράζοντας αυτή την τιμή  $\theta$  σε γενετική απόσταση, δεχόμαστε ότι οι 2 γενετικοί τόποι βρίσκονται σε απόσταση περίπου 20 cM.

Το συνολικό μήκος των 23 χρωμοσωμάτων στο απλοειδές ανθρώπινο γονιδίωμα υπολογίστηκε στα 3000 cM περίπου και η μέτρηση βασίστηκε στον παρατηρούμενο αριθμό χιασμάτων που συμβαίνουν στη μείωση Ι στην σπερματογένεση. Μια πιο πρόσφατη και ακριβής μέτρηση υπολόγισε συνολικό μήκος 4300 cM, βασισμένη σε σύγχρονα δεδομένα χαρτογράφησης των χιλιάδων γενετικών δεικτών. Η αντιστοίχιση του γενετικού μήκους 4300 cM στο φυσικό μήκος του ανθρώπινου γονιδιώματος των  $3 \times 10^9$  bp είναι: 1 cM μεταφράζεται χονδρικά σε 700.000 bp.

Χρησιμοποιώντας πολλές γενετικές θέσεις μπορούμε να φτιάξουμε τον γενετικό χάρτη ή χάρτη σύνδεσης (linkage map), ο οποίος είναι μια υποθετική οντότητα που προκύπτει από τη συχνότητα των απογόνων που βρίσκουμε ότι παράγονται από ανασυνδυασμό  $\theta$  μεταξύ 2 ή παραπάνω γενετικών θέσεων του ίδιου χρωμοσώματος (*Green et al., 1989; Weissenbach, 1993; Todd & Farrall, 1996*).

Γενετικοί Χάρτες ή Χάρτες Σύνδεσης – Genetic Linkage Maps: Οι γενετικοί χάρτες δημιουργήθηκαν συνδυάζοντας μετρήσεις γενετικής απόστασης γειτονικών γενετικών τόπων ανά δύο. Ας θεωρήσουμε δυο τόπους A και B σε απόσταση 10 cM. Αρχίζουμε την κατασκευή του χάρτη με το πρώτο αυτό δεδομένο. Ένας τρίτος τόπος Γ συνδέεται με τον τόπο A με  $Z_{\max}$  για  $\theta=0,12$  και με τον τόπο B με  $Z_{\max}$  για  $\theta=0,05$ . Με αυτά τα δεδομένα, η πιθανότερη σειρά των παραπάνω θα ήταν η απεικονιζόμενη στην εικόνα 7: <sup>1</sup>



Εικόνα 7: Υποθετικός γενετικός χάρτης των τόπων A, B και Γ.

Σημειωτέον ότι η απόσταση A-Γ είναι μικρότερη του αθροίσματος των αποστάσεων A-B και B-Γ. Η διαφορά οφείλεται σε γεγονότα διπλού επιχiasμού (ένας επιχiasμός στο διάστημα A-B και ένας στο B-Γ), με αποτέλεσμα να μην συμβαίνει ανασυνδυασμός μεταξύ των A και Γ, οδηγώντας σε υποεκτίμηση της μεταξύ τους απόστασης.

Μια άλλη προσέγγιση για την κατασκευή γενετικών χαρτών είναι η πολυσημειακή ανάλυση σύνδεσης (Multipoint Linkage Analysis), κατά την οποία όλα τα δεδομένα αναλύονται ταυτόχρονα (*Green et al., 1989; Weissenbach, 1993; Todd & Farrall, 1996*). Η αρχή της βασίζεται στο να καθορίσει τη σειρά των τόπων χρησιμοποιώντας τον ελάχιστο αριθμό πολλαπλών επιχiasμών. Με τη μέθοδο αυτή κατέστη δυνατή η κατασκευή των λεπτομερειακών γενετικών χαρτών ολόκληρου του γονιδιώματος. Χρησιμοποιώντας μια μεγάλη δεξαμενή με οικογενειακό υλικό τριών γενεών, κατέστη δυνατός ο υπολογισμός της συχνότητας ανασυνδυασμού των χιλιάδων πληροφοριακών μικροδορυφορικών δεικτών. Οι πληροφορίες για το είδος, την αλληλουχία και τη θέση κάθε πολυμορφικού δείκτη είναι εύκολα προσβάσιμες σε βάσεις δεδομένων του διαδικτύου. Στην ιστοσελίδα της Human Genome Data Bank [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview>], στη βάση δεδομένων STS υπάρχουν καταχωρημένοι χιλιάδες πολυμορφικοί, μικροδορυφορικοί δείκτες και με ένα φιλικό προς το χρήστη λογισμικό είναι δυνατή η απεικόνιση της εντόπισης των δεικτών πάνω σε λεπτομερειακούς χάρτες των χρωμοσωμάτων. Στη βάση δεδομένων STS υπάρχουν συγκεντρωμένα στοιχεία από άλλες μικρότερες βάσεις δεδομένων, όπως η Marshfield και η Genethon. Η βάση δεδομένων Marshfield [<http://research.marshfieldclinic.org/genetics/>] χρησιμοποιείται ευρέως σε μελέτες ανάλυσης σύνδεσης. Περιλαμβάνει περισσότερους από 8.000 μικροδορυφορικούς δείκτες, κατανεμημένους σε μια γενετική απόσταση περίπου 3.500 cM. Με την διατειθέμενη μηχανή αναζήτησης της βάσης αυτής, είναι δυνατή η ακριβής εντόπιση του δείκτη που μας ενδιαφέρει, λαμβάνοντας υπόψη και το φύλο του δείγματος (άρρεν, θήλυ ή μέσος όρος).

#### Σαρώσεις ευρείας γονιδιωματικής σύνδεσης (Genome-wide linkage scans)

Η κλασική ανάλυση σύνδεσης που περιγράψαμε μέχρι στιγμής αποτελεί μια σημαντική μεθοδολογία για την χαρτογράφηση μονογονιδιακών νοσημάτων αλλά είναι ουσιαστικά ανεφάρμοστη στα πολυπαραγοντικά νοσήματα. Η μεθοδολογία που περιγράψαμε αποκαλείται παραμετρική ανάλυση σύνδεσης διότι βασίζεται στην

υπόθεση ότι ένας συγκεκριμένος τύπος κληρονομικότητας (π.χ. αυτοσωματική επικρατητική, φυλοσύνδετη κτλ.) ερμηνεύει το πρότυπο κληρονομικότητας των ανασυνδυασμένων και μη απογόνων που παρατηρούμε.

Για την χαρτογράφηση των πολυπαραγοντικών νοσημάτων, τα οποία από τη φύση τους δεν οφείλονται σε μονογονιδιακές μεταλλάξεις ούτε κληρονομούνται με μεντελιανή κληρονομικότητα, έχουν αναπτυχθεί **μη παραμετρικές** μέθοδοι. Με τις μεθόδους αυτές δε γίνεται καμία υπόθεση όσον αφορά τον αριθμό των γενετικών τόπων ή το ρόλο του περιβάλλοντος στην παθογένεια του νοσήματος. Αντιθέτως, βασίζονται στην υπόθεση ότι 2 προσβεβλημένοι συγγενείς θα έχουν κοινά προδιαθεσικά αλληλία (*Todd & Farrall, 1996*).

Μια συχνά χρησιμοποιούμενη μη παραμετρική μέθοδος είναι η μέθοδος των προσβεβλημένων ζευγών-αδελφών (affected sibpair method). Αναλύεται το γονιδίωμα αδελφών που εκδηλώνουν το νόσημα και αναζητείται η ύπαρξη γενετικών τόπων στους οποίους υπάρχουν αλληλία με συχνότητα μεγαλύτερη του 50% που αναμένεται με βάση την τυχαιότητα. Αν ένας γενετικός τόπος είναι σημαντικός για ένα πολυπαραγοντικό νόσημα, η ύπαρξη κοινών αλληλίων στα προσβεβλημένα άτομα θα είναι μεγαλύτερη της αναμενόμενης 50%. Η αξιολόγηση της ανευρισκόμενης απόκλισης από το 50% γίνεται με τη στατιστική δοκιμασία του μέγιστου λόγου των αναλογιών (maximum likelihood odds ratio), όπως ακριβώς στην παραμετρική ανάλυση σύνδεσης το lod score αξιολογεί τη σημαντικότητα της απόκλισης της συχνότητας ανασυνδυασμού από το 50%.

Στη μέθοδο των προσβεβλημένων αδελφών, το DNA τους αναλύεται με τη μεθοδολογία των **σαρώσεων ευρείας γονιδιωματικής σύνδεσης (ΣΕΓΣ) (Todd & Farrall, 1996)**. Το DNA αναλύεται με τη χρήση εκατοντάδων πολυμορφικών δεικτών που διασπείρονται σε όλο το μήκος του γονιδιώματος προς αναζήτηση κοινών περιοχών μεταξύ των αδελφών σε συχνότητα μεγαλύτερη από την αναμενόμενη με βάση την τυχαιότητα. Η ανεύρεση υψηλής συχνότητας κοινών αλληλίων στη θέση ενός πολυμορφικού δείκτη υποδηλώνει ότι ένας γενετικός τόπος σχετιζόμενος με το νόσημα εντοπίζεται πλησίον του δείκτη (*Kruglyak, 1997; Ardlie et al., 2002*).

Θα πρέπει, όμως, να λάβουμε υπ' όψιν ότι όσο πιο πολυμορφικοί είναι οι γενετικοί τόποι που μελετάμε τόσο η υψηλότερη συχνότητα κοινών αλληλίων που θα προκύπτει τυχαία θα δείχνει στατιστικώς σημαντική. Για παράδειγμα, ενώ είναι αρκετά απίθανο το ρίξιμο ενός νομίσματος 5 φορές να αποφέρει 5 φορές «γράμματα», είναι αρκετά πιθανό όταν ρίξουμε το νόμισμα εκατοντάδες φορές να

πάρουμε κάποια στιγμή 5 φορές «γράμματα» στη σειρά. Τα επίπεδα σημαντικότητας με τα αντίστοιχα lod scores για υψηλή συχνότητα κοινών αλληλίων σε μία γονιδιωματική αναζήτηση που χρησιμοποιεί 400 πολυμορφικούς γενετικούς δείκτες, θεωρούνται ότι μειώνουν σημαντικά τον κίνδυνο της απόδοσης σημαντικότητας σε τυχαίες αποκλίσεις από τα αναμενόμενα αποτελέσματα. Το όριο των 400 δεικτών είναι απότοκο του ορίου των 10 cM που χρησιμοποιείται στην κλασική ανάλυση σύνδεσης. Στην γενετική πρακτική, μπορούμε να ελπίζουμε ότι θα βρούμε σύνδεση δύο τόπων που βρίσκονται σε απόσταση μέχρι 10 cM, διότι για μεγαλύτερες αποστάσεις συνήθως δεν ανευρίσκεται επαρκές οικογενειακό υλικό για απόδειξη σύνδεσης (δηλ. lod score  $> 3$ ). Με άλλα λόγια, ένας πολυμορφικός δείκτης θα πρέπει να βρίσκεται εντός 7.5 εκατομμυρίων bp από το υπό μελέτη γονίδιο ώστε να ανευρεθεί σύνδεση μεταξύ τους. Καθώς 7.5 εκατομμύρια bp αντιστοιχούν στο 1/400 του γονιδιώματος, 400 ή περισσότεροι καλά κατανομημένοι δείκτες θεωρείται ότι θα αναδείξουν τα υπεύθυνα γονίδια στα αυτοσωματικά χρωματοσώματα. (Για το X χρωμόσωμα θεωρείται ότι επαρκούν άλλοι 15-20 δείκτες). Με αυτές τις προϋποθέσεις, η ανεύρεση σε μια γονιδιωματική αναζήτηση lod score  $> 3,6$  για κοινό αλληλίο σε ένα γενετικό τόπο, θα μπορούσε να συμβεί τυχαία μόνο σε μία στις 20 περιπτώσεις (*Kruglyak, 1997; Ardlie et al., 2002*).

Το βασικό μειονέκτημα, όμως, των μη παραμετρικών μεθόδων είναι η έλλειψη ευασθησίας και ακρίβειας. Η έλλειψη ευαισθησίας αντανακλάται από το γεγονός ότι μεγάλοι αριθμοί αδελφών (sibpairs) απαιτούνται για την ανεύρεση σημαντικής απόκλισης από την αναμενόμενη 50% κοινή ύπαρξη αλληλίων. Στην πράξη, οι γονιδιωματικές αναζητήσεις δεν είναι πιθανό να προσδιορίσουν γενετικούς τόπους στους οποίους λίγα σπάνια αλληλόμορφα συμβάλλουν σε μικρό βαθμό σε ένα νόσημα. Η ανακρίβεια των μεθόδων προκύπτει από το γεγονός ότι δεν είναι δυνατό να καθοριστεί εάν έχει συμβεί ανασυνδυασμός μεταξύ του προδιαθεσικού προς το νόσημα γενετικού τόπου και του φαινοτύπου του νοσήματος. Οι μη παραμετρικοί μέθοδοι προσδιορίζουν ευρείες περιοχές με κοινά αλληλία και όχι μια μικρή, κριτική περιοχή που περιλαμβάνει ένα γονίδιο που συμβάλλει στο νόσημα (*Rice et al., 2000; Slatkin, 2008*).

### **Μεθοδολογία μετα-ανάλυσης σαρώσεων ευρείας γονιδιωματικής σύνδεσης**

Οι μελέτες γονιδιωματικής αναζήτησης παρέχουν χρήσιμες πληροφορίες για συγκεκριμένους γενετικούς τόπους, οι οποίοι είναι δυνατό να συνδέονται με



συγκεκριμένα πολυπαραγοντικά νοσήματα ή ποσοτικά κληρονομικά γνωρίσματα. Ωστόσο, στις περισσότερες περιπτώσεις, τα «σήματα» σύνδεσης τείνουν να είναι πολύ χαμηλά, δεδομένου ότι οι περισσότεροι γενετικοί παράγοντες κινδύνου έχουν ήπιες επιδράσεις στον φαινότυπο. Επιπλέον, οι γονιδιωματικές αναζητήσεις που λαμβάνουν χώρα από διαφορετικές ομάδες συχνά ανιχνεύουν σύνδεση σε διαφορετικές χρωμοσωμικές περιοχές (*Zintzaras & Ioannidis, 2005b*).

Σε μια προσπάθεια να δημιουργηθούν πιο συμπερασματικά αποτελέσματα, πολλοί ερευνητές έχουν προτείνει διάφορες μεθόδους μετα-ανάλυσης των δεδομένων που προκύπτουν από τις ΣΕΓΣ. Η Genome Search Meta-analysis (GSMA) αποτελεί την πιο καθιερωμένη από αυτές τις μεθόδους και έχει ήδη εφαρμοστεί σε ΣΕΓΣ πολλών νοσημάτων. Παρολαυτά, η GSMA εστιάζει στην παροχή αθροιστικών υπολογισμών ενώ δεν παρέχει καθόλου πληροφορίες σχετικά με την ετερογένεια που πιθανό υπάρχει μεταξύ των διαφόρων μελετών.

Στις εφαρμογές μετα-αναλύσεων σε άλλα βιοϊατρικά πεδία, έχει υποστηριχθεί ότι η ποσοτικοποίηση και επεξήγηση της παρατηρηθείσας ετερογένειας μεταξύ των μελετών είναι πιθανώς πιο σημαντική από την απλή παροχή αθροιστικών υπολογισμών με συνδυασμό των δεδομένων (*Trikalinos et al., 2008; Zintzaras & Ioannidis, 2005b; Zintzaras et al., 2006a; Zintzaras & Ioannidis, 2008; Zintzaras & Lau, 2008b*). Αυτό είναι πιθανώς πιο σημαντικό στο πεδίο της γενετικής, όπου αφενός οι μελέτες συχνά δίδουν αντικρουόμενα αποτελέσματα και αφετέρου επιδημιολογικά ευρήματα είναι δυνατό να μην επιβεβαιώνονται σε γενετικές μελέτες. Ιδιαίτερα οι γονιδιωματικές σαρώσεις μπορεί να διαφέρουν σημαντικά στον σχεδιασμό και την διεξαγωγή τους ή να αναδεικνύουν σημαντικές διαφορές στους μελετώμενους πληθυσμούς. Συνεπώς, η έννοια της ετερογένειας μεταξύ των μελετών μπορεί να εισαχθεί, καθώς η έκταση της ετερογένειας είναι δυνατό να επηρεάσει τα συμπεράσματα μιας GSMA. Ένας γενετικός τόπος στατιστικός σημαντικός, με σταθερά σημαντικά αποτελέσματα στις διάφορες μελέτες, θα πρέπει να ερμηνευθεί διαφορετικά από έναν τόπο με διακύμανση των τιμών σύνδεσης του στις διάφορες μελέτες. Είναι επομένως σημαντικό να ποσοτικοποιείται η ετερογένεια μεταξύ των γονιδιωματικών αναζητήσεων.

Για τον λόγο αυτό, προτάθηκε το 2005 από τους Zintzaras and Ioannidis η εφαρμογή της μεθόδου HEGESMA (*Zintzaras & Ioannidis, 2005b; Zintzaras & Ioannidis, 2005a*), η οποία αποτελεί μετεξέλιξη της GSMA αλλά επιπλέον εισάγει στατιστικές δοκιμασίες για την εκτίμηση της ετερογένειας. Προκειμένου να γίνει

κατανοητή η εφαρμογή της HEGESMA, θα παρουσιαστούν συνοπτικά οι στατιστικές δοκιμασίες της.

#### A. Το υπόβαθρο της GSMA.

Στην τυπική GSMA, τα χρωματοσώματα χωρίζονται σε τμήματα (bins), περίπου ίσου μήκους. Κάθε bin έχει μήκος (γενετικής απόστασης) περίπου 30 centiMorgan (cM) ώστε το σύνολο του γονιδιώματος να αποτελείται από 120 bins (*Zintzaras et al., 2006a; Zintzaras & Kitsios, 2006; Zintzaras et al., 2007*). Για κάθε γονιδωματική αναζήτηση, καταγράφεται το πιο σημαντικό αποτέλεσμα στις στατιστικές δοκιμασίες που προκύπτει σε ένα bin. Οι στατιστικές δοκιμασίες μπορεί να περιλαμβάνουν το lod score, τον μέγιστο λογάριθμο του βαθμού πιθανοτήτων (MLS), τον μη παραμετρικό βαθμό σύνδεσης (NLP), στατιστική του z και τιμές του P, ανάλογα με τον τρόπο ανάλυσης των δεδομένων σύνδεσης. Στη συνέχεια, κάθε αναζήτηση των bin βαθμολογείται ανάλογα με τη σημαντικότητα των αποτελεσμάτων (η τιμή 120 δίνεται στον υψηλότερο βαθμό σύνδεσης) και οι βαθμολογίες (ranks) για κάθε bin αθροίζονται σε όλες τις γονιδωματικές αναζητήσεις.

Η σημαντικότητα της αθροισμένης βαθμολογίας για κάθε bin εκτιμάται εμπειρικά έναντι της κατανομής των αθροισμένων βαθμολογιών, κάτω από τη μηδενική υπόθεση ότι δεν περιλαμβάνονται σχετιζόμενοι γενετικοί τόποι σε κανένα bin και ότι οι βαθμοί αποδίδονται τυχαία. Όταν ένα bin έχει μια υψηλή αθροισμένη βαθμολογία, αυτό θεωρείται ως στοιχείο για σύνδεση στις διάφορες μελέτες. Ίσες τιμές στατιστικών αποτελεσμάτων σε μία μελέτη αναφέρονται ως tied ranks.

#### B. Στατιστικές δοκιμασίες για την μέτρηση της ετερογένειας

Η έκταση της ετερογένειας μεταξύ των μελετών είναι δυνατό να εκτιμηθεί με τρεις στατιστικές δοκιμασίες:

- Το στατιστικό Q ορίζεται ως το άθροισμα των αποστάσεων των τετραγώνων των αποκλίσεων των βαθμολογιών κάθε bin από την μέση βαθμολογία και παριστά μια γενίκευση του στατιστικού Q του Cochran.

$$Q = \sum_{i=1}^s w_i (R_i - R)^2$$

Όπου  $R_i$  είναι η βαθμολογία του υπό εξέταση bin στην μελέτη  $i$ ,  $R$  είναι η μέση βαθμολογία στις διαθέσιμες μελέτες και  $w_i$  είναι ο παράγων βαρύτητας για τη μελέτη  $i$ .

- Το στατιστικό  $H_a$  ορίζεται ως το άθροισμα των απόλυτων διαφορών κάθε βαθμολογίας από τη μέση βαθμολογία:

$$H_a = \sum_{i=1}^s w_i (|R_i - R|)$$

- Το στατιστικό  $B$  ορίζεται ως οι ακραίες απόλυτες διαφορές μεταξύ των μελετών:

$$B = \sum_{i,j=1}^s w_i w_j (|R_i - R_j|)$$

Όπου  $i, j=1$  σε  $s$  μελέτες και  $i \neq j$ . Το στατιστικό  $B$  λαμβάνει υπόψιν όλες τις πιθανές διαφορές των bin κατά ζεύγη.

Για την μέθοδο GSMA είναι σημαντικό να γνωρίζουμε αν η ετερογένεια μεταξύ των μελετών είναι πολύ υψηλή ή πολύ χαμηλή. Στατιστικώς σημαντική υψηλή ετερογένεια υποδηλώνει ότι τα αποτελέσματα των διαφόρων μελετών για το ίδιο bin διαφέρουν όχι μόνο τυχαία και αυτή η διαφορά θα πρέπει να διερευνηθεί περαιτέρω. Στατιστικώς σημαντική χαμηλή ετερογένεια υποδηλώνει ότι τα αποτελέσματα των διαφόρων μελετών είναι πολύ σταθερά για το ίδιο bin. Όταν αυτό παρατηρείται για ένα bin με την υψηλότερη βαθμολογία στις μελέτες, η χαμηλή ετερογένεια ερμηνεύεται ως ένα επιπλέον υποστηρικτικό στοιχείο της σημαντικότητας σύνδεσης αυτού του bin.

#### Γ. Σταθμισμένη και μη σταθμισμένη ανάλυση

Στο πλαίσιο εργασίας της GSMA, οι βαθμολογίες των bin κάθε μελέτης μπορούν να σταθμιστούν με παράγοντες, όπως ο αριθμός των οικογενειών, ο αριθμός των πολυμορφικών δεικτών ή το μέγεθος των οικογενειών που χρησιμοποιήθηκαν. Στις σταθμισμένες αναλύσεις, οι δοκιμασίες  $Q$  και  $H_a$  μπορούν εύκολα να υπολογιστούν σταθμίζοντας στο τετράγωνο ή στις απόλυτες διαφορές της βαρύτητας κάθε μελέτης. Για την δοκιμασία  $B$ , οι μεταξύ των μελετών διαφορές βαθμολογίας σταθμίζονται από το προϊόν της στάθμισης των μελετών που συμπεριλαμβάνονται στην ανάλυση.

#### Δ. Δοκιμασία αντιμετάθεσης MONTE CARLO

Προκειμένου να αξιολογηθεί η στατιστική σημαντικότητα των δοκιμασιών, χρησιμοποιείται η μέθοδος Monte Carlo. Στη μέθοδο αυτή, αντιμετατίθενται τυχαία οι βαθμολογίες κάθε μελέτης και υπολογίζονται οι εξομοιωμένες μετρήσεις. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται για 50.000 κύκλους και κατασκευάζεται μια μηδενική

κατανομή των μετρήσεων. Η στατιστική σημαντικότητα για υψηλή ετερογένεια ορίζεται ως το ποσοστό των εξομοιωμένων μετρήσεων που υπερβαίνουν τις παρατηρηθείσες μετρήσεις ενώ το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας για χαμηλή ετερογένεια είναι το ποσοστό των εξομοιωμένων μετρήσεων που είναι μικρότερο από τις παρατηρηθείσες μετρήσεις. Η δοκιμασία Monte Carlo μπορεί επίσης να διεξαχθεί με τη δημιουργία μηδενικών κατανομών ξεχωριστά για κάθε bin, λαμβάνοντας υπόψη τις εξομοιωμένες κατανομές για τις μετρήσεις ετερογένειας των bins με τις ίδιες ή παραπλήσιες τιμές εξομοιωμένης μέσης βαθμολογίας ( $\pm 2$ ), σε σχέση με το bin που εξετάζεται κάθε στιγμή.

#### Λογισμικό για την HEGESMA

Για την αξιολόγηση της σημαντικότητας των μέσων βαθμολογιών και της ετερογένειας, έχει αναπτυχθεί ένα πρόγραμμα ηλεκτρονικών υπολογιστών σε γλώσσα Compaq Visual Fortran Professional Edition 6.6.0 και περιβάλλον DOS.<sup>25</sup> Κατά την ανάπτυξη του προγράμματος, χρησιμοποιήθηκε η βιβλιοθήκη IMSL. Μια εκτελέσιμη μορφή του αρχείου είναι προσβάσιμη στην ιστοσελίδα του εργαστηρίου Βιομαθηματικών του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας (<http://biomath.med.uth.gr>).

Το πρόγραμμα έχει σχεδιαστεί για χρήση από βιοστατιστικούς ή άλλους ερευνητές που επιθυμούν να διεξάγουν μια HEGESMA. Η εισαγωγή των δεδομένων γίνεται με την μορφή αρχείου ASCII, που δημιουργείται από τον χρήστη, το οποίο περιλαμβάνει τις βαθμολογίες των bins κάθε μελέτης. Οι σταθμίσεις της μελέτης εισάγονται μέσω ενός διαφορετικού αρχείου ASCII. Τα αρχεία δεδομένων και σταθμίσεων αποθηκεύονται στον ίδιο φάκελο με το αρχείο της HEGESMA και προσδιορίζονται ως xxx.dat and weights.dat, αντίστοιχα.

Κατά την εκτέλεση του προγράμματος, τίθενται μια σειρά ερωτήσεων για την εισαγωγή των απαραίτητων παραμέτρων: (1) ο αριθμός των μελετών που συμπεριλαμβάνονται στην GSMA (μέχρι 20 μελέτες), (2) ο αριθμός των bins που χρησιμοποιήθηκαν (μέχρι 130), (3) ο αριθμός των Monte Carlo αντιμεταθέσεων που καθορίζουν τα επίπεδα σημαντικότητας για τις μέσες βαθμολογίες και τις μετρήσεις ετερογένειας (μέχρι 50.000), (4) ο τύπος της ανάλυσης που επιθυμούνται διεξαχθεί (σταθμισμένη ή μη). Για ένα δεδομένο bin, η ανάλυση ετερογένειας μπορεί να περιοριστεί σε bins με παραπλήσιες μέσες βαθμολογίες ( $\pm 2$ ), δεδομένου ότι η ετερογένεια εξαρτάται από τη μέση βαθμολογία.

Το αποτέλεσμα αποτελείται από τα εξής: (1) μέση βαθμολογία, τιμή P για κάθε bin και τιμή  $P_{\text{ordered}}$  για κάθε bin, (2) τιμή μέτρησης Q και τιμή P για κάθε bin, (3) τιμή  $H_a$  και τιμή P για κάθε bin, (4) τιμή μέτρησης B και τιμή P για κάθε bin. Όταν η ανάλυση ετερογένειας περιορίζεται πλησίον ενός δεδομένου bin, το αποτέλεσμα αποτελείται από τις μετρήσεις Q,  $H_a$  και B με τις αντίστοιχες τιμές P.

Τα ακόλουθα αρχεία αποτελεσμάτων αντιστοιχούν στους τύπους ανάλυσης: το αρχείο 'monte\_unweighted' όταν διεξάγεται μια μη σταθμισμένη ανάλυση, ενώ το 'monte\_weighted' σε μια σταθμισμένη ανάλυση. Το αρχείο 'monte\_link\_unweighted' εμφανίζεται σε μια μη σταθμισμένη ανάλυση που περιορίζεται σε ένα δεδομένο bin, ενώ το αρχείο 'monte\_link\_weighted' σε μια σταθμισμένη ανάλυση που περιορίζεται σε ένα δεδομένο bin. Τα αρχεία έχουν τη μορφή ASCII και εντοπίζεται στον ίδιο φάκελο.

### **Ειδικός σκοπός 1: Ο προσδιορισμός σημαντικών γενετικών τόπων συνδεδεμένων με την αρτηριακή πίεση παλμού από μετα-αναλύσεις μελετών ευρείας γονιδιωματικής σάρωσης.**

#### **Υπόβαθρο**

Η Πίεση Παλμού (ΠΠ) ορίζεται ως η διαφορά μεταξύ ΣΑΠ και ΔΑΠ. Σε δυτικούς πληθυσμούς, με τη συνεχή αύξηση της ΣΑΠ αυξανόμενης της ηλικίας και την κατιούσα τάση της ΔΑΠ σε ηλικωμένους πληθυσμούς, η ΠΠ αυξάνει συνεχώς σε συνάρτηση με τη χρονολογική ηλικία. Εκτός από τη συστολική λειτουργία της αριστερής κοιλίας, κύριος καθοριστής της ΠΠ είναι η προοδευτική «σκλήρυνση» των κεντρικών ελαστικών αρτηριών, η οποία αντανακλά τη βιολογική γήρανση του αρτηριακού συστήματος (Aviv, 2001;Nichols et al., 2008;Safar & Smulyan, 2004;Safar et al., 2003). Συνεπώς, η ΠΠ αποτελεί έναν έμμεσο δείκτη της αρτηριακής σκληρίας και συσχετίζεται με την καρδιαγγειακή θνησιμότητα ανεξάρτητα από άλλους μείζονες παράγοντες κινδύνου (Safar, 2000;Van Bortel et al., 2001;Safar et al., 2003;Safar & Smulyan, 2004;Nichols et al., 2008).

Πρόσφατα δεδομένα υποστηρίζουν την ύπαρξη γενετικής συμβολής στον καθορισμό της διακύμανσης της ΠΠ στο γενικό πληθυσμό (Lacolley et al., 2009). Μελέτες διδύμων και οικογενειών έχουν δείξει ότι γενετικοί παράγοντες

διαδραματίζουν ρόλο στην ΠΠ αλλά το ακριβές πρότυπο κληρονομικότητας παραμένει άγνωστο. Η κληρονομικότητα της ΠΠ (heritability) έχει υπολογιστεί σε διάφορες μελέτες να κυμαίνεται από 0.13 έως 0.63, γεγονός που υποδηλώνει ότι η ΠΠ έχει μία τουλάχιστον μετρίου βαθμού κληρονομήσιμη συνιστώσα (*Atwood et al., 2001*).

Αρκετές ΜΓΣ έχουν δείξει ότι ένας σημαντικός αριθμός γενετικών πολυμορφισμών πιθανώς να διαμεσολαβεί αυξήσεις των τιμών της ΠΠ. Παρόλα αυτά, τα αποτελέσματα των ΜΓΣ και των μελετών οικογενειών απαιτούν τη διεξαγωγή μελετών επαλήθευσης καθώς και τη διαλεύκανση της λειτουργικής (μοριακής) βάσης της στατιστικής συσχέτισης. Επιπρόσθετα, τα αποτελέσματα των ΜΓΣ για την ΠΠ χαρακτηρίζονται από έλλειψη σταθερότητας και κρίνονται μη συμπερασματικά.

Οι ΣΕΓΣ αποτελούν μια εναλλακτική και ελεύθερη υποθέσεων προσέγγιση για τον προσδιορισμό χρωμοσωμικών περιοχών συνδεδεμένων με πολυπαραγοντικά γνωρίσματα, όπως η ΠΠ. Εντούτοις, οι ΣΕΓΣ για την ΠΠ έχουν αποφέρει ασταθή και μη συμπερασματικά αποτελέσματα, διότι τα στατιστικά σήματα σύνδεσης ήταν ιδιαίτερα χαμηλά.

Έχει επιπλέον υποστηριχθεί ότι η γενετική αιτιολογία της ΠΠ είναι παρόμοια με την αντίστοιχη της ΣΑΠ (*Atwood et al., 2001*). Όπως παρουσιάστηκε στο τμήμα II της παρούσας διατριβής, η εικόνα γενετικής σύνδεσης για την αρτηριακή υπέρταση είναι αρκετά συγκεχυμένη, με το σύνολο των χρωμοσωμάτων να έχουν εμπλακεί από κάποια ΣΕΓΣ. Η ΠΠ ενδεχομένως να αποτελεί έναν πιο ελκυστικό στόχο για τη διευκρίνιση των υπεύθυνων γενετικών παραγόντων, δεδομένης της υψηλότερης τιμής κληρονομικότητας σε σχέση με την υπέρταση (*Atwood et al., 2001*) (*Lacolley et al., 2009*) και τη διεξαγωγή ενός διαχειρίσιμου αριθμού ΣΕΓΣ με προσβάσιμα δεδομένα.

Συνεπώς, επιχειρήθηκε να συντεθούν όλα τα διαθέσιμα δεδομένα σύνδεσης για την ΠΠ, με την εφαρμογή της μεθοδολογίας HEGESMA και να προσδιοριστούν σημαντικοί γενετικοί τόποι για τον έλεγχο της ΠΠ (*Zintzaras et al., 2007*).

## **Υλικά και Μέθοδοι**

### *Υποψήφιες μελέτες ΣΕΓΣ*

Όλες οι μελέτες ΣΕΓΣ για την ΠΠ που είχαν δημοσιευθεί πριν από το Σεπτέμβριο του 2006 εξετάστηκαν ως υποψήφιες για να συμπεριληφθούν στη μετα-

ανάλυση. Οι μελέτες προσδιορίστηκαν έπειτα από συστηματική αναζήτηση της βιβλιογραφικής βάσης δεδομένων PubMed. Ως κριτήριο αναζήτησης χρησιμοποιήθηκε ένας συνδυασμός των παρακάτω όρων: “genome search”, “genome scan”, “genome screen”, “genomic search”, “genomic scan”, “genomic screen”, “LOD score”, “NPL score”, “susceptibility loci”, “genomewide”, “genome-wide”, “genome-wide linkage analysis”, “pulse pressure”, “arterial stiffness”, “blood pressure”, “systolic blood pressure” and “diastolic blood pressure”. Η αναζήτηση περιορίστηκε σε μελέτες ανθρωπίνων δεδομένων δημοσιευμένες στην Αγγλική γλώσσα.

Η μετα-ανάλυση συμπεριέλαβε ΣΕΓΣ που πληρούσαν τα παρακάτω κριτήρια: (1) διεξαγωγή σε ανθρώπινο πληθυσμό, (2) ορισμός της ΠΠ ως τη μέση διαφορά ΣΑΠ και ΔΑΠ, κτηθείσας σε κάθε εξέταση, (3) γονοτύπωση πολυμορφικών δεικτών με πυκνότητα τουλάχιστον 30 (cM) κατά μήκος του γονιδιώματος, (4) διαθεσιμότητα των απαραίτητων δεδομένων σύνδεσης (δημοσίευση στο διαδίκτυο, παροχή από τους συγγραφείς της μελέτης ή εξαγωγή από δημοσιευμένα γραφήματα), και (5) απουσία αλληλοεπικάλυψης των μελετώμενων πληθυσμών. Τμηματικές σαρώσεις του γονιδιώματος και μελέτες υποψηφίων περιοχών εξαιρέθηκαν. Στην περίπτωση μελετών με αλληλοεπικαλυπτόμενα δείγματα, η μεγαλύτερη μελέτη με εξαγόμενα δεδομένα θεωρήθηκε ως η κατάλληλη για να συμπεριληφθεί στη μετα-ανάλυση. Διεξήχθη επίσης ανάλυση υπο-ομάδων με βάση την εθνικότητα.

#### *Βάση δεδομένων*

Από κάθε κατάλληλη μελέτη, πραγματοποιήθηκε εξαγωγή των κάτωθι δεδομένων: Πρώτος συγγραφέας, περιοδικό, έτος δημοσίευσης, χώρα προέλευσης, εθνικότητα του μελετώμενου δείγματος, ηλικία συμμετεχόντων, αριθμός οικογενειών και ατόμων, ορισμός του φαινοτύπου, αριθμός πολυμορφικών δεικτών, στατιστική δοκιμασία σύνδεσης, τύπος στατιστικής ανάλυσης και λογισμικό ανάλυσης.

#### *Μετα-ανάλυση των ΣΕΓΣ και έλεγχος ετερογένειας*

Η διαδικασία μετα-ανάλυσης των μελετών ΣΕΓΣ άρχισε με το χωρισμό του γονιδιώματος σε χρωμοσωμικά τμήματα ίσου περίπου μήκους (bins), όπως περιγράφεται στη θεωρητική εισαγωγή της ανάλυσης σύνδεσης της διατριβής. Κάθε τμήμα έχει μήκος 30 cM κατά προσέγγιση, ώστε όλο το γονιδίωμα να αποτελείται

από 120 τμήματα (*Zintzaras et al., 2006a; Zintzaras & Kitsios, 2006*). Κάθε χρωμοσωμικό τμήμα συμβολίζεται κατά συνθήκη ως [«χρωμόσωμα». Αριθμός τμήματος], π.χ. ο αριθμός 3.2 συμβολίζει το δεύτερο τμήμα του χρωμοσώματος 3. Σε κάθε ΣΕΓΣ, καταγράφηκε το πιο σημαντικό στατιστικό αποτέλεσμα σύνδεσης για κάθε τμήμα. Στη συνέχεια, τα τμήματα ταξιθετούνται αντίστοιχα της σημαντικότητάς τους και οι βαθμολογίες τους προστίθενται για όλες τις μελέτες. Η ετερογένεια μεταξύ των μελετών για κάθε τμήμα ελέγχθηκε με τη στατιστική δοκιμασία Q.

Η παρούσα μετα-ανάλυση συμπεριέλαβε όλα τα διαθέσιμα δεδομένα στην κύρια ανάλυση ενώ πραγματοποιήθηκε και ανάλυση υπο-ομάδας με βάση την εθνικότητα. Στην περίπτωση που η μετα-ανάλυση προσδιορίσει σημαντικότητα για γειτονικά τμήματα, πραγματοποιείται περαιτέρω ανάλυση βασισμένη στο χωρισμό του γονιδιώματος σε 60 τμήματα, ώστε να διαπιστωθεί η πιθανή εξάρτηση των αποτελεσμάτων από την επιλογή μήκους των τμημάτων. Σε όλες τις αναλύσεις χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό HEGESMA (<http://biomath.med.uth.gr>).

Επιπλέον, επιχειρήθηκε να διαπιστωθεί το ενδεχόμενο να εδράζονται γνωστά υποψήφια γονίδια για τη διακύμανση της ΠΠ εντός των προσδιορισθέντων γενετικών περιοχών. Η αναζήτηση κλινικά σχετιζόμενων γονιδίων πραγματοποιήθηκε με δύο διαφορετικές προσεγγίσεις. Κατά τη στενώς ορισμένη προσέγγιση, η αναζήτηση περιορίστηκε σε γονίδια που έχουν μελετηθεί σε μελέτες πασχόντων-μαρτύρων για τη διερεύνηση συσχέτισης με την ΠΠ ή άλλους δείκτες αρτηριακής σκληρίας. Κατά την ευρεία προσέγγιση, η αναζήτηση επεκτάθηκε σε γνωστά υποψήφια γονίδια για «καρδιαγγειακές νόσους», συμπεριλαμβάνοντας φαινοτύπους όπως η στεφανιαία νόσος, το αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο, η περιφερειακή αποφρακτική αγγειακή νόσος, η ενδοεγκεφαλική αιμορραγία και η υπέρταση. Η συστηματική αναζήτηση υποψήφιων γονιδίων πραγματοποιήθηκε στις βάσεις δεδομένων PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=PubMed>), OMIM (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/>), Entrez Gene (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=gene>), HuGENet (<http://www.cdc.gov/genomics/hugenet/default.htm>) και Genetic Association Database (<http://geneticassociationdb.nih.gov/cgi-bin/index.cgi>). Τα δεδομένα της αναζήτησης συμπληρώθηκαν και από ευρήματα διαφορετικής έκφρασης γονιδίων στη μοναδική δημοσιευμένη μελέτη μικροσυστοιχιών γονιδιακής έκφρασης που ήταν διαθέσιμη στη βιβλιογραφία



## Αποτελέσματα

Η αναζήτηση της βάσης PubMed απέφερε 263 τίτλους που πληρούσαν τα κριτήρια της αναζήτησης. 38 άρθρα απέμειναν μετά την εξέταση των περιλήψεων. Τα πλήρη κείμενα των άρθρων αυτών εξετάστηκαν ως προς την καταλληλότητα των περιγραφόμενων μελετών για να συμπεριληφθούν στη μετα-ανάλυση. Ανευρέθησαν 8 άρθρα που περιέγραφαν ΣΕΓΣ. Εξ' αυτών, 4 άρθρα πληρούσαν τα κριτήρια εισαγωγής στη μετα-ανάλυση. Στον Πίνακα 3 αναδεικνύονται οι λόγοι εξαίρεσης των υπολοίπων μελετών. Σε ένα άρθρο περιγραφόντουσαν 4 διαφορετικές ΣΕΓΣ, αντιστοιχούσες σε 4 διαφορετικές εθνικότητες: Αφροαμερικάνοι, Ασιάτες, Λατίνοι και Καυκάσιοι. Συνολικά, η μετα-ανάλυση συμπεριέλαβε 7 ΣΕΓΣ.

*Πίνακας 3. Δημοσιευμένες μελέτες ΣΕΓΣ για την ΠΠ (συμπεριληφθείσες και εξαιρεθείσες στην παρούσα μετα-ανάλυση)*

Συμπεριληφθείσες μελέτες		
Πρώτος συγγραφέας, έτος δημοσίευσης	Δείγμα μελέτης*	
Atwood, 2001	SAFHS	
Camp, 2003	Utah pedigrees	
DeStefano, 2004	Framingham Heart Study, Framingham Offspring Study	
Bielinski, 2005	FBPP (GenNet, GENOA, HyperGEN, SAPHIRE)	
Εξαιρεθείσες μελέτες		
Πρώτος συγγραφέας, έτος δημοσίευσης	Δείγμα μελέτης*	Λόγοι εξαίρεσης
Mitchell, 2005	Framingham Offspring Study	Αλληλοεπικαλυπτόμενο δείγμα με την μεγαλύτερη σε μέγεθος μελέτη των De Stefano και συν. 2004
Turner, 2005	GENOA	Αλληλοεπικαλυπτόμενο δείγμα με την μεγαλύτερη σε μέγεθος μελέτη των Bielinski και συν. 2005
Turner, 2006a	GENOA	Αλληλοεπικαλυπτόμενο δείγμα με την μεγαλύτερη σε μέγεθος μελέτη των Bielinski και συν. 2005
Turner, 2006b	GENOA	Αλληλοεπικαλυπτόμενο δείγμα με την μεγαλύτερη σε μέγεθος μελέτη των Bielinski και συν. 2005

\* SAFHS: San Antonio Family Heart Study, FBPP: Family Blood Pressure Program (GenNet, Genetic Epidemiology Network of Arteriopathy (GENOA), Hypertension Genetics Epidemiology Network (HyperGEN), and Stanford Asian Pacific Program in Hypertension and Insulin Resistance (SAPHIRE).

Δύο από τις ερευνητικές ομάδες που είχαν δημοσιευμένες ΣΕΓΣ ανταποκρίθηκαν στο αίτημα μας για παροχή ακατέργαστων δεδομένων σύνδεσης και συμμετοχή σε μια συνεργατική μετα-ανάλυση (Camp *et al.*, 2003; Atwood *et al.*, 2001). Στις υπόλοιπες 2 περιπτώσεις (Bielinski *et al.*, 2005; DeStefano *et al.*, 2004), η εξαγωγή των στατιστικών δεδομένων σύνδεσης πραγματοποιήθηκε από τα δημοσιευμένα χρωμοσωμικά

διαγράμματα με τη χρήση του προγράμματος ψηφιοποίησης Engauge Digitizer (ver 2.12, Mark Mitchell, 2002), όπως έχει περιγραφεί και σε προηγούμενες μελέτες από την ομάδα μας (Zintzaras *et al.*, 2006a; Zintzaras & Kitsios, 2006), καθώς και από πληροφορίες παρεχόμενες σε πίνακες ή στο πλήρες κείμενο των δημοσιευμένων εργασιών.

Λεπτομέρειες για τις συμπεριληφθείσες μελέτες παρέχονται στον Πίνακα 4. Ο διαιρεμένος γενετικός χάρτης με τις γενετικές αποστάσεις και τα συνοριακά όρια κάθε χρωμοσωμικού τμήματος είναι διαθέσιμος σε ηλεκτρονική μορφή στην ιστοσελίδα του εργαστηρίου Βιομαθηματικών (<http://biomath.med.uth.gr>). Τουλάχιστον 1 πολυμορφικός δείκτης ήταν παρών σε κάθε χρωμοσωμικό τμήμα. Το μέσο μήκος των τμημάτων ήταν  $29.38 \pm 2.7$  cM.

Πίνακας 4. Χαρακτηριστικά των μελετών ΣΕΓΣ για την ΠΠ και κύρια αποτελέσματα

Πρώτος συγγραφέας, έτος δημοσίευσης	Εθνικότητα	Αριθμός ατόμων (οικογενειών)	Ηλικία (έτη)	Επιλογή οικογενειών	Μέση ΠΠ (κληρονομικότητα)	Αριθμός δεικτών (μέσος αριθμός δεικτών/χρωμοσωμικό τμήμα)	Τύπος ανάλυσης	Στατιστική δοκιμασία σύνδεσης (Λογισμικό)	Περιοχή με στοιχεία σύνδεσης
Atwood, 2001	Μεξικανοί Αμερικάνοι	440 (10)	(40-60)	Τυχαία	Μη διαθέσιμη (0.21)	399 (3.3)	Δισημειακή	LOD score (Pedigree Analysis Package, version 4)	Sug: 7q22, 18q23, 21q22, 8q24.23
Camp, 2003	Καυκάσιοι	1454 (26)	27.8±18.2	Υπερτασικοί ασθενείς και στεφανιαία νόσος πρώιμης έναρξης	44.8±9.2 (0.25)	405 (3.4)	Πολυσημειακή	QNPL score (MCLINK)	Sug: 8p21.1, 12q23.1
DeStefano, 2004	Καυκάσιοι	1584 (345)	47.5±8.8	Τυχαία	47.33±10.77 (0.52±0.03)	366 (3.1)	Πολυσημειακή	LOD score (Genehunter)	Sug: 5p13.3, 7q11.22, 7q34, 8q24, 10q21, 15q26, 22q12
Bielinski, 2005	Μαύροι	3962 (1292)	51±13.5	Υπερτασικοί ασθενείς	Μη διαθέσιμη (0.33±0.04)	391 (3.3)	Πολυσημειακή	LOD score (SOLAR)	Sug: 3q25.3, 9q13.33
Bielinski, 2005	Ασιάτες	1557 (535)	51±9	Υπερτασικοί ασθενείς	Μη διαθέσιμη (0.31±0.05)	391 (3.3)	Πολυσημειακή	LOD score (SOLAR)	Sug: 5q33.3
Bielinski, 2005	Λατίνοι	1612 (389)	55±11.9	Υπερτασικοί ασθενείς	Μη διαθέσιμη (0.31±0.05)	391 (3.3)	Πολυσημειακή	LOD score (SOLAR)	Sign: 17q23.2, 20q12
Bielinski, 2005	Καυκάσιοι	3667 (1104)	53±13.9	Υπερτασικοί ασθενείς	Μη διαθέσιμη (0.25±0.07)	391 (3.3)	Πολυσημειακή	LOD score (SOLAR)	Sign: 21q21

*QNPL score: Quantitative non-parametric linkage score, MGS: Mammalian Genotyping Service, NR: not reported, sug: suggestive linkage (υποδηλωτική σύνδεση), sign: significant linkage (σημαντική σύνδεση)*

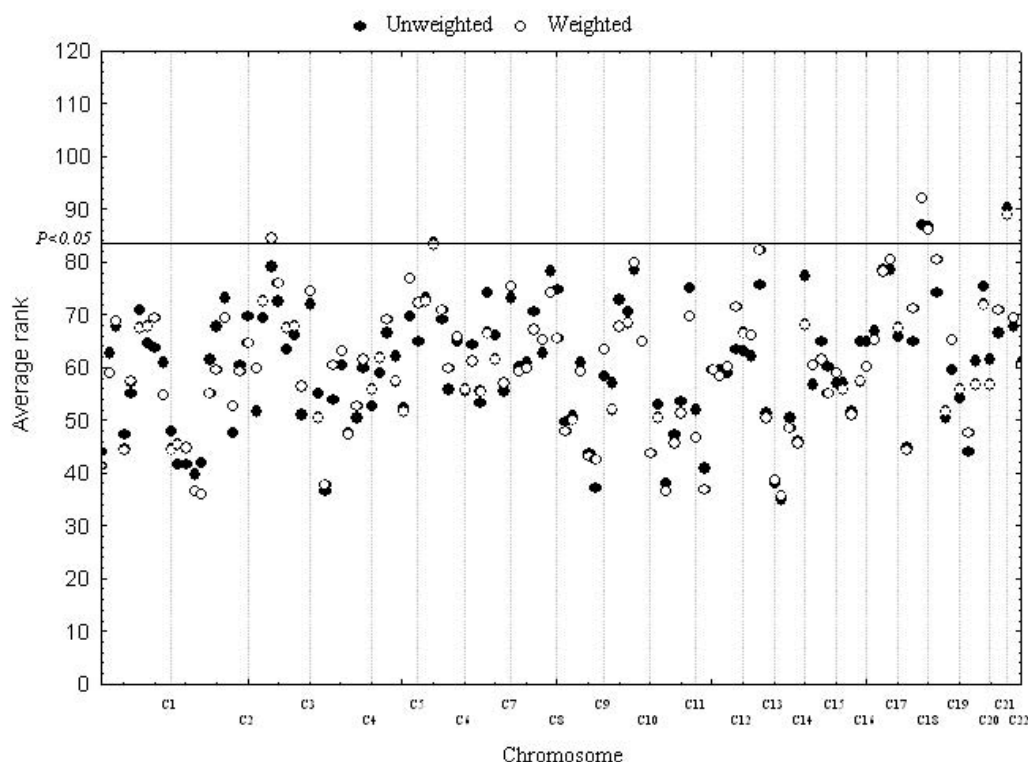
Συνοπτικά, η μελέτη των Atwood και συν (*Atwood et al., 2001*). Αποτελούνταν από 10 οικογένειες με 440 μέλη (Μεξικανοί Αμερικανοί) με εύρος ηλικίας από 40-60 έτη. Η ανάλυση σύνδεσης έγινε μετά από έλεγχο για συγχυτικές μεταβλητές όπως το φύλο, η ηλικία και ο δείκτης μάζας σώματος (ΔΜΣ). Δεν έγινε διόρθωση για τη λήψη φαρμακευτικής αγωγής, καθώς μια δοκιμασία αντιμεταθέσεων Monte Carlo σε ένα ανεξάρτητο δείγμα πυρηνικών οικογενειών δεν έδειξε επίδραση της φαρμακευτικής αγωγής στην ΠΠ. Στη μελέτη από τους Camp και συν. (*Camp et al., 2003*), η ΣΕΓΣ διεξήχθη σε 26 οικογένειες με 1454 μέλη προερχόμενα από πληθυσμό Ευρωπαϊκής καταγωγής με μέση ηλικία τα 27.8 έτη. Η ανάλυση σύνδεσης για την ΠΠ σε μη φαρμακευτικά θεραπευόμενα άτομα έγινε μετά από προσαρμογή των τιμών ΠΠ για φύλο, ηλικία και ΔΜΣ. Για τα 125 άτομα που βρίσκονταν υπό φαρμακευτική αγωγή, τους χορηγήθηκε η τιμή ΠΠ των 55 mm Hg, εκτός από τις περιπτώσεις που η παρατηρούμενη τιμή ΠΠ ήταν μεγαλύτερη οπότε και χρησιμοποιούνταν η αληθής τιμή ΠΠ. Στη μελέτη των DeStefano και συν (*DeStefano et al., 2004*). αξιολογήθηκαν 345 οικογένειες συμπεριλαμβάνουσες 1584 μέλη με μέση ηλικία τα 47.5 έτη σε πληθυσμό Ευρωπαϊκής καταγωγής. Οι τιμές ΠΠ προσαρμόστηκαν για την ηλικία, χρονική περίοδο εξέτασης και ΔΜΣ. Για τα άτομα υπό αντι-υπερτασική αγωγή, χρησιμοποιήθηκε ένας μη παραμετρικός αλγόριθμος για την προσαρμογή της ΠΠ με βάση την επίδραση της θεραπείας. Η μελέτη των Bielinski και συν (*Bielinski et al., 2005*). διεξήχθη σε Αφροαμερικάνους, Ασιάτες, Λατίνους και Καυκάσιους πληθυσμούς με την ανάλυση 3662 ατόμων (1292 οικογένειες), 1557 ατόμων (535 οικογένειες), 1612 ατόμων (389 οικογένειες) και 3667 ατόμων (1104 οικογένειες), αντιστοίχως. Στις 4 αυτές μελέτες, η μέση ηλικία κυμαίνονταν από 51 (Αφροαμερικάνοι, Ασιάτες) έως τα 55 έτη (Λατίνοι). Η ανάλυση σύνδεσης της ΠΠ ήταν προσαρμοσμένη για το φύλο, την ηλικία και τις μεταξύ τους αλληλεπιδράσεις, το ΔΜΣ και το εξεταστικό κέντρο. Η λήψη αντι-υπερτασικής αγωγής δεν ελήφθη υπόψη στην ανάλυση.

Όλες οι μελέτες χρησιμοποίησαν παρόμοιους αριθμούς μικροδορυφορικών δεικτών, κυμαινόμενων από 366-405, και με την εξαίρεση της μελέτων των Atwood και συν. όλες οι υπόλοιπες μελέτες χρησιμοποίησαν πολυσημειακή ανάλυση. Η στατιστική μονάδα σύνδεσης που χρησιμοποιήθηκε σε κάθε μελέτη ήταν το LOD score, με την εξαίρεση της μελέτης των Camp και συν. που χρησιμοποίησαν ένα ποσοτικό μη παραμετρικό σκορ σύνδεσης (QNPL). Κατά τη διαδικασία στάθμισης, η μελέτη των Atwood και συν. παρήγαγε τη χαμηλότερη βαθμολογία στάθμισης ενώ η

μελέτη των Bielinski και συν. στους Αφροαμερικανούς παρήγαγε το μεγαλύτερο σταθμιστικό παράγοντα ( $w=0.21$ ). Στις υπόλοιπες μελέτες, οι σταθμιστικοί παράγοντες είχαν το ίδιο μέγεθος ( $w=0.13$ ). Στον Πίνακα 4 παρουσιάζονται οι χρωμοσωμικές περιοχές με στατιστικά σημαντική ή υποδηλωτική σύνδεση για κάθε μελέτη ΣΕΓΣ ξεχωριστά.

Στην εικόνα 8 απεικονίζονται οι μέσες βαθμολογίες για κάθε χρωμοσωμικό τμήμα από τις 5 ΣΕΓΣ από την ανάλυση των 120 τμημάτων. Τα χρωμοσωμικά τμήματα με στατιστικά σημαντική τιμή  $P_{rank}$  στη μη σταθμισμένη ανάλυση απεικονίζονται άνωθεν της γραμμής σημαντικότητας  $P \leq 0.05$ . Τα σημαντικά τμήματα ( $P \leq 0.05$ ), οι παρατηρηθήσεις βαθμολογίες, και οι στατιστικές μετρήσεις GSMA και ετερογένειας για κάθε μελέτη παρουσιάζονται στον Πίνακα 5.

*Εικόνα 8. Μη σταθμισμένες (ανοιχτοί κύκλοι) και σταθμισμένες (μαύροι κύκλοι) μέσες βαθμολογίες των χρωμοσωμικών τμημάτων στη μετα-ανάλυση των 120 τμημάτων. Τμήματα με στατιστικά σημαντικές τιμές  $P_{rank}$  εμφανίζονται άνωθεν της γραμμής σημαντικότητας  $P \leq 0.05$ .*



*Πίνακας 5. Αποτελέσματα της μετα-ανάλυσης των 7 μελετών ΣΕΓΣ για την ΠΠ. Παρουσιάζονται τα σημαντικά ευρήματα όσον αφορά τις μέσες βαθμολογίες για τη σταθμισμένη και μη σταθμισμένη ανάλυση, καθώς και τα ευρήματα από τον έλεγχο της ετερογένειας (σε παρένθεση εμφανίζονται τα αποτελέσματα της σταθμισμένης ανάλυσης).*

Χρωμοσωμικό τμήμα (Bin)	Κυτταρογενετική περιοχή	Βαθμολογίες							Μέση βαθμολογία			P για χαμηλή ετερογένεια	
		Camp	Atwood	DeStefano	Bielinski Ασιάτες	Bielinski Μαύροι	Bielinski Λατίνοι	Bielinski Κανκάσιοι	Παρατηρηθείσα	Prank	Porder	Q	Qadjusted
21.2	21q22.11- 21q22.3	87.5	120	54	73	72	107	119	90.35 (89.11)	0.009 (0.014)	0.684 (0.565)	0.140 (0.142)	0.328 (0.283)
18.3	18q12.2- 18q21.33	79	53	49	104	102	110	113	87.14 (92.18)	0.017 (0.007)	0.664 (0.626)	0.188 (0.152)	0.30 (0.408)
18.4	18q21.33- 18q23	87.5	117	42	77	82	92	110	86.78 (86.21)	0.018 (0.025)	0.425 (0.650)	0.112 (0.091)	0.169 (0.138)
6.2	6p22.3- 6p21.1	112	76	53	92	116	102	34.5	83.64 (83.25)	0.035 (0.043)	0.639 (0.648)	0.357 (0.560)	0.457 (0.612)
3.3	3p23- 3p14.2	48.5	50	70	83	96	96	112	79.35 (84.73)	0.069 (0.034)	0.962 (0.625)	0.110 (0.119)	0.073 (0.142)

*Πίνακας 6. Αποτελέσματα της μετα-ανάλυσης στην υπο-ομάδα των 3 μελετών ΣΕΓΣ για την ΠΠ σε Κανκάσιους πληθυσμούς. Παρουσιάζονται τα σημαντικά ευρήματα όσον αφορά τις μέσες βαθμολογίες για τη σταθμισμένη και μη σταθμισμένη ανάλυση, καθώς και τα ευρήματα από τον έλεγχο της ετερογένειας (σε παρένθεση εμφανίζονται τα αποτελέσματα της σταθμισμένης ανάλυσης).*

Χρωμοσωμικό τμήμα (Bin)	Κυτταρογενετική περιοχή	Βαθμολογίες			Μέση βαθμολογία			P για χαμηλή ετερογένεια	
		Camp	DeStefano	Bielinski	Παρατηρηθείσα	Prank	Porder	Q	Qadjusted
22.1	22q11.1-22q12.3	120	101	118	113 (114.8)	0.001 (0.0009)	0.130 (0.101)	0.088 (0.077)	0.914 (0.892)
22.2	22q12.3-22q13.3	119	116	72	102.3 (98.63)	0.017 (0.032)	0.593 (0.798)	0.388 (0.433)	0.956 (0.838)
10.4	10q22.1-10q23.32	102	93	101	98.66 (99.97)	0.026 (0.028)	0.665 (0.877)	0.012 (0.010)	0.041 (0.030)
8.1	8p23.3-8p23.1	95	108	79	94 (92.68)	0.046 (0.064)	0.858 (0.935)	0.159 (0.175)	0.270 (0.230)

Πίνακας 7. Αποτελέσματα της μετα-ανάλυσης των 7 μελετών ΣΕΓΣ για την ΠΠ με τη χρήση 60 χρωμοσωμικών τμημάτων. Παρουσιάζονται τα σημαντικά ευρήματα όσον αφορά τις μέσες βαθμολογίες για τη σταθμισμένη και μη σταθμισμένη ανάλυση, καθώς και τα ευρήματα από τον έλεγχο της ετερογένειας (σε παρένθεση εμφανίζονται τα αποτελέσματα της σταθμισμένης ανάλυσης).

Εθνικότητα	Χρωμοσωμικό τμήμα (Bin)	Κυτταρογενετική περιοχή	Μέση βαθμολογία			P για χαμηλή ετερογένεια	
			Παρατηρηθείσα	Prank	Porder	Q	Qadjusted
Όλες	18.3-18.4	18q12.2 -18q23	42.92 (42.94)	0.027 (0.032)	0.839 (0.896)	0.338 (0.270)	0.485 (0.431)
	21.1-21.2	21p11.2-21q22.3	42.78 (42.57)	0.028 (0.038)	0.544 (0.698)	0.309 (0.274)	0.442 (0.413)
	8.5-8.6	8q22.2 -8q24.3	41.78 (38.48)	0.044 (0.124)	0.467 (0.664)	0.619 (0.720)	0.731 (0.707)
Κανκασιοι	22.1-22.2	22q11.1-22q12.3	58.33 (58.99)	0.000 (0.000)	0.015 (0.012)	0.012 (0.012)	0.38 (0.371)
	10.3-10.4	10p11.23-10q23.32	49.66 (49.80)	0.028 (0.031)	0.516 (0.585)	0.118 (0.108)	0.249 (0.222)

Πέντε τμήματα βρέθηκαν να παρουσιάζουν  $P_{rank} \leq 0.05$  στη σταθμισμένη ή μη ανάλυση (bins 21.2: 21q22.11-21q22.3, 18.3: 18q12.2-18q21.33, 18.4: 18q21.33-18q23, 6.2: 6p22.3-6p21.1, 3.3: 3p23-3p14.2), και 4 εξ' αυτών έδειξαν σημαντικότητα και στις δύο αναλύσεις (bins 21.2, 18.3, 18.4, 6.2). Τα τμήματα αυτά δεν έδειξαν σημαντικότητα όσον αφορά τις στατιστικές δοκιμασίες σειράς και για τους 2 τύπους αναλύσεων ( $P_{order} > 0.43$ ). Για κανένα από τα χρωμοσωμικά τμήματα δεν παρατηρήθηκε χαμηλή ετερογένεια ( $P_Q > 0.09$  and  $P_{Qadjusted} > 0.07$ ), γεγονός που φανέρωσε σημαντική διακύμανση στις βαθμολογίες των τμημάτων μεταξύ των διαφορετικών σαρώσεων. Για παράδειγμα, το τμήμα 21.2 βαθμολογήθηκε στις υψηλότερες θέσεις στις μελέτες των Atwood και συν. και των Bielinski για Καυκάσιους και Λατίνους, αλλά δεν έλαβε υψηλή βαθμολογία στη μελέτη των DeStefano και συν.

Στην ανάλυση υπο-ομάδας για Καυκάσιους, 4 τμήματα ανευρέθησαν ως σημαντικά στη σταθμισμένη και μη ανάλυση (bins 22.1: 22q11.1-22q12.3, 22.2: 22q12.3-22q13.3, 10.4: 10q22.1-10q23.32, 8.1: 8p23.3-8p23.1), με 3 εξ' αυτών (bins 22.1, 22.2, 10.4, 8.1) να είναι σημαντικά και στους 2 τύπους αναλύσεων. Τα τμήματα αυτά δεν έδειξαν σημαντικότητα όσον αφορά τις στατιστικές δοκιμασίες σειράς και για τους 2 τύπους αναλύσεων ( $P_{order} > 0.10$ ). Το τμήμα 10.4 έδειξε στατιστικώς σημαντική χαμηλή ετερογένεια στη σταθμισμένη και μη ανάλυση ( $P_Q = 0.01$  και  $P_{Qadjusted} = 0.01$ , αντίστοιχα). Ακόμα και έπειτα από την προσαρμογή των κατανομών Monte Carlo για τη μέση βαθμολογία κάθε τμήματος, η χαμηλή ετερογένεια του τμήματος 10.4 παρέμεινε στατιστικά σημαντική ( $P_{Qadjusted} = 0.04$  και  $P_{Qadjusted} = 0.03$ , αντίστοιχα), αναδεικνύοντας την ύπαρξη σταθερότητας μεταξύ των σαρώσεων. Συνεπώς, στην ανάλυση υπο-ομάδας για τα άτομα με Καυκάσια προέλευση, το τμήμα 10.4 παρείχε στιβαρές ενδείξεις συνδεδεσης με την ΠΠ. Επιπλέον, ενώ 2 τμήματα (21.1 και 21.2) έδειξαν σημαντική ετερογένεια μεταξύ των μελετών ( $P_{Qadjusted} > 0.05$ ), τα τμήματα αυτά είχαν λάβει από τις υψηλότερες βαθμολογίες σε 2 εκ των 3 μελετών. Εντούτοις, ουδέν εκ των τμημάτων αυτών είχε προσδιοριστεί ως σημαντικό στην κύρια ανάλυση, γεγονός που υποδεικνύει την ύπαρξη εθνικής ετερογένειας σχετικά με τους υπεύθυνους γενετικούς τόπους για τον καθορισμό της ΠΠ.

Δεδομένου ότι ορισμένα εκ των σημαντικών τμημάτων εδράζονται σε γειτονικές περιοχές του γονιδιώματος (bins 18.3 και 18.4 στην κύρια ανάλυση και bins 22.1 και 22.2 στην ανάλυση υπο-ομάδας για τους Καυκάσιους), δειχθήκη μια post-hoc ανάλυση με



κατάτμηση του γονιδιώματος σε 60 τμήματα. Η ανάλυση αυτή θα μπορούσε να υποστηρίξει περαιτέρω τη σημαντικότητα των αρχικών ευρημάτων. Πράγματι, τα τμήματα 18.3-18.4 και 21.1-21.2 βρέθηκαν να έχουν  $P_{rank} \leq 0.05$  και στους 2 τύπους αναλύσεων. Η ανάλυση ανέδειξε ένα ακόμη τμήμα (8.5-8.6) μη προσδιορισμένο στην κύρια ανάλυση, αλλά η μέση βαθμολογία ήταν οριακά σημαντική στη μη σταθμισμένη ανάλυση ( $P=0.04$ ) και μη σημαντική στην σταθμισμένη ανάλυση ( $P=0.12$ ). Σε άτομα Καυκάσιας προέλευσης, τα τμήματα 22.1-22.2 και 10.3-10.4 βρέθηκαν να έχουν  $P_{rank} \leq 0.05$  και στους 2 τύπους αναλύσεων.

Παρόλα αυτά, κανένα χρωμοσωμικό τμήμα δεν προσέγγισε το επίπεδο σημαντικότητας 5% όταν εφαρμόστηκε προσαρμογή για πολλαπλές συγκρίσεις. Υπολογίζοντας 119 ανεξάρτητες συγκρίσεις, το επίπεδο γονιδιοματικής σημαντικότητας ήταν  $P \leq 0.0004$ .

Η αναζήτηση υπεύθυνων γονιδίων για την ΠΠ ή άλλες μετρήσεις σχετικές με την αρτηριακή σκληρία (στενώς ορισμένη προσέγγιση) απέφερε θετικά ευρήματα μόνον για το τμήμα 18.3, όπου εδράζεται το γονίδιο NEDD4L (Neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 4-like), το οποίο σχετίζεται με τη ρύθμιση των επιθηλιακών διαύλων νατρίου (*Lacolley et al., 2009*). Τα γονίδια που ανευρέθησαν με την ευρέως ορισμένη προσέγγιση παρουσιάζονται στον Πίνακα 8.

Πίνακας 8. Υποψήφια γονίδια εδραζόμενα στις σημαντικές χρωμοσωμικές περιοχές

Χρωμοσωμικό τμήμα (Bin)	Κυτταρογενετική περιοχή	Συνολικός αριθμός γονιδίων στην περιοχή	Υποψήφια γονίδια (στενώς ορισμένη προσέγγιση)*	Υποψήφια γονίδια (ευρέως ορισμένη προσέγγιση)#	Γονίδια με διαφορετική έκφραση σε ανάλυση μικροσυστοιχιών
3.3	3p23-3p14.2	389	-	CCR5, CCR2, CX3CR1, TLR9, GPX1, CX3CR1, LTA, PLA2G7, HFE, TAP1, TNF, HLA-DQA1, HLA-DQB1, HLA-DRB1, HSPA1L, HSPA1B, HSPA1A, HSPA1A, HLA-DRA, HLA-B, C4B, AGER	CCR2, CSPG5
6.2	6p22.3-6p21.1	572	-	-	RXRB, BF, FLOT1
8.1	8p23.3-8p23.1	176	-	-	
8.5-8.6	8q22.2-8q24.3	294	-	CYP11B2, TNFRSF11B	
10.4	10q22.1-10q23.32	228	-	CYP2C8	PTEN
18.3	18q12.2-18q21.33	120	NEDD4L	SLC14A2, SLC14A1, NEDD4L, SERPINB2, RKHD2	
18.4	18q21.33-18q23	71	-	MC4R	
18.3-18.4	18q12.2-18q23	191	NEDD4L	SLC14A2, SLC14A1, NEDD4L, SERPINB2, RKHD2, MC4R	
21.2	21q22.11-21q22.3	228	-	CBS, ITGB2	SYNJ1
21.1-21.2	21p11.2-21q22.3	352	-	ATP5J, CBS, ITGB2	SYNJ1
22.1	22q11.1-22q12.3	426	-	HMOX1, ADORA2A, MIF, COMT, GSTT1,	DGCR6

22.2	22q12.3-22q13.3	258	-	SERPIND1 LGALS2, CYP2D6, PPARA HMOX1, ADORA2A, MIF, COMT, GSTT1, SERPIND1, LGALS2, CYP2D6, PPARA	DDX17, ECGF1, FBLN1 DGCR6, DDX17, ECGF1, FBLN1
22.1-22.2	22q11.1-22q12.3	684	-		

\* Η αναζήτηση περιορίστηκε σε γονίδια που έχουν μελετηθεί σε μελέτες πασχόντων-μαρτύρων για τη διερεύνηση συσχέτισης με την ΠΠ ή άλλους δείκτες αρτηριακής σκληρίας  
 # Η αναζήτηση επεκτάθηκε σε γνωστά υποψήφια γονίδια για «καρδιαγγειακές νόσους», συμπεριλαμβάνοντας φαινοτύπους όπως η στεφανιαία νόσος, το αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο, η περιφερειακή αποφρακτική αγγειακή νόσος, η ενδοεγκεφαλική αιμορραγία και η υπέρταση. Η συστηματική αναζήτηση υποψήφιων γονιδίων πραγματοποιήθηκε στις βάσεις δεδομένων PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=PubMed>), OMIM (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/>), Entrez Gene (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=gene>), HuGENet (<http://www.cdc.gov/genomics/hugenet/default.htm>) και Genetic Association Database (<http://geneticassociationdb.nih.gov/cgi-bin/index.cgi>). Τα δεδομένα της αναζήτησης συμπληρώθηκαν και από ευρήματα διαφορετικής έκφρασης γονιδίων στη μοναδική δημοσιευμένη μελέτη μικροσυστοιχιών γονιδιακής έκφρασης που ήταν διαθέσιμη στη βιβλιογραφία.

## Συζήτηση των αποτελεσμάτων

Συνολικά, προσδιορίστηκαν 7 μελέτες ΣΕΓΣ για την ΠΠ. Η παρούσα μετα-ανάλυση προσδιόρισε 5 χρωμοσωμικές περιοχές με ένδειξη σύνδεσης από τη στατιστική δοκιμασία  $P_{rank}$ , με 4 εξ' αυτών (bins 21.2, 18.3, 18.4, 6.2) να παρουσιάζουν σημαντικότητα και στους 2 τύπους αναλύσεων (σταθμισμένη και μη ανάλυση). Καμία από αυτές τις περιοχές δεν έδειξε χαμηλή ετερογένεια, γεγονός που υποδηλώνει την ύπαρξη ποικιλομορφίας στα ευρήματα και τις βαθμολογίες των επιμέρους μελετών. Οι χρωμοσωμικές περιοχές που προσδιορίστηκαν στην ανάλυση υπο-ομάδας για τα άτομα με Καυκάσια προέλευση διέφεραν από τα ευρήματα της κύριας ανάλυσης (bins 22.1, 22.2, 10.4), αναδεικνύοντας την πιθανή ύπαρξη εθνικών διαφορών στους γενετικούς τόπους που καθορίζουν τη διακύμανση της ΠΠ. Με δεδομένα όμως τα γνωστά προβλήματα που ανακύπτουν από τους ελέγχους πολλαπλών υποθέσεων και την πιθανή ανακάλυψη ψευδώς θετικών ευρημάτων, όλα τα ευρήματα της παρούσας μελέτης θα πρέπει να εξεταστούν με επιφύλαξη μεχρις ότου να επαληθευτούν από μελλοντικές εργασίες. Καμία χρωμοσωμική περιοχή δεν έδειξε σημαντικότητα στη στατιστική δοκιμασία  $P_{order}$ . Δύο από τις περιοχές που αναδείχθηκαν από την παρούσα μετα-ανάλυση δεν είχαν προσδιοριστεί από τις επιμέρους πρωτότυπες εργασίες.

Ο έλεγχος ετερογένειας έδειξε χαμηλή προσαρμοσμένη και μη ετερογένεια μονον για το τμήμα 10.4 στη σταθμισμένη και μη ανάλυση για τα άτομα με Καυκάσια προέλευση. Περιοχές με σημαντική μέση βαθμολογία και χαμηλή ετερογένεια είναι

χαρακτηριστικές σταθερότητας ευρημάτων σε διαφορετικές μελέτες . Επιπρόσθετες μελέτες απαιτούνται για την περαιτέρω διερεύνηση των περιοχών αυτών. Παρόλα αυτά, δεν πρέπει να λησμονείται ότι είναι πιθανό να υπάρχουν και άλλες χρωμοσωμικές περιοχές που να επηρεάζουν την ΠΠ (μη αναδειχθείσες στην παρούσα μελέτη).

Μόνον η περιοχή 18.3 περιλαμβάνει ένα υποψήφιο γονίδιο για την ΠΠ, το γονίδιο NEDD4L. Το γονίδιο NEDD4L διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στη ρύθμιση του ευαίσθητου στην αμιλορίδη επιθηλιακού διαύλου νατρίου στο άπω εσπειραμένο σωληνάριο και έχει συσχετιστεί με την ΠΠ, την υπέρταση και την ορθοστατική υπόταση (*Lacolley et al., 2009*). Τα υπόλοιπα σημαντικά τμήματα (με την εξαίρεση του 8.1) περιλαμβάνουν έναν μεγάλο αριθμό υποψηφίων γονιδίων για καρδιαγγειακά νοσήματα. Αλληλεπικαλυπτόμενες πηγές πληροφόρησης (ανάλυση σύνδεσης, μελέτες γονιδιακής έκφρασης και ΜΓΣ) είναι δυνατό να παρέχουν συγκλινουσες ενδείξεις (γονιδιωματική σύγκλιση) και να παρέχουν περαιτέρω κατανόηση των υποκείμενων μοριακών μηχανισμών της ΠΠ (*Kitsios & Zintzaras, 2009b*).

Η ύπαρξη ετερογένειας στην ανάλυση υπο-ομάδας για τα άτομα Καυκάσιας προέλευσης αποδίδεται περισσότερο σε αληθή αστάθεια των γενετικών επιδράσεων και σε διαφορές σχεδιασμού και διεξαγωγής των μελετών, παρά σε διαφορές των υπό μελέτη πληθυσμών.

Η ΠΠ εμφανίζει μια μικρή αύξηση στη νεαρή ηλικία που ακολουθείται από επιταχυνόμενη αύξηση μετά την ηλικία των 50 ετών. Αυτή η σχετιζόμενη με την ηλικία αύξηση της ΠΠ αποτελεί σε μεγάλο βαθμό δείκτη της αρτηριακής γήρανσης. Παρόλα αυτά, σε νεαρά άτομα, η κοιλιακή εξώθηση συμβάλλει σημαντικά στον καθορισμό της ΠΠ και συνεπώς οι αυξήσεις της ΠΠ δεν αντανακλούν την αρτηριακή σκληρία καθαυτήν (*Safar, 2000; Van Bortel et al., 2001; Safar et al., 2003; Safar & Smulyan, 2004*). Στην παρούσα μετα-ανάλυση, μόνον μία μελέτη συμπεριέλαβε ασθενείς με μικρή μέση ηλικία. Η εξαρτώμενη από την ηλικία μεταβολή της ΠΠ εμφανίζει σημαντική ετερογένεια μεταξύ διαφορετικών πληθυσμών. Αυτή η ετερογένεια επηρεάζεται σημαντικά από άλλα συμπαρομαρτούντα καρδιαγγειακά νοσήματα ή καρδιαγγειακούς παράγοντες κινδύνου. Καθώς τα κριτήρια επιλογής των διαφόρων μελετών δεν ήταν εναρμονισμένα μεταξύ τους, διαφορετική συσσώρευση καρδιαγγειακών παραγόντων κινδύνου στις διάφορες μελέτες πιθανώς να επέδρασε ως συγχυτικός παράγοντας στις αναλύσεις μας. Επιπλέον, οι διαφορετικές

μεθοδολογίες προσαρμογής της ΠΠ που χρησιμοποιήθηκαν από τις επιμέρους μελέτες πιθανώς να έχουν επηρεάσει τις αναλύσεις μας.

Πρόσφατα δεδομένα καταδεικνύουν ότι η ΠΠ παριστά έναν φαινότυπο στον οποίο το φύλο διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο, με τους άρρενες να εμφανίζουν υψηλότερες τιμές κληρονομικότητας (*Lacolley et al., 2009*). Η ενσωμάτωση φυλο-εξαρτώμενων μοντέλων σε μελλοντικές μελέτες ΣΕΓΣ αναμένεται να παρέχει ένα αναλυτικό πλαίσιο με αυξημένη στατιστική ισχύ.

Η ΠΠ αποτελεί έναν προσεγγιστικό δείκτη της αρτηριακής σκληρίας, κυρίως λόγω της εξάρτησής της από άλλους παράγοντες, όπως η ηλικία και η κοιλιακή εξώθηση. Πιο άμεσοι δείκτες αρτηριακής σκληρίας θεωρούνται η ταχύτητα του παλμικού κύματος (pulse wave velocity -PWV) και ο δείκτης αύξησης (augmentation index-AIx) (*Nichols et al., 2008;Safar, 2008*). Μέχρι στιγμής, μία μονον δημοσιευμένη εργασία από τη μελέτη του Framingham έχει χρησιμοποιήσει τον δείκτη PWV (καρωτίδας-μηριαίας αρτηρίας). Η χρήση πιο άμεσων δεικτών μέτρησης της αρτηριακής σκληρίας αναμένεται να ενισχύσει σημαντικά μελλοντικές προσπάθειες για τη διαλεύκανση της γενετικής της αρτηριακής σκληρίας (*Lacolley et al., 2009*).

Παρόλο που η συμβατική μεθοδολογία της HEGESMA (*Zintzaras & Ioannidis, 2005b;Zintzaras & Ioannidis, 2005a*) χρησιμοποιεί χρωμοσωμικά τμήματα μήκους 30cM, μια ανάλυση με τμήματα με μικρότερο μήκος θα μπορούσε να παρέχει επιπλέον πληροφορίες για περιοχές με πιθανή σύνδεση. Μια τέτοια ανάλυση αποφεύχθηκε λόγω έλλειψης περιοχών με πολύ ισχυρά ευρήματα σύνδεσης. Στην παρούσα ανάλυση έγινε προσαρμογή των αποτελεσμάτων για έλεγχο πολλαπλών υποθέσεων, παρά το γεγονός ότι η HEGESMA αποτελεί μια εξερευνητική μεθοδολογία που εστιάζει στη σχετική σημαντικότητα των διαφόρων περιοχών. Ανάλυση στατιστικής ισχύος δεν πραγματοποιήθηκε, δεδομένου ότι δεν υπάρχει διαθέσιμο στατιστικό λογισμικό για τέτοιου τύπου αναλύσεις.

Εναλλακτικές προσεγγίσεις για τη μετα-ανάλυση δεδομένων σύνδεσης αποτελούν α. Η κατασκευή ενός συνδυασμένου χάρτη δεικτών από τους αυθεντικούς γονοτύπους κάθε μελέτης και η διεξαγωγή νέας ανάλυσης σύνδεσης και β. ο συνδυασμός των τιμών  $P$  μετά από διόρθωση για το μήκος της συνδεδεμένης περιοχής. Το πλεονέκτημα της παρούσας μεθοδολογίας είναι α. δεν προαπαιτεί τη διαθεσιμότητα ακατέργαστων δεδομένων γονοτύπωσης, β. τα αποτελέσματα από διάφορες γενετικές αναλύσεις εντός μιας συγκεκριμένης μελέτης μπορούν να

συνδυαστούν ώστε να παρέχουν ένα μοναδικό σύνολο από βαθμολογίες, γ. δεν προαπαιτούνται υποθέσεις σχετικές με το πρότυπο κληρονόμησης και δ. παρέχεται δυνατότητα στατιστικού ελέγχου της ετερογένειας.

Συμπερασματικά, η παρούσα μετα-ανάλυση των μελετών ΣΕΓΣ για την ΠΠ (*Zintzaras et al., 2007*) παρείχε προκαρτικά ευρήματα σύνδεσης για νέες χρωμοσωμικές περιοχές (bin 6.2 για την κύρια ανάλυση και bin 10.4 για την ανάλυση στα άτομα με Καυκάσια προέλευση), και αναπαρήγαγε στατιστικά ευρήματα σύνδεσης για περιοχές που είχαν προσδιοριστεί από τις επιμέρους μελέτες (bins 18.3-18.4 και 21.1-22.2 για την κύρια ανάλυση και bin 22.1-22.2 για την ανάλυση στα άτομα με Καυκάσια προέλευση). Επιπρόσθετα, η μετα-ανάλυση επικύρωσε τη σύνδεση για την περιοχή 18.3, στην οποία εδράζεται ένα υποψήφιο γονίδιο για την ΠΠ (NEDD4L). Συνεπώς, γονοτύπωση των περιοχών αυτών με επιπλέον γενετικούς δείκτες σε εκτεταμένες οικογένειες είναι δυνατό να συνδράμει στον προσδιορισμό των υπεύθυνων γονιδίων για την ΠΠ.

## 2. Μελέτες γενετικής συσχέτισης

### **i.) Μελέτες υποψηφίου γονιδίου**

Η ανάλυση σύνδεσης που περιγράφηκε μέχρι στιγμής βρίσκει εφαρμογή στην αναζήτηση γονιδίων και γενετικών τόπων χρησιμοποιώντας γενετικό υλικό που προέρχεται από οικογένειες. Στο γενικό πληθυσμό έχουν εφαρμογή οι **μελέτες γενετικής συσχέτισης-ΜΓΣ (genetic association studies)**.

Οι ΜΓΣ εξετάζουν την ύπαρξη σχέσης μεταξύ μιας γενετικής μεταβλητής (αποκαλούμενη πολυμορφισμός) και ενός νοσήματος, πολλές φορές φαινομενικά άσχετου. Η ύπαρξη ενός αλληλίου σε ένα γενετικό τόπο, σε αυξημένη συχνότητα στους ασθενείς σε σχέση με ομάδα ελέγχου, ονομάζεται συσχέτιση (association) (*Zintzaras & Lau, 2008b; Zintzaras & Lau, 2008a*). Οι μελέτες συσχέτισης αποτελούν μια μορφή μελετών πασχόντων – μαρτύρων στις οποίες η συχνότητα ενός συγκεκριμένου γενετικού δείκτη [πολυμορφισμού - αλληλίου (π.χ. ένα αντιγόνο HLA)] σε ένα γενετικό τόπο συγκρίνεται μεταξύ ασθενών και υγιών στο γενικό πληθυσμό. Η ισχύς της συσχέτισης εκτιμάται από τον λόγο των αναλογιών-odds ratio (ή πηλίκο των διαγώνιων γινομένων), που υπολογίζεται σύμφωνα με το παρακάτω παράδειγμα:

	Με το αλλήλιο	Χωρίς το αλλήλιο
Πασχοντες	A	B
Μάρτυρες	Γ	Δ

*Πίνακας 9: Πίνακας πασχόντων-μαρτύρων σε σχέση με το αλλήλιο*

Ο λόγος των αναλογιών θα είναι τότε  $= A\Delta/B\Gamma$ . Αν η συχνότητα του αλληλίου ήταν η ίδια σε πάσχοντες και μάρτυρες, ο λόγος των αναλογιών θα ήταν 1. Η απόκλιση της τιμής του λόγου των αναλογιών από την τιμή 1 είναι ενδεικτική της ισχύος της συσχέτισης.

Οι μελέτες συσχέτισης αποτελούν ισχυρά εργαλεία για την ανάδειξη των γονιδίων αλλά και των συγκεκριμένων αλληλίων που συμβάλλουν σε γενετικά νοσήματα. Η απλότητα του προσδιορισμού γενετικών δεικτών με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) και η δυνατότητα χρησιμοποίησης γενετικού υλικού από τον γενικό πληθυσμό και όχι από οικογένειες, οδήγησε στην πραγματοποίηση πολύ μεγάλου αριθμού μελετών αυτού του τύπου τα τελευταία χρόνια (*Zintzaras & Lau,*

**2008b**). Εντούτοις, ο ενθουσιασμός που έχει περιβάλλει αυτές τις μελέτες έχει μετριαστεί από τα εγγενή τους προβλήματα:

1. Στατιστικά σφάλματα στις μελέτες γενετικής συσχέτισης:

*A. Σφάλματα τύπου I (ψευδώς θετικά αποτελέσματα)*

Η συσχέτιση μιας γενετικής μεταβλητής (πολυμορφισμού ή αλληλίου) με ένα νόσημα μπορεί να είναι πλασματική εξαιτίας αρκετών παραγόντων. Πρώτον, το γενετικό υπόβαθρο των πληθυσμών μπορεί να επηρεάσει τα αποτελέσματα. Εξαιτίας ιστορικών, γεωγραφικών και πολιτισμικών παραγόντων, ο ανθρώπινος πληθυσμός συντίθεται από μικρότερους υποπληθυσμούς, στους οποίους υπάρχουν ποικίλλουσες συχνότητες αλληλίων και διαφορετικές συχνότητες νοσημάτων. Εάν τα μέλη των υποπληθυσμών δε ζευγαρώνουν συχνά μεταξύ τους, τότε ένα νόσημα που τυχαίνει να είναι πιο κοινό σε έναν υποπληθυσμό θα εμφανίζεται να σχετίζεται (εσφαλμένα) με τα αλλήλια που επίσης τυχαίνει να είναι πιο κοινά στον υποπληθυσμό αυτό. Για την αποφυγή τέτοιων σφαλμάτων είναι σημαντική η σωστή διαστρωμάτωση του πληθυσμού κατά το σχεδιασμό της μελέτης. Η διαστρωμάτωση μπορεί να γίνει είτε με επιλογή ομοιογενούς πληθυσμού (π.χ. εθνικότητα, θρήσκευμα, καταγωγή κτλ.) είτε με τη χρησιμοποίηση ομάδας γονιδιωματικού ελέγχου, ανάλογης με το γενετικό υπόβαθρο των πασχόντων (**Zintzaras & Lau, 2008a**).

Δεύτερον, οι πολλαπλές δοκιμασίες (multiple testing) διογκώνουν τα ψευδώς θετικά αποτελέσματα. Σε μια γονιδιωματική αναζήτηση ή σε μια μελέτη που εξετάζει μεγάλο αριθμό υποψηφίων γονιδίων, μπορεί να παρατηρηθεί σφάλμα τύπου I λόγω της πολλαπλότητας των γονιδίων που εξετάζονται. Για την αποφυγή αυτών των σφαλμάτων χρησιμοποιείται η διόρθωση Bonferroni (ή άλλες διαδικασίες ελάττωσης του επιπέδου σημαντικότητας), σύμφωνα με την οποία διαιρείται το επίπεδο σημαντικότητας με τον αριθμό των δοκιμασιών που διεξάγονται (**Zintzaras & Lau, 2008a**).

Τρίτον, στις μελέτες αυτές οι πάσχοντες πιθανό να εμφανίζουν «κρυπτική» συσχέτιση, με την έννοια ότι φέρουν μια κοινή γενετική βάση για το νόσημα μολονότι αυτή είναι άσχετη με τον εξεταζόμενο γενετικό τόπο. Ειδικά όταν εξετάζονται πολλοί γενετικοί δείκτες, η κρυπτική συσχέτιση θα εμφανιστεί σχεδόν πάντα.

*B. Σφάλματα τύπου II (ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα).*

Ο σχεδιασμός μιας μελέτης με επαρκές μέγεθος δείγματος εξασφαλίζει μια λογική πιθανότητα ανίχνευσης συσχέτισης όταν είναι υπαρκτή και ότι τα υπολογιζόμενα

μεγέθη εκτιμώνται με αρκετή ακρίβεια. Στις μελέτες συσχέτισης μονογονιδικών νοσημάτων, το μέγεθος του απαιτούμενου δείγματος είναι συνάρτηση αρκετών παραγόντων όπως: το υποκείμενο πρότυπο κληρονομής, το μέγεθος του αποτελέσματος, οι συχνότητες των γονιδίων και ο φαινότυπος (end-point) που εξετάζεται (*Zintzaras & Lau, 2008b; Zintzaras & Lau, 2008a*).

Στην περίπτωση των πολυπαραγοντικών νοσημάτων, το μέγεθος των δειγμάτων, πλην των παραπάνω επηρεάζεται και από δύο ακόμη βιολογικά φαινόμενα: την αλληλεπίδραση γονιδίων (επίσταση – epistasis) και την αλληλεπίδραση γονιδίων και περιβαλλοντικών παραγόντων (*Zintzaras & Zdoukopoulos, 2009; Kitsios & Zintzaras, 2007; Kitsios & Zintzaras, 2009a*).

## 2. Συσχέτιση ή αιτιολογική σύνδεση ;

Εφόσον επιβεβαιωθεί ότι μια συσχέτιση είναι στατιστικά σημαντική, απομένει να αποδειχθεί εάν σχετίζεται με την παθογένεια του νοσήματος. Αν για παράδειγμα βρεθεί μια πραγματική συσχέτιση μεταξύ μιας γενετικής μεταβλητής και της ταχείας εξέλιξης της καρδιακής ανεπάρκειας, η γνώση αυτή θα έχει αντίκτυπο και στην κλινική ιατρική και στις βασικές επιστήμες. Σε πληθυσμιακό επίπεδο, η συσχέτιση θα μπορούσε να συμβάλλει σε καλύτερη διαστρωμάτωση του πληθυσμού που αναμένει καρδιακή μεταμόσχευση. Σε επίπεδο βασικών επιστημών, θα είναι δυνατή η καλύτερη αναζήτηση των υποκείμενων παθογενετικών μηχανισμών και ο προσδιορισμός ενδεχόμενων νέων μοριακών στόχων προς φαρμακολογική παρέμβαση (*Kitsios & Zintzaras, 2007*).

Μια σημαντικότερη αρχή κατά την ερμηνεία των αποτελεσμάτων των μελετών συσχέτισης, είναι ότι οποιαδήποτε στατιστικώς σημαντική συσχέτιση αποτελεί ουσιαστικά συσχέτιση με μια περιοχή του γονιδιώματος. Συνεπώς, οποιοδήποτε γονίδιο που εδράζεται στην υπό μελέτη περιοχή θα μπορούσε να είναι το υπεύθυνο για το μελετώμενο νόσημα γονίδιο. Ο όρος ανισορροπία σύνδεσης (linkage disequilibrium) αναφέρεται σε πολυμορφισμούς που βρίσκονται σε μεγάλη γενετική εγγύτητα (*Ardlie et al., 2002; Kruglyak, 1997*). Αυτοί οι πολυμορφισμοί, βρίσκονται σε τόσο κοντινή φυσική θέση, ώστε πολύ λίγα γεγονότα ανασυνδυασμού έχουν συμβεί μεταξύ τους, στην εξελικτική τους ιστορία. Επομένως, οποιαδήποτε περιοχή σε απόλυτη ανισορροπία σύνδεσης με το «σχετιζόμενο» γονίδιο, θα δίνει το ίδιο στατιστικό σήμα με το αληθινό υπεύθυνο γονίδιο.

Τα πράγματα περιπλέκονται περισσότερο εξαιτίας της ύπαρξης των απλοτύπων (*Cardon & Abecasis, 2003*). Η ανισορροπία σύνδεσης δεν αποτελεί πάντα μια



λεπτομερή συνάρτηση της απόστασης μεταξύ των γονιδίων. Υπάρχουν σημαντικά δεδομένα ότι γονίδια μεταβιβάζονται μαζί, σε μεγάλα τμήματα, που αποκαλούνται απλότυποι (Ardlie *et al.*, 2002; Kruglyak, 1997). Οι απλότυποι ποικίλλουν σε μέγεθος και είναι δυνατό να περιέχουν διάφορους αριθμούς γονιδίων. Οι απλότυποι εμφανίζονται να μεταβιβάζονται από γενιά σε γενιά με ελάχιστες αλλαγές (ανασυνδυασμούς) στην πορεία του χρόνου (Cardon & Abecasis, 2003; Liu *et al.*, 2005). Η εντόνως διατηρημένη φύση των απλοτύπων δεν επιτρέπει διάκριση μεταξύ των γονιδίων που περιλαμβάνουν. Ουσιαστικά, υπάρχει στατιστικώς σημαντική συσχέτιση μεταξύ οποιουδήποτε γονιδίου της ομάδας. Έτσι, αν ένας φαινότυπος σχετίζεται με έναν γονότυπο που εδράζεται σε έναν διατηρημένο απλότυπο, το πραγματικό γονίδιο ενδιαφέροντος μπορεί να εντοπίζεται οπουδήποτε μέσα στον απλότυπο (Cardon & Abecasis, 2003).

#### Μετα-ανάλυση των μελετών υποψηφίου γονιδίου

Ο αριθμός των δημοσιευμένων μελετών υποψηφίου γονιδίου έχει αυξηθεί δραματικά κατά τα τελευταία έτη και αυτή η αυξητική τάση αναμένεται να επιταχυνθεί εξαιτίας της διαθεσιμότητας χαρτογραφημένων πολυμορφικών δεικτών και της ταχείας τεχνολογικής προόδου στις μεθόδους γονοτύπωσης. Παρόλα αυτά, ο αρχικός ενθουσιασμός για αυτού του είδους τις μελέτες έχει περιοριστεί από το γεγονός ότι οι περισσότερες ΜΓΣ αποτυγχάνουν να επαληθεύσουν την θετική συσχέτιση μιας παλαιότερης μελέτης (Lohmueller *et al.*, 2003). Αυτή η έλλειψη αναπαραγωγίμων αποτελεσμάτων πηγάζει από μια σειρά παραγόντων, σχετιζόμενων με το σχεδιασμό μιας μελέτης, τη στατιστική της ισχύ και γενετική και περιβαλλοντική ετερογένεια σε διάφορους πληθυσμούς. Επιπλέον, έχει αποδειχθεί ότι οι αρχικές μελέτες τείνουν να υπερεκτιμούν τις γενετικές επιδράσεις, ιδιαίτερα όταν περιλαμβάνουν μικρό αριθμό ατόμων (Zintzaras & Lau, 2008a; Zintzaras & Lau, 2008b). Σημαντική ετερογένεια μεταξύ των μελετών παρατηρείται συχνά και η παρουσία της έχει αποδοθεί κυρίως σε διαφορές μεταξύ μεγάλων και μικρών μελετών ή μεταξύ της πρώτης και των ακολούθων μελετών. Έχει προταθεί ότι μια συστηματική μετα-αναλυτική προσέγγιση θα μπορούσε να συμβάλλει στον ακριβέστερο υπολογισμό των γενετικών επιδράσεων σε επίπεδο πληθυσμού (Trikalinos *et al.*, 2008). Η μετα-ανάλυση εκτιμά την αθροιστική γενετική επίδραση για εξεταζόμενες συσχετίσεις γονιδίου-νοσήματος και αποτελεί ένα ισχυρό εργαλείο

για την επίλυση αντικρουόμενων ευρημάτων καθώς και για να μειώσει την αβεβαιότητα μεγέθους του εκτιμώμενου γενετικού κινδύνου. Ένα σημαντικό τμήμα της μετα-ανάλυσης είναι επίσης η διερεύνηση της ετερογένειας μεταξύ των ΜΓΣ. Η επισωρευτική μετα-ανάλυση (cumulative meta-analysis) παρέχει ένα πλαίσιο στο οποίο η αθροιστική γενετική επίδραση επανεκτιμάται κάθε φορά που δημοσιεύονται τα αποτελέσματα μιας νέας μελέτης (*Zintzaras & Lau, 2008a; Zintzaras & Lau, 2008b*).

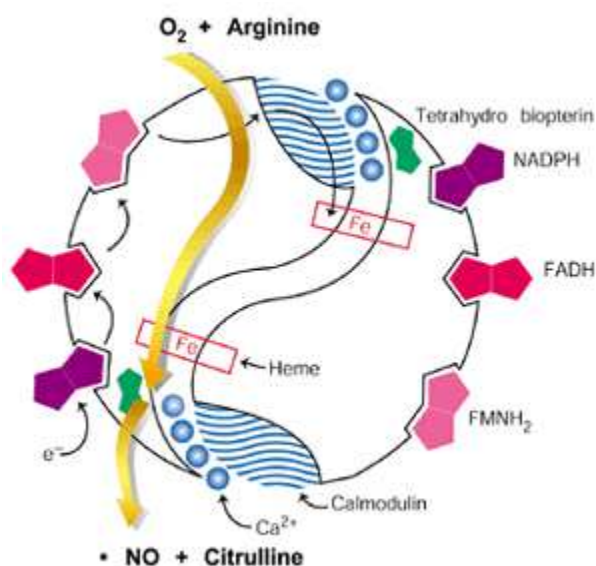
Οι μετα-αναλύσεις πολλαπλών ΜΓΣ έχουν έναν ξεκάθαρο ρόλο στο να προσφέρουν δυνατότητες ανάλυσης με αυξημένη στατιστική ισχύ. Ένα επιπρόσθετο πρόβλημα της έρευνας στη γενετική επιδημιολογία είναι το γεγονός ότι οι περισσότερες μελέτες δε συμμορφώνονται με της προταθείσες κατευθυντήριες οδηγίες σχεδιασμού και αναφοράς των μελετών (*Kitsios & Zintzaras, 2007*). Έχει προταθεί ότι η μετα-ανάλυση όλων των δημοσιευμένων μελετών είναι δυνατό να κατευθύνει την ερμηνεία των αιτίων αντικρουόμενων αποτελεσμάτων και μάλιστα κάθε δημοσίευση μιας ΜΓΣ να συνοδεύεται από μετα-ανάλυση των αντίστοιχων προηγούμενων μελετών (*Lohmueller et al., 2003; Chanock et al., 2007*). Οι δυνατότητες που προσφέρονται με αυτή την προσέγγιση συμπεριλαμβάνουν την ενίσχυση της στατιστικής ισχύος, τη δυνατότητα τοποθέτησης κάθε μελέτης στο πλαίσιο των υπολοίπων συναφών μελετών και τη δυνατότητα διευκρίνησης των λόγων για τους οποίους οι διάφορες μελέτες καταλήγουν σε διαφορετικά συμπεράσματα (*Zintzaras & Lau, 2008a; Zintzaras & Lau, 2008b*). Για το λόγο αυτό, οι επιμέρους ΜΓΣ θα πρέπει να σχεδιάζονται με την προοπτική ενσωμάτωσής τους σε μελλοντική μετα-ανάλυση και οι συγγραφείς των ΜΓΣ θα πρέπει να καθιστούν προσβάσιμες τις αναγκαίες πληροφορίες (*Kitsios & Zintzaras, 2007*). Επομένως, κάθε διερευνούμενη συσχέτιση δεν είναι δυνατό να θεωρείται ως ισχύουσα ή μη, αν δε συνοδεύεται από μια συστηματική μετα-ανάλυση όλων των διαθέσιμων επιδημιολογικών δεδομένων (*Chanock et al., 2007*).

**Ειδικός σκοπός 2: Η σύνθεση των δεδομένων των μελετών γενετικής συσχέτισης του γονιδίου *NOS3* στην υπέρταση ώστε να αποσαφηνιστεί ο ρόλος του γονιδίου και να διερευνηθούν πιθανές πηγές ετερογένειας μεταξύ των επιμέρους μελετών.**

**Μετα-ανάλυση μελετών γενετικής συσχέτισης του γονιδίου *NOS3* στην υπέρταση**

### ΓΟΝΙΔΙΟ *NOS3*

Η ενδοθηλιακή συνθετάση του μονοξειδίου του αζώτου [Endothelial nitric oxide synthase (eNOS)] αποτελεί μία από τις 3 ισομορφές του ενζύμου συνθετάση του μονοξειδίου του αζώτου που παρουσιάζουν σημαντική ομολογία αλληλουχίας και λειτουργικότητας (*Casas et al., 2006*). Το γονίδιο *NOS3* κλωνοποιήθηκε το 1993 και εντοπίζεται στη χρωμοσωμική περιοχή 7q35-36. Εκτείνεται σε μήκος 4.4 kb DNA, περιλαμβάνει 26 εξόνια και κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη 135-kD που περιέχει 1.203 αμινοξέα. Το ένζυμο eNOS συνθέτει NO διαρκώς μέσα από μια αντίδραση που περιλαμβάνει τη μετατροπή της of L-arginine σε L-citrulline.



Εικόνα 9. Σύνθεση NO από την ενδοθηλιακή συνθετάση του μονοξειδίου του αζώτου

Η καταλυτική ενεργότητα του ενζύμου προϋποθέτει την παρουσία αίμης και απαιτεί συμπαραγόντες, όπως οι ουσίες τετραϋδροβιοπτερίνη, μονονουκλεοτίδιο φλαβίνης και καλμοδουλίνη. Το NO δεν αποθηκεύεται αλλά απελευθερώνεται άμα τη σύνθεσή του. Συνεπώς, η δημιουργία του NO ρυθμίζεται από την έκφραση ή την

ενεργότητα του ενζύμου eNOS είτε από μεταβολές διαθεσιμότητας των συμπαραγόντων ή ενδογενών αναστολέων.

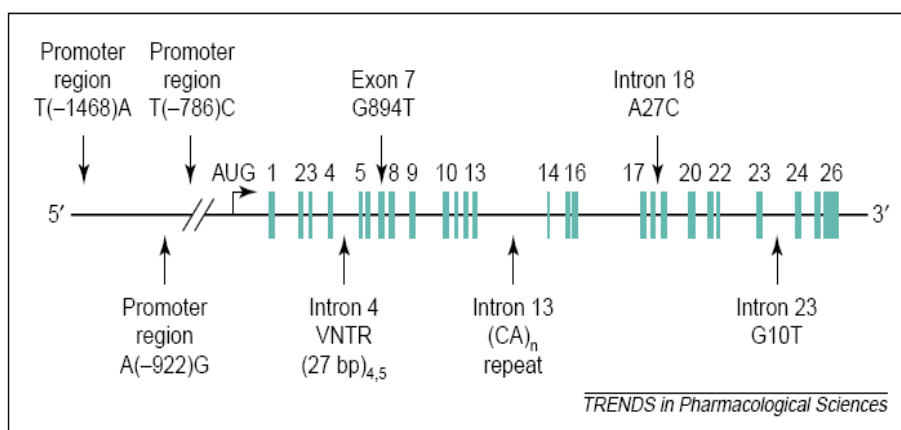
Το NO από το ενδοθήλιο θεωρείται ως ένας σημαντικός μεσολαβητής με αντιαθηρωματικές ιδιότητες (Cooke & Dzau, 1997; Hermann *et al.*, 2006). Επίκτητες δυσχέρειες στη γένεση του NO έχουν συσχετιστεί με επιδείνωση του καρδιαγγειακού προφίλ κινδύνου. Η ενδοθηλιοεξατώμενη, διαμεσολαβούμενη από τη ροή, διαστολή της βραχιόνιας αρτηρίας (μια απάντηση που θεωρείται σε μεγάλο βαθμό εξαρτώμενη από το NO) είναι ελαττωμένη σε νεαρούς, υγιείς ενήλικες που έχουν πρώτου βαθμού συγγένεια με θανόντα από στεφανιαία νόσο πριν την ηλικία των 55, σε σχέση με άτομα ίδιας ηλικίας χωρίς αντίστοιχο οικογενειακό ιστορικό (Vallance *et al.*, 1989; Hermann *et al.*, 2006).

Επιπλέον, ποντικοί με απόσβεση του γονιδίου NOS3 (knock-out mice) εμφανίζουν υπέρταση (Massion & Balligand, 2003; Huang, 1999). Δεδομένου ότι η βιοδιαθεσιμότητα του NO καθορίζεται στο επίπεδο της σύνθεσής του, το γονίδιο που κωδικοποιεί το ένζυμο eNOS έχει προκύψει λογικά ως ένα υποψήφιο γονίδιο για καρδιαγγειακά νοσήματα (Casas *et al.*, 2006).

### Γενετικοί πολυμορφισμοί

Το γονίδιο *NOS3* έχει μελετηθεί εκτεταμένα για την ύπαρξη γενετικής ποικιλομορφίας. Οι πολυμορφισμοί του γονιδίου περιλαμβάνουν πολυάριθμους μονονουκλεοτιδικούς πολυμορφισμούς (SNPs), έναν πολυμορφισμό ένθεσης/έλλειψης στο ιντρόνιο 4 και έναν μικροδορυφορικό δείκτη CA επαναλήψεων στο ιντρόνιο 13 (Casas *et al.*, 2006).

*Εικόνα 10. Γενετικοί πολυμορφισμοί του γονιδίου NOS3. (Wattanapitayakul et al., 2001).*



Ο μόνος συχνός πολυμορφισμός που οδηγεί σε αμινοξική αντικατάσταση στο μόριο της ώριμης πρωτεΐνης είναι ο πολυμορφισμός G894T ή Glu298Asp (rs1799983), στον οποίο μια αντικατάσταση γουανίνης/θυμίνης στο εξώνιο 7 οδηγεί σε αντικατάσταση γλουταμικού/ασπαρτικού οξέος στη θέση 298 της πρωτεΐνης. Έχουν επίσης περιγραφεί πολλοί πολυμορφισμοί στην περιοχή του προαγωγέα του γονιδίου, αν και δεν υπάρχουν σαφή δεδομένα για το εάν κάποιος εξ αυτών εδράζεται εντός της γνωστής αλληλουχίας κάποιου μεταγραφικού παράγοντα του *NOS3*. Αντίστοιχα, δεν έχουν περιγραφεί πολυμορφισμοί στην 3'-αμετάφραστη περιοχή του γονιδίου, οι οποίοι θα μπορούσαν να επηρεάσουν τη σταθερότητα του RNA μορίου (*Wattanapitayakul et al., 2001*).

Οι λειτουργικά σημαντικοί πολυμορφισμοί του γονιδίου δεν έχουν ακόμη καθοριστεί. Το επιστημονικό ενδιαφέρον έχει κυρίως επικεντρωθεί σε 3 δυνητικά λειτουργικούς πολυμορφισμούς: στον πολυμορφισμό T786C του προαγωγέα (rs2070744), στον πολυμορφισμό ένθεσης/έλλειψης του ιντρονίου 4 (4a/b) και στον πολυμορφισμό του εξωνίου 7 G894T.

#### Πολυμορφισμός T786C

Η θέση του πολυμορφισμού αυτού στην περιοχή του προαγωγέα του γονιδίου *NOS3* έχει δώσει το ερέθισμα για διενέργεια μελετών λειτουργικότητας. Χαμηλότερα επίπεδα mRNA και NO στον ορό έχουν βρεθεί σε άτομα φορείς του μεταλλαγμένου αλληλίου -786C. Πρόσφατα, έχει περιγραφεί μία πυρηνική πρωτεΐνη που παρουσιάζει διαφορετική συνδεσιμότητα με τους προαγωγείς του γονιδίου που φέρουν τα αλλήλια -786T και -786C. Επιπλέον, μελέτες για την αξιολόγηση της παραγωγής NO in vivo, έδειξαν ότι άτομα ομόζυγα για το αλλήλιο -786C είχαν ελαττωμένη μέγιστη απάντηση βραχιόνιας ροής αίματος στην ακετυλοχολίνη (*Wattanapitayakul et al., 2001*).

#### Πολυμορφισμός ένθεσης/έλλειψης του ιντρονίου 4 (4a/b)

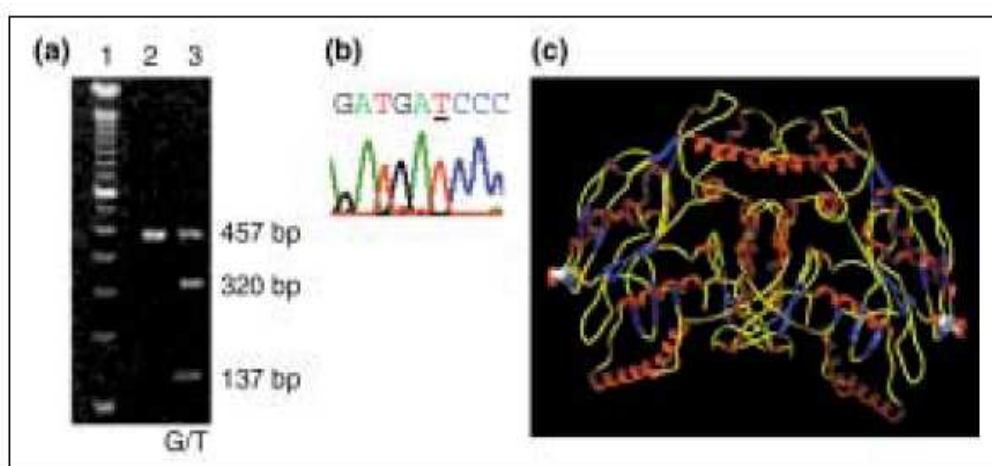
Δεδομένης της θέσης του πολυμορφισμού αυτού σε ιντρόνιο, οι πιθανότητες λειτουργικής του σημαντικότητας είναι μειωμένες. Παρόλα αυτά, είναι πιθανόν ότι ο πολυμορφισμός αυτός βρίσκεται σε ανισοροπία σύνδεσης με άλλα λειτουργικά αλλήλια σε ρυθμιστικές περιοχές του γονιδίου *NOS3*. Οι μελέτες λειτουργικότητας του πολυμορφισμού αυτού έχουν αποφέρει αντικρουόμενα αποτελέσματα. Ορισμένες μελέτες αναφέρουν ότι οι φορείς του μεταλλαγμένου αλληλίου έχουν ελαττωμένα

επίπεδα NO στο πλάσμα και μειωμένη πρωτεϊνική έκφραση του ενζύμου eNOS (*Wattanapitayakul et al., 2001*).

#### Πολυμορφισμός του εξωνίου 7 G894T (Glu298Asp)

Μελέτες αποσαφήνισης μοριακών μηχανισμών έχουν αναδείξει έναν λειτουργικό ρόλο του πολυμορφισμού G894T. Συσχετίσεις έχουν περιγραφεί με τη σύνθεση του NO και την ενδοθηλιακή λειτουργία (*Jachymova et al., 2001; Philip et al., 1999*). Επιπλέον, έχει προταθεί και ακριβής μοριακός μηχανισμός με τον οποίο ο πολυμορφισμός G894T επηρεάζει αρνητικά τη βιοδιαθεσιμότητα του NO. Η αντικατάσταση Glu298Asp εδράζεται εντός μια αγκύλης στην εξωτερική επιφάνεια της δομής και δεν έρχεται σε επαφή με το ενεργό κέντρο του ενζύμου ή τη δι-επιφάνεια διμερισμού, υποδηλώνοντας ότι αν ο πολυμορφισμός αυτός είναι λειτουργικός, η επίδρασή του θα ασκείται από έναν μηχανισμό ανεξάρτητο της κατάλυσης της eNOS (*Wattanapitayakul et al., 2001*). Πρόσφατα έχει περιγραφεί ότι η πρωτεΐνη eNOS που περιέχει το αμινοξύ Asp στη θέση 298 υπόκειται σε εκλεκτική πρωτεολυτική διάσπαση σε ενδοθηλιακά κύτταρα και αγγειακούς ιστούς. Εάν αυτή η παρατήρηση είναι ακριβής, τότε τα διασπασμένα θραύσματα της eNOS θα στερούνται ενζυμικής ενεργότητας (*Wattanapitayakul et al., 2001*).

Εικόνα 11. Θέση του πολυμορφισμού G894T στο μόριο της πρωτεΐνης eNOS. (*Wattanapitayakul et al., 2001*).



Μελέτες σε ανθρώπους έχουν δείξει ότι άτομα ομόζυγα για το αλληλίο 894T εμφανίζουν ελαττωμένη μείωση της αρτηριακής πίεσης κατόπιν προπονήσεως, και

χαμηλότερη βασική ροή αίματος και ελαττωμένη αγγειοδιασταλτική απάντηση στην αδενοσίνη στις στεφανιαίες τους αρτηρίες (*Cooke & Dzau, 1997; Vallance et al., 1989*). Επιπρόσθετα, σε ορισμένες μελέτες, τα άτομα ομόζυγα για το αλληλίο 894T εμφανίζουν ενισχυμένη συστηματική αγγειοσυσπαστική απάντηση στην φαινυλεφρίνη και ελαττωμένη αγγειοδιαστολή διαμεσολαβούμενη από ροή στη βραχιόνιο αρτηρία (*Thomas et al., 2003; Cooke & Dzau, 1997*).

Ο κεντρικός ρόλος του NO στη ρύθμιση της καρδιαγγειακής ομοιόστασης και οι πιθανές λειτουργικές επιπτώσεις συχνών πολυμορφισμών του γονιδίου NOS3 αποτέλεσαν το έναυσμα πολλών μελετών υποψηφίου γονιδίου (NOS3) στην υπέρταση (*Hermann et al., 2006; Casas et al., 2006*). Δυστυχώς όμως, τα αποτελέσματα των ΜΓΣ για το γονίδιο NOS3 στην υπέρταση είναι αντικρούμενα και μη συμπερασματικά, γεγονός που τουλάχιστον εν μέρει οφείλεται στο μικρό αριθμό ατόμων που εξετάστηκαν στις μελέτες αυτές, με αποτέλεσμα να μην υπάρχει επαρκής στατιστική ισχύς για την ανίχνευση συσχέτισης. Επιπλέον, η ερμηνεία των μελετών αυτών περιπλέκεται από το γεγονός ότι οι μελέτες αυτές διεξήχθησαν σε διαφορετικούς πληθυσμούς, με διαφορετικές στρατηγικές δειγματοληψίας, διαδικασίες γονοτύπωσης, και διαφορετικό αριθμό εξετασθέντων γενετικών τόπων. Προκειμένου να διαφωτιστούν τα αντικρούμενα αποτελέσματα και να μειωθεί η αβεβαιότητα σχετικά με το μέγεθος του εκτιμώμενου γενετικού κινδύνου, προχωρήσαμε στη διεξαγωγή μιας μετα-ανάλυσης όλων των διαθέσιμων ΜΓΣ για τους πολυμορφισμούς G894T (Glu298Asp), 4b/a, T786C και G23T στην υπέρταση (*Zintzaras et al., 2006b*). Επιπλέον, επιχειρήθηκε ανίχνευση ύπαρξης στατιστικής ετερογένειας και συστηματικού σφάλματος στα αποτελέσματα των μελετών. Τέλος, διεξήχθησαν επισωρευτικές και ανάδρομες επισωρευτικές μετα-αναλύσεις για όλους τους υπό εξέταση πολυμορφισμούς.

## **Υλικά και Μέθοδοι**

### *Επιλογή των μελετών*

Όλες οι δημοσιευμένες μελέτες πριν το Μαΐο του 2006 προσδιορίστηκαν με εκτεταμένες συστηματικές αναζητήσεις των βάσεων δεδομένων PubMed και EMBASE. Χρησιμοποιήθηκε το ακόλουθο κριτήριο αναζήτησης: (“eNOS” or “endothelial nitric oxide synthase” or “NOS3”) and “polymorphism” and (“hypertension” or “blood pressure”). Οι μελέτες που προσδιορίστηκαν αξιολογήθηκαν για την καταλληλότητά τους να συμπεριληφθούν στη μετα-ανάλυση.

Οι βιβλιογραφικές αναφορές των επιμέρους μελετών εξετάστηκαν για το ενδεχόμενο να καταχωρούν μελέτες μη ανιχνευθείσες από την κύρια αναζήτηση. Περιγραφές μεμονωμένων περιστατικών και άρθρα ανασκόπησης εξαιρέθηκαν της αναζήτησης. Η αναζήτηση περιορίστηκε σε άρθρα δημοσιευμένα στην Αγγλική γλώσσα.

ΜΓΣ με καθορισμένη κατανομή των γονοτύπων των πολυμορφισμών G894T, 4b/a, T786C, και G23T σε πάσχοντες με υπέρταση και σε υγιείς/νορμοτασικούς ενήλικες κρίθηκαν κατάλληλες για τη μετα-ανάλυση. Ως πάσχοντες από υπέρταση θεωρήθηκαν άτομα με ΣΑΠ>140mmHG ή ΔΑΠ>90 mmHG ή αναφερόντουσαν ως πάσχοντες από υπέρταση ή είχαν τεθεί σε αντι-υπερτασική αγωγή. Στην περίπτωση μελετών με αλληλοεπικαλυπτόμενα δείγματα, η μεγαλύτερη μελέτη με εξαγόμενα δεδομένα θεωρήθηκε ως η κατάλληλη για να συμπεριληφθεί στη μετα-ανάλυση.

#### *Εξαγωγή των δεδομένων*

Σε κάθε μελέτη καταγράφηκαν οι ακόλουθες πληροφορίες: Πρώτος συγγραφέας, Περιοδικό δημοσίευσης της εργασίας, έτος δημοσίευσης, εθνικότητα του μελετώμενου πληθυσμού, δημογραφικά στοιχεία, κλινικά χαρακτηριστικά, ταύτιση με ομάδα ελέγχου, εγκυρότητα της μεθόδου γονοτύπωσης, και αριθμός πασχόντων και μαρτύρων για τον κάθε γονότυπο των πολυμορφισμών G894T (Glu298Asp), 4b/a, T786C, και G23T. Επιπλέον, καταγράφηκε το εάν η διαδικασία γονοτύπωσης κάθε μελέτης διεξήχθη εν αγνοία των κλινικών δεδομένων. Στις μελέτες που εξέτασαν >1 πολυμορφισμών, καταγράφηκαν διαθέσιμες πληροφορίες σχετικές με την ανισορροπία σύνδεσης και τους απλοτύπους του γονιδίου.

#### *Ανάλυση των δεδομένων*

Προ της κύριας μετα-ανάλυσης, η σημαντικότητα συσχέτισης για την αντίθεση αλληλίων (G894T G versus T, 4b/a b versus a, T786C T versus C, and G23T G versus T), το υπολειπόμενο (G894T GG versus GT+TT, 4b/a bb versus ba+aa, T786C TT versus TC+CC, και G23T GG versus GT+TT), και το επικρατούν μοντέλο κληρονόμησης (G894T GG+TG versus TT, 4b/a bb+ba versus aa, T786C TT+TC versus CC, και G23T GG+GT versus TT) αξιολογήθηκαν σε κάθε μελέτη ξεχωριστά. Όλες οι συσχετίσεις περιγράφονται ως λόγος αναλογιών (odds ratios-ORs) με τα αντίστοιχα διαστήματα εμπιστοσύνης 95% (95% CI). Με βάση τα επιμέρους ORs υπολογίστηκε ένα αθροιστικό OR (*Zintzaras & Lau, 2008b; Zintzaras & Lau, 2008a*). Η ετερογένεια μεταξύ των μελετών σχετικά με το βαθμό συσχέτισης



ελέγχθηκε με τη στατιστική δοκιμασία Q-statistic, το οποίο είναι ένα σταθμισμένο σύνολο των υψωμένων στο τετράγωνο αποκλίσεων των OR των επιμέρους μελετών από το αθροισμένο OR. Όταν τα ORs είναι ομογενή, το Q-statistic ακολουθεί μια κατανομή  $\chi^2$  με  $r-1$  ( $r$  είναι ο αριθμός των μελετών) βαθμών ελευθερίας. Εάν η τιμή της πιθανότητας  $p$  είναι  $<0.10$ , τότε η ετερογένεια θεωρείται στατιστικά σημαντική. Η ετερογένεια ποσοτικοποιήθηκε με τη μέτρηση  $I^2$  [ $I^2=(Q-df)/Q$ ], η οποία είναι ανεξάρτητη του αριθμού των μελετών που συμπεριελήφθησαν στην μετα-ανάλυση. Η μέτρηση  $I^2$  είναι δυνατό να λάβει τιμές μεταξύ 0% και 100%, με τις μεγαλύτερες τιμές να δηλώνουν μεγαλύτερο βαθμό ετερογένειας (0% - 25%: καθόλου ετερογένεια, 25% - 50%: μετρίου βαθμού ετερογένεια, 50% - 75%: μεγάλου βαθμού ετερογένεια, 75% - 100%: μέγιστη ετερογένεια). Το αθροισμένο OR υπολογίστηκε με τη χρήση του μοντέλου συγκεκριμένων επιδράσεων [fixed effects (FEs, Mantel–Haenszel)] και τυχαίων επιδράσεων [random effects (REs, DerSimonian and Laird)]. Ο υπολογισμός του αθροισμένου OR έγινε με τη χρήση ενός παράγοντα στάθμισης ( $w_i$ ), ο οποίος ορίστηκε ως το αντίστροφο της διακύμανσης του  $\ln OR$  κάθε μελέτης. Το μοντέλο RE υποθέτει μια αληθή ετερογένεια στα αποτελέσματα των διαφόρων μελετών ενσωματώνοντας στους υπολογισμούς μια μεταξύ-των-μελετών διακύμανση. Επομένως, όταν διαπιστώνεται η ύπαρξη στατιστικής ετερογένειας μεταξύ των μελετών, το αθροισμένο OR υπολογίζεται με το μοντέλο RE (*Kitsios & Zintzaras, 2007; Kitsios & Zintzaras, 2009a*). Η επισσωρευτική και ανάστροφη επισσωρευτική μετα-ανάλυση διεξήχθησαν για κάθε πολυμορφισμό προκειμένου να αξιολογηθεί η τάση μεταβολής του RE OR στο χρόνο. Στην επισσωρευτική μετα-ανάλυση, οι μελέτες τοποθετούνται χρονολογικά με βάση το έτος δημοσίευσης και στο τέλος κάθε έτους υπολογίζεται το αθροιστικό OR (δηλ. σε κάθε βήμα πληροφόρησης). Στην ανάστροφη επισσωρευτική μετα-ανάλυση, υπολογίζεται η σχετική μεταβολή του αθροισμένου OR σε κάθε βήμα πληροφόρησης (OR στο επόμενο έτος/OR στο τρέχον έτος). Επομένως, η επισσωρευτική και ανάστροφη επισσωρευτική μετα-ανάλυση παρέχουν ένα πλαίσιο για την ανανέωση της υπολογιζόμενης γενετικής επίδρασης από όλες τις μελέτες και μια εκτίμηση του βαθμού μεταβολής της γενετικής επίδρασης με τη συσσώρευση πληροφορίας (*Zintzaras & Lau, 2008b; Zintzaras & Lau, 2008a*). Πιθανή ύπαρξη διαφοράς εκτιμώμενου μεγέθους των γενετικών επιδράσεων σε μελέτες μεγάλου και μικρού μεγέθους εκτιμήθηκε με τη χρήση της δοκιμασίας εξάρτησης Egger για την ασυμμετρία του γραφήματος κώνου. Δεδομένου ότι η εξέταση αυτή υστερεί σε στατιστική ισχύ, ως επίπεδο σημαντικότητας ορίστηκε

το 10%. Επιπρόσθετα στην κύρια ανάλυση, διεξήχθησαν αναλύσεις υπο-ομάδας με βάση την εθνικότητα. Η κατανομή των γονοτύπων στην ομάδα ελέγχου εξετάστηκε για συμφωνία με την προβλεπόμενη υπό την υπόθεση της ισοροπίας Hardy–Weinberg (HWE,  $P < 0.05$ ). Μελέτες που δεν πληρούσαν την ισοροπία HWE υποβλήθηκαν σε ανάλυση ευαισθησίας (Zintzaras & Lau, 2008b; Zintzaras & Lau, 2008a). Στην ανάλυση ευαισθησίας, εξετάζεται η επίδραση στο εκτιμώμενο γενετικό αποτέλεσμα μετά την εξαίρεση συγκεκριμένων μελετών. Οι αναλύσεις έγιναν με τα ακόλουθα λογισμικά: Meta-Analyst (Lau), StatsDirect (Microsoft Corp), CVP90 - Institute of Museum and Library Sciences library.

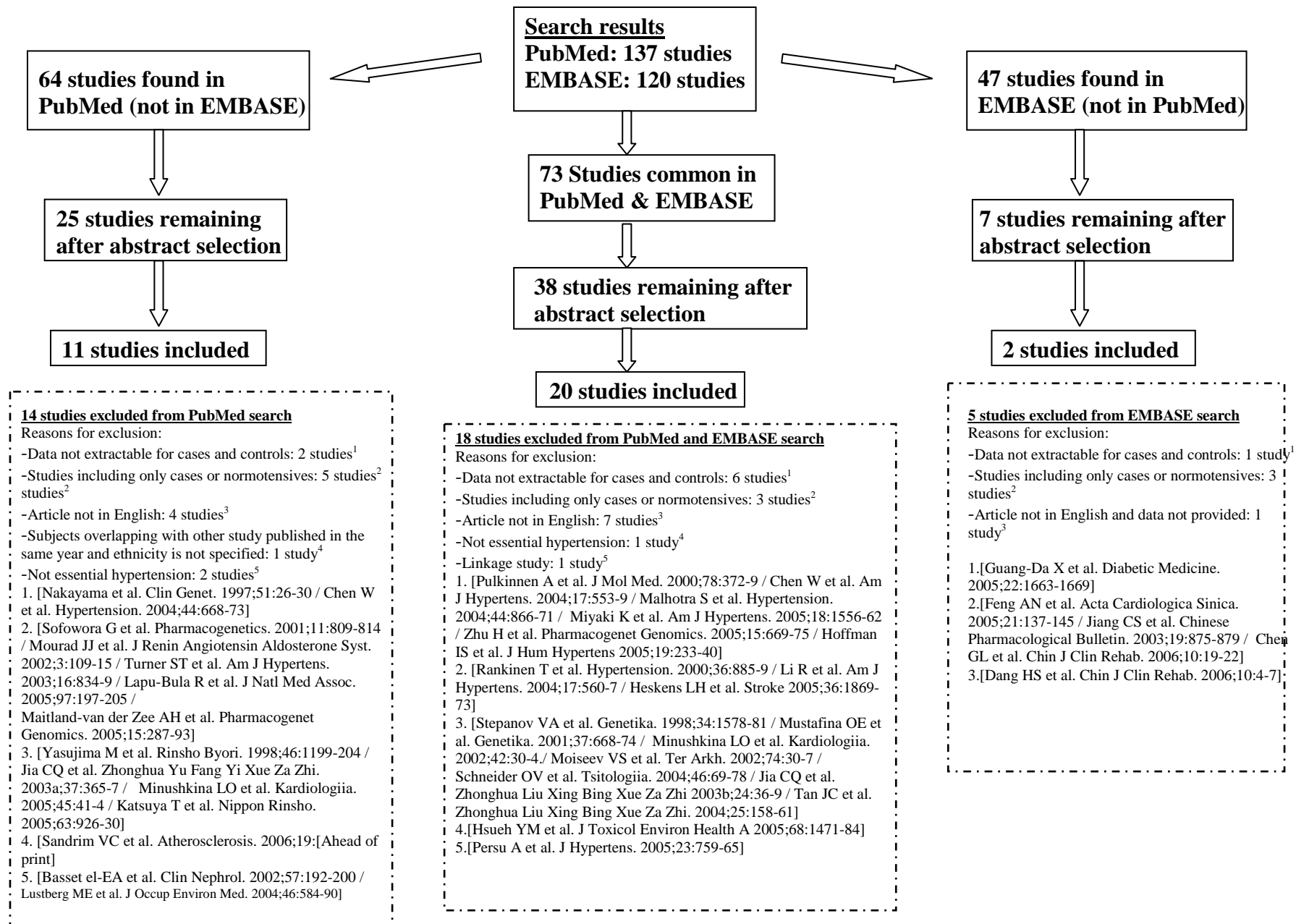
### **Αποτελέσματα**

#### *Κατάλληλες μελέτες*

Η συστηματική βιβλιογραφική αναζήτηση προσδιόρισε 137 τίτλους στη βάση PubMed και 120 στη βάση EMBASE. Οι μελέτες αυτές αξιολογήθηκαν για την καταλληλότητά τους να συμπεριληφθούν στη μετα-ανάλυση. Δεδομένα από 33 άρθρα τα οποία πληρούσαν τα κριτήρια αποδοχής χρησιμοποιήθηκαν προς ανάλυση. Η εικόνα 12 παρουσιάζει ένα διάγραμμα ροής για τις συμπεριληφθείσες και τις εξαιρεθείσες μελέτες, με επεξήγηση των αντίστοιχων αιτιολογήσεων. Δύο μελέτες παρείχαν δεδομένα για 2 διαφορετικές εθνικότητες και για το λόγο αυτό συμπεριλήφθηκαν ως ξεχωριστές μελέτες.

21 μελέτες ανέλυσαν τον πολυμορφισμό G894T, 16 τον 4a/b, 7 τον T786C και 4 τον G23T. Ο σχεδιασμός σε 24 μελέτες ήταν της μορφής πασχόντων-μαρτύρων, 7 μελέτες ήταν προοπτικές μελέτες πληθυσμιακής ομάδας και 4 μελέτες ήταν συγχρονικές. Οι μελέτες είχαν δημοσιευθεί μεταξύ των ετών 1995 και 2006. Η γονοτύπωση των πολυμορφισμών G894T, T786C, και G23T, έγινε με τη μέθοδο αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) και πέψης του προϊόντος με ένζυμο περιορισμού ή PCR με ειδικούς για κάθε αλληλίο ανιχνευτές. 19 μελέτες διεξήχθησαν σε Καυκάσιους, 11 σε Ανατολικούς Ασιάτες, 2 σε μαύρους, 1 σε Τούρκους, 1 σε Άραβες και 1 σε μεικτό πληθυσμό.

Τα χαρακτηριστικά των μελετών που εξετάστηκαν στη μετα-ανάλυση παρέχονται στον Πίνακα 10.



### Περιγραφικά στατιστικά αποτελέσματα

Συνολικά, οι μελέτες παρείχαν 7779/10498 πάσχοντες/μάρτυρες για τον πολυμορφισμό G894T, 2216/3222 πάσχοντες/μάρτυρες για τον 4b/a, 2491/3913 πάσχοντες/μάρτυρες για τον T786C, και 833/587 για τον G23T.

11 μελέτες δεν παρείχαν δεδομένα για κάθε γονότυπο ξεχωριστά αλλά παρείχαν δεδομένα για τους φορείς του μεταλλαγμένου αλληλίου ή τη συχνότητα των αλληλίων σε πάσχοντες/μάρτυρες. Η κατανομή των γονοτύπων για κάθε πολυμορφισμό παρέχεται στον Πίνακα 11.

Η κατανομή των γονοτύπων στους μάρτυρες απέκλινε από την ισορροπία HWE σε 1 μελέτη ενώ δεν ήταν δυνατό να εξεταστεί σε όλες τις μελέτες. Δεδομένου ότι αποκλίσεις από την ισορροπία HWE υποδεικνύουν πιθανά σφάλματα γονοτύπωσης ή/και διαστρωμάτωση πληθυσμού (*Zintzaras & Lau, 2008a; Kitsios & Zintzaras, 2007*), πραγματοποιήθηκε ανάλυση ευαισθησίας εξαιρώντας τις ανωτέρω μελέτες. Μόνον 3 μελέτες πραγματοποίησαν ανάλυση απλοτύπων. Μία μελέτη ανέφερε την ύπαρξη ανισορροπίας σύνδεσης μεταξύ των πολυμορφισμών G894T και 4b/a, 1 μελέτη μεταξύ 4b/a και G23T, και 2 μελέτες μεταξύ G894T και T786C.

### Κύρια αποτελέσματα, Ανάλυση υπο-ομάδας και ευαισθησίας

Ο πίνακας 12 και η εικόνα 13 παρουσιάζουν τα αποτελέσματα της συσχέτισης κάθε πολυμορφισμού με τον κίνδυνο ανάπτυξης υπέρτασης.

Για τον πολυμορφισμό G894T και τη συσχέτισή του με υπέρταση, η ανάλυση αντίθεσης αλληλίων (G versus T) έδειξε μη σημαντική ετερογένεια μεταξύ των μελετών ( $p=0.13$ ,  $I^2=29\%$ ) και τα FE και RE αθροιστικά ORs ήταν μη σημαντικά [1.00 (95% CI: 0.95-1.06) και 1.01 (95% CI: 0.93-1.10), αντίστοιχα]. Στην ανάλυση υπο-ομάδας, η συσχέτιση ήταν μη σημαντική για Καυκάσιους και Ασιάτες. Το υπολειπόμενο και το επικρατούν μοντέλο παρήγαγαν αντίστοιχα αποτελέσματα. Το υπολειπόμενο μοντέλο στους μαύρους επίσης δεν έδειξε ύπαρξη σημαντικής συσχέτισης.

Για τον πολυμορφισμό 4b/a, η συνολική ετερογένεια δεν ήταν σημαντική ( $p=0.82$ ,  $I^2=0\%$ ) και το αλληλίο b συσχετίστηκε με ελάττωση του κινδύνου εμφάνισης υπέρτασης κατά 15% συγκρινόμενο με το αλληλίο a (FE OR: 0.85, 95% CI: 0.74-0.98). Στην ανάλυση υπο-ομάδας, η συσχέτιση ήταν οριακά σημαντική στους Καυκάσιους (FE OR: 0.83, 95% CI: 0.69-0.99). Συνολικά και στους

Καυκάσιους, το υπολειπόμενο μοντέλο εμφάνισε σημαντικά αποτελέσματα (FE OR: 0.78, 95% CI: 0.68-0.90 και FE OR: 0.76, 95% CI: 0.62-0.92, αντίστοιχα). Αντίθετα, στις μελέτες με Ασιατικούς πληθυσμούς, η ανάλυση δεν έδειξε σημαντικά αποτελέσματα. Το επικρατούν μοντέλο δεν εμφάνισε σημαντική συσχέτιση επίσης.

Σχετικά με τον πολυμορφισμό T768C, η ετερογένεια μεταξύ των μελετών δεν ήταν σημαντική ( $p=0.39$ ,  $I^2=4\%$ ) και η ανάλυση δεν ανίχνευσε συσχέτιση για την αντίθεση αλληλίων T versus C (FE OR: 0.92, 95% CI: 0.82-1.02). Το υπολειπόμενο και το επικρατούν μοντέλο δεν εμφάνισαν σημαντική συσχέτιση συνολικά ή στην ανάλυση υπο-ομάδας. Τέλος, σε καμία από τις αναλύσεις για τον πολυμορφισμό G23T δεν παρουσιάστηκε σημαντικότητα και η ετερογένεια μεταξύ των μελετών δεν ήταν σημαντική. ( $p=0.17$ ,  $I^2=44\%$ ). Η ανάλυση ευαισθησίας δεν τροποποίησε το πρότυπο των αποτελεσμάτων για κανένα πολυμορφισμό ή εξεταζόμενο μοντέλο.

#### *Πιθανά συστηματικά σφάλματα*

Καμία από τις μελέτες που αναλύθηκαν δεν ανέφερε ότι η γονοτύπωση πραγματοποιήθηκε εν αγνοία της κλινικής ταξινόμησης των ατόμων. Στην επισσωρευτική μετα-ανάλυση για το υπολειπόμενο μοντέλο, μόνον ο πολυμορφισμός 4b/a εμφάνισε στοιχεία συσχέτισης κατά τη συσσώρευση δεδομένων (Εικόνα 14). Στην ανάστροφη επισσωρευτική μετα-ανάλυση για το υπολειπόμενο μοντέλο, η σχετική μεταβολή των OR για τον πολυμορφισμό G894T διακυμάνθηκε γύρω από την τιμή της μονάδας (Εικόνα 15). Η σχετική μεταβολή των OR για τον πολυμορφισμό 4b/a έδειξε μια πτωτική πορεία παράλληλα με τη συσσώρευση δεδομένων ενώ η αντίστοιχη μεταβολή για τους πολυμορφισμούς T786C και G23T είχε αυξητική τάση. Η εξέταση Egger για το υπολειπόμενο μοντέλο έδειξε ότι δεν υπήρχε διαφορετικό μέγεθος γενετικής επίδρασης στις μεγάλες έναντι των μικρών μελετών, με την εξαίρεση του πολυμορφισμού 4b/a για τον οποίο παρατηρήθηκε οριακή σημαντικότητα ( $p=0.09$ ).

Πίνακας 10. Χαρακτηριστικά των μελετών που εξετάστηκαν στη μετα-ανάλυση.

Πρώτος συγγραφέας, έτος δημοσίευσης	Εθνικότητα	Πολυμορφισμός	Πάσχοντες					Μάρτυρες				
			Αριθμός (Α/Γ)	Ηλικία (έτη) mean±SD	BMI mean±SD	ΣΑΠ (mmHg) mean±SD	ΔΑΠ (mmHg) mean±SD	Αριθμός (Α/Γ)	Ηλικία (έτη) mean±SD	BMI mean±SD	ΣΑΠ (mmHg) mean±SD	ΔΑΠ (mmHg) mean±SD
Bonnardeaux,1995	Καυκάσιοι	G23T	198(97/101)	53.0± 10.4	25.4± 3.4	161± 22	100± 14	106(47/59)	44.3± 9.5	22.4± 2.5	123± 10	76± 8
Lacolley,1998	Καυκάσιοι	G894T, G23T	309(212/97)	49.4±1.2	25.7±0.4	157.0± 1.5	95.8± 1.2	123(77/55)	44.3±2.1	24.4±0.7	123.7± 2.0	76.5± 1.4
Miyamoto,1998	Ασιάτες	G894T 4b/a, G23T	623(346/277) 218	56.3±11.6	23.8±5	162±18	93.5±13.8	703(403/700) 240	54.2±13.2	23.1±2.7	125.8±11.9	76.9±10.6
Uwabo,1998	Ασιάτες	4b/a	123(75/48)	53.53±10.1	24.26±3.85	178.4±22.8	106.7±14.4	120(89/31)	51.5±7.2	22.96±2.89	115.9±12.4	70.9±10.6
Kato,1999	Ασιάτες	G894T	549(305/244)	63.1±9.8	23.7±2.8	164.0±18.2	100.8±9.2	513(310/203)	54.8±11.3	22.4±2.8	117.2±12.7	75.0±9.2
Benjafield,2000	Καυκάσιοι	G894T 4b/a	91(ΜΔ) 112(ΜΔ)	ΜΔ	ΜΔ	ΜΔ	ΜΔ	149(ΜΔ) 184(ΜΔ)	ΜΔ	ΜΔ	ΜΔ	ΜΔ
Shoji,2000	Ασιάτες	G894T, 4b/a	183(83/100)	56.9±9.6	25.4±3.5	160±20	95±11	193(67/126)	54.4±11.9	23.2±3.0	125±10	76±8
Kajiyama,2000	Ασιάτες	T786C	401(230/171)	56.5±11.5	23.9±5.1	161.8±18.5	93.6±13.7	456(267/189)	54.0±13.2	23.0±2.6	125.5±11.3	73.7±9.6
Yokoyama,2000	Ασιάτες	4b/a	107(82/25)	53.1±0.91	ΜΔ	ΜΔ	ΜΔ	362(248/114)	50.5±0.44	ΜΔ	ΜΔ	ΜΔ
Tsujita,2001	Ασιάτες	G894T, T786C	1539(ΜΔ)	60.1±12.3*	22.7±2.9*	ΜΔ	ΜΔ	2516(ΜΔ)	60.1±12.3*	22.7±2.9*	ΜΔ	ΜΔ
Jachymova,2001	Καυκάσιοι	G894T	119(82/37)	59.4±15.6	26.8±3.6	144.3±14.1	90.7±7.8	85(48/37)	55.6±14.3	26.5±3.3	125.7±12.0	81.2±7.1
Ukkola,2001	Καυκάσιοι	G894T	116	ΜΔ	ΜΔ	ΜΔ	ΜΔ	222	ΜΔ	ΜΔ	ΜΔ	ΜΔ
Chen,2001	Καυκάσιοι	G894T	43(ΜΔ)	29.3±5.0*	26.4±5.8*	ΜΔ	ΜΔ	678(ΜΔ)	29.3±5.0*	26.4±5.8*	ΜΔ	ΜΔ
	Μαύροι	G894T	49(ΜΔ)	28.6±5.2*	29.4±8.0*	ΜΔ	ΜΔ	251(ΜΔ)	28.6±5.2*	29.4±8.0*	ΜΔ	ΜΔ
Taniwaki,2001	Ασιάτες	4b/a	80(ΜΔ)	59.7±10.1*	23.4±2.2*	ΜΔ	ΜΔ	75(ΜΔ)	59.7±10.1*	23.4±2.2*	ΜΔ	ΜΔ
Karvonen,2002	Καυκάσιοι	G894T	505(248/257)	51.4±6.1	28.7±4.8	154.8±20.2	93.2±10.8	519(257/262)	51.9±6.2	26.5±4.2	142.8±20.7	85.8±10.7
Hyndman,2002	Καυκάσιοι	T786C	106(106/0)	53±11.4	ΜΔ	151±13	94±10	599(599/0)	44±8.3	ΜΔ	125±15	81±10
Derebecka,2002	Καυκάσιοι	G23T	108(74/34)	ΜΔ	ΜΔ	ΜΔ	ΜΔ	118(ΜΔ)	ΜΔ	ΜΔ	ΜΔ	ΜΔ
Rodriguez,2003	Καυκάσιοι	4b/a	217	59±9	28.22±3.49	148±26	86±14	202	57±8	26.61±3.55	127±18	75±10
Rossi,2003	Καυκάσιοι	T786C	137(115/22)	49±9	26.4±2.7	151±11	99±5	48(30/18)	42±16	23.8±3.2	123±10	78±7
Grandone,2003	Καυκάσιοι	4b/a	82(0/82)	35.5±8.9	ΜΔ	ΜΔ	ΜΔ	188(188F)	33.6±7.8	ΜΔ	ΜΔ	ΜΔ
Kimura,2003	Ασιάτες	4b/a	110(ΜΔ)	54.4±8.6*	23.1±3.1*	ΜΔ	ΜΔ	722(ΜΔ)	54.4±8.6*	23.1±3.1*	ΜΔ	ΜΔ
Fernandez,2004	Καυκάσιοι	G894T, T786C	105(71/34)	52.08±8.31	34.27±6.21	ΜΔ	ΜΔ	94(ΜΔ)	ΜΔ	ΜΔ	ΜΔ	ΜΔ
Kishimoto,2004	Ασιάτες	G894T	135(ΜΔ)	37.1± 8.5*	22.2± 2.7*	ΜΔ	ΜΔ	789(ΜΔ)	37.1± 8.5*	22.2± 2.7*	ΜΔ	ΜΔ
El-Kilany,2004	Arabs	G894T	20(ΜΔ)	ΜΔ	ΜΔ	ΜΔ	ΜΔ	10(ΜΔ)	37±7	ΜΔ	ΜΔ	ΜΔ
Djuric,2005	Καυκάσιοι	G894T	172(115/57)	49.2±12.1	26.9±3.4	ΜΔ	ΜΔ	200(117/83)	45.3±11.3	25.3±3.1	ΜΔ	ΜΔ

Wolff,2005	Καυκάσιοι	G894T	2229(1333/896)	57.4±14.3	28.9±4.6	151.7±17.6	90.0±10.8	1990(758/1232)	42.4±14.9	25.4±4.2	120.9±10.9	76.8±6.9
Heltianu,2005	Καυκάσιοι	G894T 4b/a	79(MΔ) 109(66/43)	54.3±12.3	MΔ	MΔ	MΔ	102(60/42) 84(MΔ)	38±1.5	MΔ	MΔ	MΔ
Czarnecka,2005	Καυκάσιοι	G894T, 4b/a	93(46/47)	44.2±4.7	27.3±3.9	MΔ	MΔ	201(89/112)	31.5±4.7	24.5±3.9	MΔ	MΔ
Gouni,2005	Καυκάσιοι	4b/a	255(144/111)	64.6±9.9	29.3±5.2	148±22	84±11	140(81/59)	60.3±11.8	27.6±4.7	131±12	79±8
Demirel,2005	Turks	4b/a	129(53/76)	45.0±6.4	MΔ	MΔ	MΔ	129(70/59)	35.6±6.8	MΔ	MΔ	MΔ
Xu,2005	Ασιάτες	4b/a	195(90/105)	MΔ	MΔ	MΔ	MΔ	182(74/108)	48±10	MΔ	MΔ	MΔ
Sandrim,2006	Καυκάσιοι	G894T, T786C 4b/a	112(44/68)	MΔ	MΔ	MΔ	MΔ	113(78/35)	MΔ	MΔ	MΔ	MΔ
	Μαύροι	G894T 4b/a-T786C	91(37/54)					87(56/31)				
Pereira,2006	Mixed	G894T	617	45.2±11.0*	26.0±4.8*	MΔ	MΔ	960	45.2±11.0*	26.0±4.8*	MΔ	MΔ

MΔ: μη διαθέσιμο

\*δεδομένα για πάσχοντες/μάρτυρες

*Πίνακας 11. Κατανομή των γονοτύπων των πολυμορφισμών G894T,4b/a, T786C, G23T για πάσχοντες και μάρτυρες (σε παρενθέσεις παρουσιάζονται τα αντίστοιχα ποσοστά)*

Πρώτος συγγραφέας, έτος δημοσίευσης	G894T						Συχνότητα αλληλίου			
	GG		GT		TT		G			
	Πάσχοντες	Μάρτυρες	Πάσχοντες	Μάρτυρες	Πάσχοντες	Μάρτυρες	Πάσχοντες	Μάρτυρες	Πάσχοντες	Μάρτυρες
Lacolley,1998	140(45)	35(28)	122(39)	67(54)	47(15)	21(17)	402(65)	137(55)	216(34)	109(44)
Miyamoto,1998	492(78)	631(89)	131(21) <sup>¶</sup>	72(10) <sup>¶</sup>						
Kato ,1999	461(83)	433(84)	84(15)	76(14)	4(0)	4(0)	1006(91)	942(91)	92(8)	84(8)
Benjafield ,2000	40(43)	70(46)	43(47)	68(45)	8(8)	11(7)	123(67)	208(69)	59(32)	90(30)
Shoji,2000	139(75)	164(84)	44(24) <sup>¶</sup>	29(15) <sup>¶</sup>						
Tsujita,2001	1300(84)	2103(83)	227(14)	393(15)	12(0)	20(0)	2827(91)	4599(91)	251(8)	433(8.)
Jachymova,2001							76(64)	63(74)	43(36)	22(26)
Ukkola,2001	59(51)	112(51)	48(41)	92(41)	9(8)	18(8)				
Chen,2001-Cauc.	22(51)	303(45)	21(49) <sup>¶</sup>	678(55) <sup>¶</sup>						
Chen,2001-Black	40(82)	201(80)	9(18) <sup>¶</sup>	50(20) <sup>¶</sup>						
Karvonen ,2002	244(48)	262(50)	220(43)	215(41)	41(8)	42(8)	708(70)	739(71)	302(29)	299(28)
Kishimoto ,2004	119(88)	679(86)	16(11)	100(12)	0(0)	10(1)	254(94)	1458(92)	16(5)	120(7.)
Fernandez,2004	45(42)	38(40)	42(40)	36(38)	18(17)	20(21)	132(62)	112(59)	78(37)	76(40)
El-Kilany,2004	4(20)	5(50)	10(50)	5(50)	6(30)	0				

Djuric,2005	84(48)	93(46)	71(41)	88(44)	17(9)	19(9)	239(69)	274(68)	105(30)	126(31)
Wolff ,2005	1099(49)	973(48)	925(41)	848(42)	205(9)	169(8)	3123(70)	2794(70)	1335(29)	1186(29)
Heltianu ,2005	37(46)	36(35)	42(53) <sup>§</sup>	66(64) <sup>§</sup>						
Czarnecka ,2005	51(54)	111(55)	40(43)	78(38)	2(2)	12(5)	142(76)	300(74)	44(23)	102(25)
Pereira ,2006	325(52)	536(55)	250(40)	368(38)	42(6)	56(5)	900(72)	1440(75)	334(27)	480(25)
Sandrim,2006-Cauc.	48(42)	53(46)	54(48)	53(46)	10(8)	7(6)	150(66)	159(70)	74(33)	67(29)
Sandrim,2006-Black	57(62)	45(51)	31(34)	36(41)	3(3)	6(6)	145(79)	126(72)	37(20)	48(27)
Total	4633(62)	6262(67)	2342(31)	2593(28)	409(5)	397(4)	10151(77)	13288(80)	2943(22)	3220(19)

Πρώτος συγγραφέας, έτος δημοσίευσης	4b/a						Συχνότητα αλληλίου			
	bb		ba		Aa		b		a	
	Πάσχοντες	Μάρτυρες	Πάσχοντες	Μάρτυρες	Πάσχοντες	Μάρτυρες	Πάσχοντες	Μάρτυρες	Πάσχοντες	Μάρτυρες
Miyamoto,1998	170(77)	192(80)	48(22) <sup>§</sup>	48(20) <sup>§</sup>						
Uwabo ,1998	97(78)	111(92)	24(19)	0(0)	2(1)	9(7)	218(88)	222(92)	28(11)	18(7.)
Benjafield,2000	89(79)	147(79)	23(20)	35(19)	0(0)	2(1)	201(89)	329(89)	23(10)	39(10)
Shoji,2000	143(78)	156(80)	40(21) <sup>§</sup>	37(19) <sup>§</sup>						
Yokoyama,2000							88(82)	290(80)	19(18)	72(20)
Taniwaki,2001	57(71)	56(75)	23(29)	17(23)	0	2(2)				
Rodriguez,2003	136(62)	149(73)	73(33)	48(23)	8(3)	5(2)	345(79)	346(85)	89(20)	58(14)
Grandone,2003	51(62)	123(65)	29(36)	63(34)	2(2)	2(1)	131(80)	309(82)	33(20)	67(18)
Kimura,2003	90(82)	578(80)	20(18) <sup>§</sup>	144(20) <sup>§</sup>						
Gouni,2005	184(72)	100(71)	62(24)	38(27)	9(3)	2(1)	430(84)	238(85)	80(15)	42(15)
Heltianu,2005	69(63)	66(78)	40(36) <sup>§</sup>	18(21) <sup>§</sup>						
Czarnecka,2005	59(63)	132(65)	33(35)	65(32)	1(1)	4(1)	151(81)	329(81)	35(18)	73(18)
Demirel,2005	97(75)	105(81)	31(24)	22(17)	1(1)	2(2)				
Xu,2005	158(81)	151(83)	37(19)	27(15)	0	4(2)				
Sandrim ,2006-Cauc.	78(70)	86(81)	30(27)	14(13)	3(2)	5(4)	186(83)	186(88)	36(16)	24(11)
Sandrim ,2006-Black	56(62)	57(67)	29(32)	24(28)	5(5)	4(4)	141(78)	138(81)	39(21)	32(18)
Total,	1081(71)	1196(76)	402(26)	327(21)	28(1)	31(1)	1672(83)	1788(86)	330(16)	286(13)

Πρώτος συγγραφέας, έτος	T786C						Συχνότητα αλληλίου			
	TT		TC		HWE		T		C	
	Πάσχοντες	Μάρτυρες	Μάρτυρες	Μάρτυρες	Πάσχοντες	Μάρτυρες	Πάσχοντες	Μάρτυρες	Πάσχοντες	Μάρτυρες



δημοσίευσης										
Kajiyama,2000	324(80)	362(79)	77(19) <sup>‡</sup>	94(20) <sup>‡</sup>						
Tsujita,2001	1215(78)	2023(80)	311(20)	462(18)	13(0.)	31(1.)	2741(89)	4508(89)	337(10)	524(10)
Hyndman ,2002	34(32)	240(40)	48(45)	277(46)	24(22)	82(13)	116(54)	757(63)	96(45)	441(36)
Rossi,2003	38(27)	16(33)	69(50)	22(45)	30(21)	10(20)	145(52)	54(56)	129(47)	42(43)
Fernandez,2004	26(24)	27(28)	50(47)	46(48)	29(27)	21(22)	102(48)	100(53)	108(51)	88(46)
Sandrim,2006- Cauc.	37(33)	36(31)	62(55)	61(53)	13(11)	16(14)	136(60)	133(58)	88(39)	93(41)
Sandrim,2006- Black	49(54)	41(47)	36(40)	41(47)	5(5)	4(4)	134(74)	123(71)	46(25)	49(28)
Total,	1723(69)	2745(70)	653(26)	1003(25)	114(4)	164(4)	3374(80)	5675(82)	804(19)	1237(17)

	G23T						Συχνότητα αλληλίου			
Πρώτος συγγραφέας, έτος δημοσίευσης	GG		GT		TT		G		T	
	Πάσχοντες	Μάρτυρες	Πάσχοντες	Μάρτυρες	Πάσχοντες	Μάρτυρες	Πάσχοντες	Μάρτυρες	Πάσχοντες	Μάρτυρες
Bonnardeaux,1995	94(47)	46(43)	83(41)	46(43)	21(10)	14(13)	271(68)	138(65)	125(31)	74(34)
Lacolley,1998	135(43)	66(53)	138(44)	46(37)	36(11)	11(8)	408(66)	178(72)	210(33)	68(27)
Miyamoto,1998	78(35)	79(32)	140(64)*	161(67)*						
Derebecka,2002	40(37)	50(42)	52(48)	55(46)	16(14)	13(11)	132(61)	155(65)	84(38)	81(34)
Total	347(41)	241(41)	413(49)	308(52)	73(8)	38(6)	811(65)	471(67)	419(34)	223(32)

Πίνακας 12. Αποτελέσματα μετα-ανάλυσης των πολυμορφισμών (a) G894T, (b) 4b/a, (c) T786C και (d) G23T για την ύπαρξη συσχέτισης με την υπέρταση.

(a)

G894T	Πληθυσμός	Fixed effects OR(95% CI)	Random effects OR(95% CI)	Μελέτες	I <sup>2</sup> (%)	p-value Q-test
G vs T	Συνολικά	1.00(0.95 to 1.06)	1.01(0.93 to 1.10)	16	29	0.13
	Συνολικά σε HWE	0.99(0.93 to 1.05)	0.99(0.93 to 1.05)	15	3	0.42
	Κauκάσιοι	1.01(0.94 to 1.08)	1.01(0.92 to 1.11)	10	17	0.29
	Ασιάτες	1.06(0.92 to 1.22)	1.06(0.92 to 1.22)	3	0	0.65
Υπολειπόμενο μοντέλο	Συνολικά	0.98(0.92 to 1.05)	1.01(0.87 to 1.17)	20	69	<0.01
	Συνολικά σε HWE	0.96(0.90 to 1.03)	0.97(0.84 to 1.11)	19	65	<0.01
	Κauκάσιοι	1.06(0.97 to 1.16)	1.13(0.96 to 1.34)	11	50	0.03
	Ασιάτες	0.86(0.76 to 0.98)	0.78(0.52 to 1.18)	5	87	<0.01
Επικρατούν μοντέλο	Συνολικά	0.97(0.84 to 1.12)	0.96(0.83 to 1.15)	15	0	0.86
	Συνολικά σε HWE	0.96(0.82 to 1.11)	0.95(0.82 to 1.11)	14	0	0.83
	Κauκάσιοι	0.98(0.83 to 1.15)	0.97(0.83 to 1.14)	9	0	0.86
	Ασιάτες	1.19(0.64 to 2.21)	1.10(0.59 to 2.04)	3	0	0.67

(b)

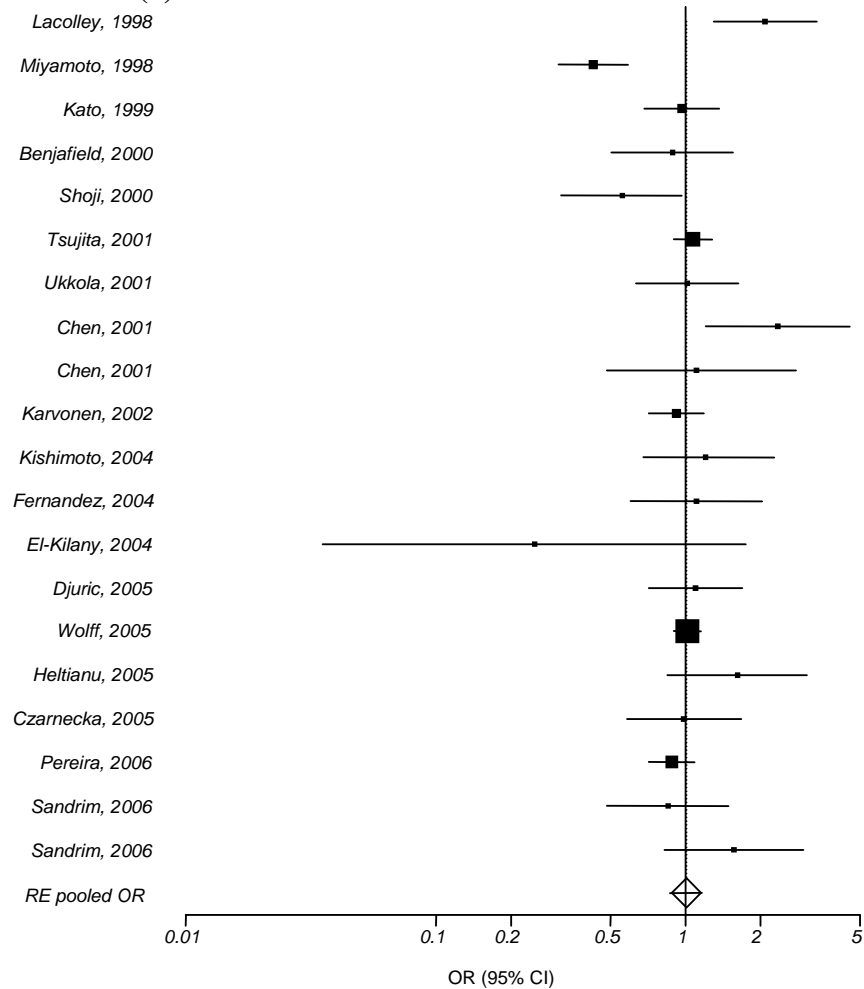
4b/a	Πληθυσμός	Fixed effects OR(95% CI)	Random effects OR(95% CI)	Μελέτες	I <sup>2</sup> (%)	p-value Q-test
b vs a	Συνολικά	0.85(0.74 to 0.98)	0.85(0.74 to 0.98)	12	0	0.82
	Κauκάσιοι	0.83(0.69 to 0.99)	0.83(0.69 to 0.99)	6	0	0.58
	Ασιάτες	0.94(0.71 to 1.24)	0.94(0.71 to 1.25)	4	0	0.54
Υπολειπόμενο μοντέλο	Συνολικά	0.78(0.68 to 0.90)	0.78(0.67 to 0.91)	15	12	0.32
	Κauκάσιοι	0.76(0.62 to 0.92)	0.76(0.60 to 0.95)	7	23	0.25
	Ασιάτες	0.83(0.67 to 1.04)	0.82(0.62 to 1.08)	6	33	0.19
Επικρατούν μοντέλο	Συνολικά	1.38(0.85 to 2.24)	1.28(0.71 to 2.29)	11	14	0.31
	Κauκάσιοι	0.86(0.45 to 1.61)	0.84(0.43 to 1.64)	6	0	0.58
	Ασιάτες	8.30(1.86 to 36.97)	5.68(1.62 to 19.85)	3	0	0.77

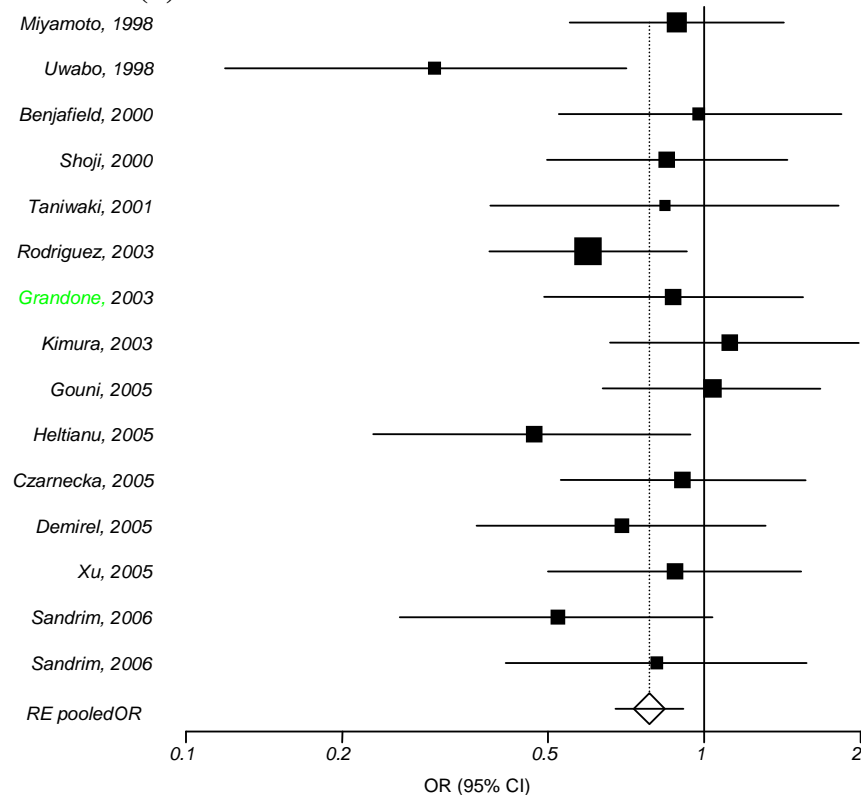
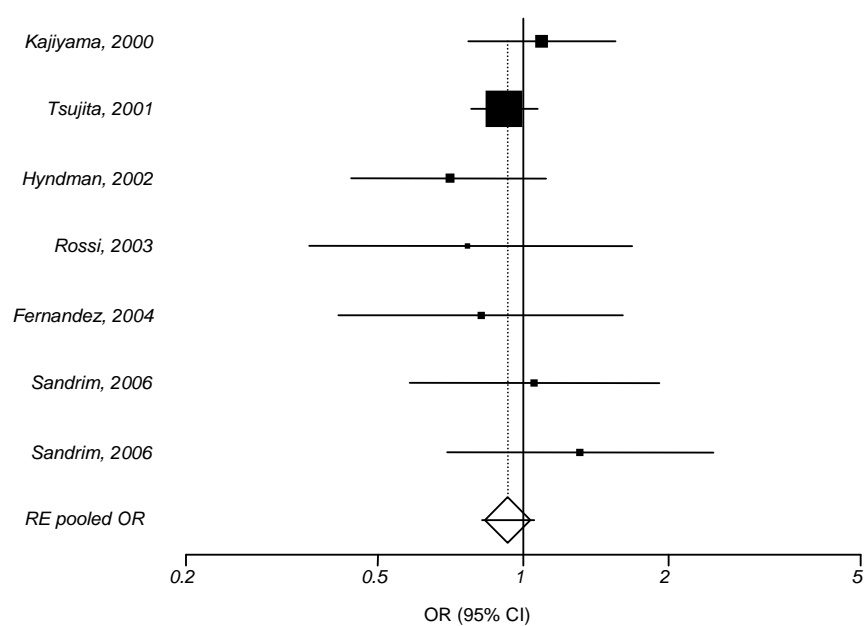
(c)

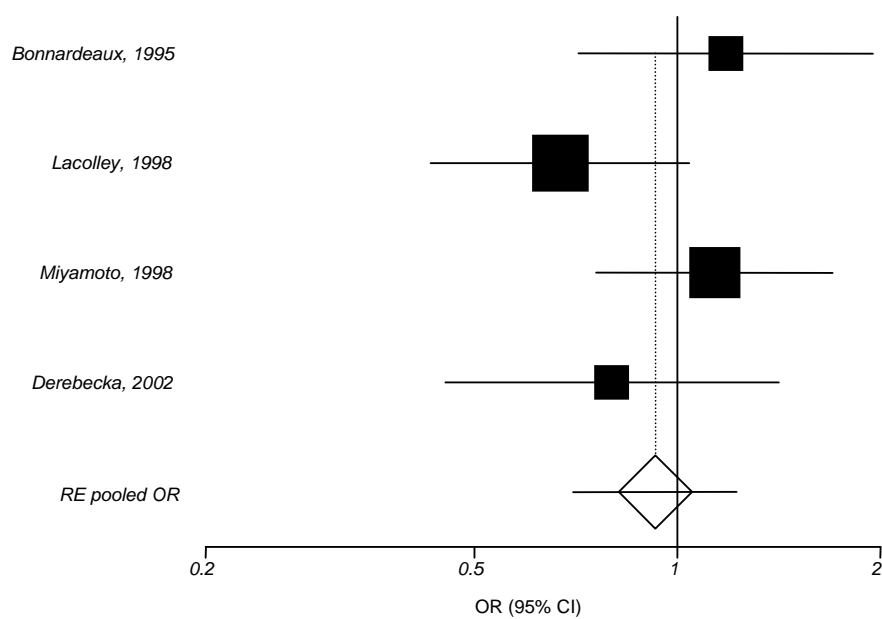
T786C	Πληθυσμός	Fixed effects OR(95% CI)	Random effects OR(95% CI)	Μελέτε ς	I <sup>2</sup> (%)	p-value Q-test
T vs C	Συνολικά	0.92(0.82 to 1.02)	0.91(0.81 to 1.03)	6	4	0.39
	Καυκάσιοι	0.84(0.70 to 1.01)	0.84(0.69 to 1.01)	4	4	0.37
Υπολειπόμενο μοντέλο	Συνολικά	0.93(0.82 to 1.05)	0.93(0.82 to 1.05)	7	0	0.63
	Καυκάσιοι	0.81(0.62 to 1.07)	0.81(0.62 to 1.07)	4	0	0.74
	Ασιάτες	0.94(0.82 to 1.09)	0.94(0.82 to 1.09)	2	0	0.35
Επικρατούν μοντέλο	Συνολικά	0.87(0.66 to 1.16)	0.88(0.62 to 1.24)	6	27	0.23
	Καυκάσιοι	0.76(0.55 to 1.06)	0.76(0.53 to 1.09)	4	15	0.32

(d)

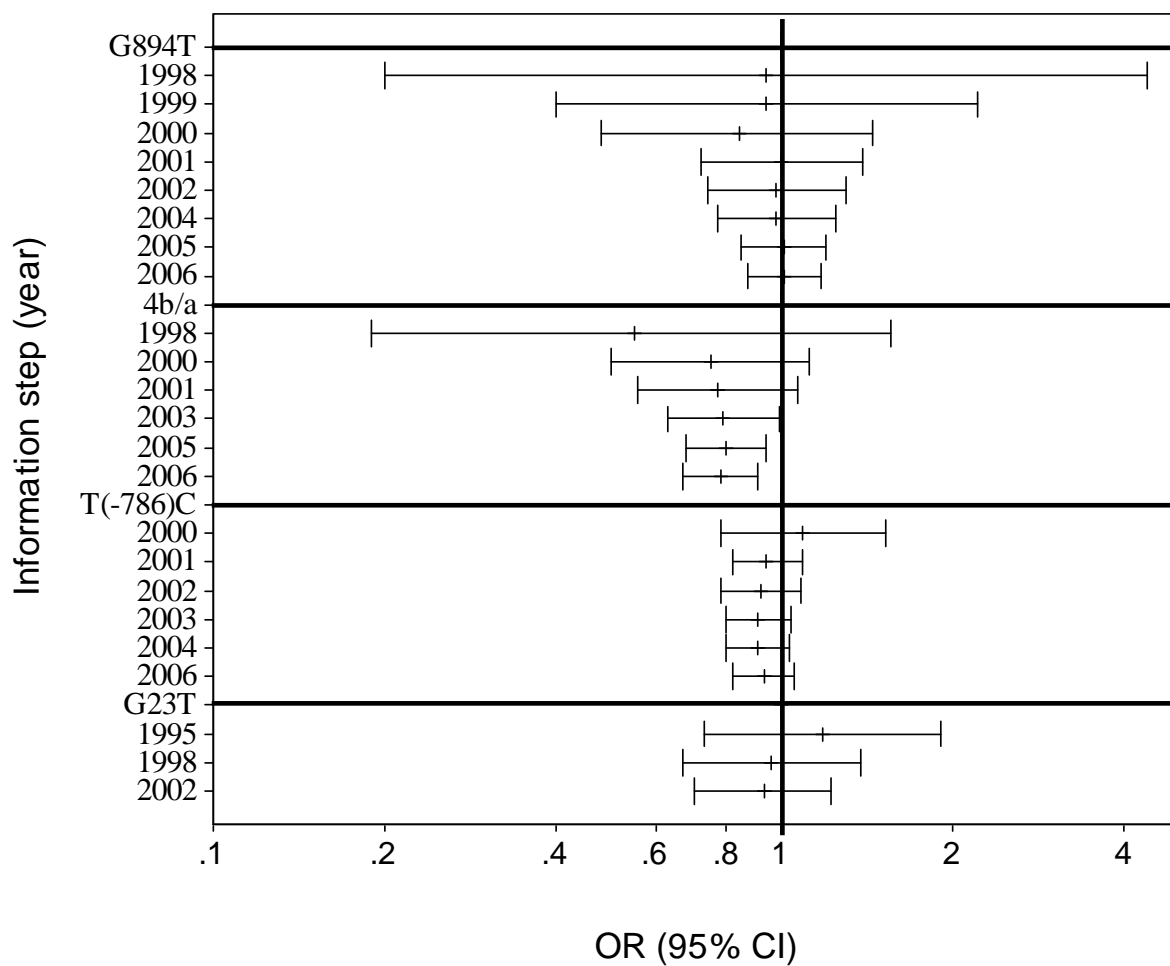
G23T	Πληθυσμός	Fixed effects OR(95% CI)	Random effects OR(95% CI)	Μελέτε ς	I <sup>2</sup> (%)	p-value Q-test
G vs T	Καυκάσιοι	0.88(0.72 to 1.08)	0.89(0.68 to 1.17)	3	44	0.17
Υπολειπόμενο μοντέλο	Συνολικά	0.93(0.75 to 1.16)	0.93(0.70 to 1.22)	4	35	0.20
	Καυκάσιοι	0.84(0.64 to 1.11)	0.85(0.61 to 1.19)	3	35	0.21
Επικρατούν μοντέλο	Καυκάσιοι	0.88(0.58 to 1.35)	0.89(0.58 to 1.36)	3	0	0.46

**Εικόνα 13 (α)**

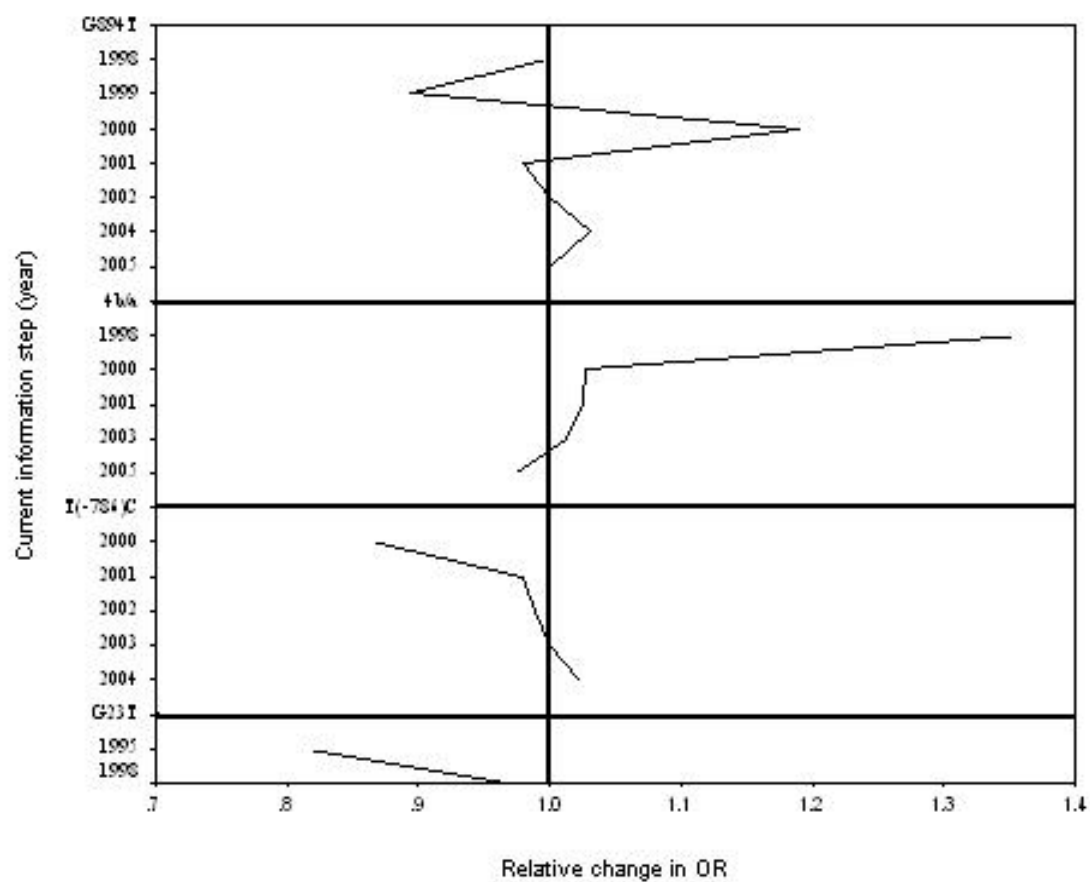
**Εικόνα 13 (b)****Εικόνα 13 (c)**

**Εικόνα 13 (d)**

Εικόνα 14



Εικόνα 15





### Συζήτηση των αποτελεσμάτων

Η παρούσα μετα-ανάλυση εξέτασε τους πολυμορφισμούς G894T, 4a/b, T786C, και G23T του γονιδίου NOS3 και τη σχέση τους με την προδιάθεση για ανάπτυξη υπέρτασης. Η ισχύς της παρούσας ανάλυσης βασίστηκε στη συσσώρευση αρκετών δημοσιευμένων στοιχείων τα οποία παρείχαν περισσότερες πληροφορίες για την ανίχνευση στατιστικά σημαντικών συσχετίσεων.

Η κύρια ανάλυση και η ανάλυση υπο-ομάδας σε Καυκάσιους και Ασιάτες παρήγαγε μη σημαντικά αποτελέσματα για την αντίθεση αλληλίων και το υπολειπόμενο και επικρατούν μοντέλο για του πολυμορφισμούς G894T, T786C, και G23T. Παρατηρήθηκε σταθερότητα των γενετικών επιδράσεων στις διαφορετικές εθνικότητες (τα αποτελέσματα δε διέφεραν της κύριας ανάλυσης). Συνολικά και στην ανάλυση υπο-ομάδας για Καυκάσιους, παρατηρήθηκε έλλειψη ετερογένειας και στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα για το υπολειπόμενο μοντέλο του πολυμορφισμού 4b/a, με το αλληλίο b να παρέχει προστασία από ανάπτυξη υπέρτασης. Αντίθετα, η συσχέτιση δεν ήταν σημαντική στους Ασιάτες, αν και ο αριθμός των μελετών ήταν μικρός για να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα. Για όλους τους εξετασθέντες πολυμορφισμούς, η ανάλυση για το υπολειπόμενο μοντέλο συμπεριέλαβε μεγαλύτερο αριθμό μελετών.

Συνολικά, η απουσία συσχέτισης μεταξύ των πολυμορφισμών G894T, T786C, και G23T πιθανό να οφείλεται σε άλλες, απροσδιόριστες λειτουργικές μεταλλάξεις στο γονίδιο NOS3, οι οποίες να διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στην ανάπτυξη υπέρτασης. Είναι γνωστό ότι οι πολυμορφισμοί εντός των γονιδίων είναι δυνατό να βρίσκονται σε ανισορροπία σύνδεσης, με αποτέλεσμα η αλληλεπίδραση μεταξύ των πολυμορφισμών να αποτελεί τον καθοριστικό παράγοντα παθογένεσης και όχι οι πολυμορφισμοί ξεχωριστά (*Kruglyak, 1997; Ardlie et al., 2002*). Συνεπώς, οι μεμονωμένοι πολυμορφισμοί του γονιδίου NOS3 πιθανώς να μην αποτελούν αξιόπιστους δείκτες κινδύνου για την ανάπτυξη υπέρτασης. Συνεπώς, μια μετα-ανάλυση NOS3 απλοτύπων θα μπορούσε να παρέχει πιο αξιόπιστες πληροφορίες σε σχέση με τους μεμονωμένους πολυμορφισμούς (*Tanus-Santos & Casella-Filho, 2007*).

Παρά τη σημαντική γενετική συμβολή στην προδιάθεση για υπέρταση, άλλοι μηχανισμοί και περιβαλλοντικές επιδράσεις είναι γνωστό ότι συμβάλλουν στην παθογένεση του νοσήματος. Εντούτοις, μια μετα-ανάλυση που συμπεριέλαβε 23.000 άτομα για τον κίνδυνο στεφανιαίας νόσου με το γονίδιο NOS3 έδειξε ότι τα άτομα

ομόζυγα για τα αλληλία Asp298 και 4a διατρέχουν έναν μετρίως αυξημένο κίνδυνο (*Casas et al., 2006*).

Η εκλεκτική δειγματοληψία και η πληθυσμιακή διαστρωμάτωση σε μελέτες πασχόντων-μαρτύρων είναι δυνατό να λειτουργήσουν ως συγχυτικοί παράγοντες πάνω στο ρόλο γενετικών δεικτών (*Kitsios & Zintzaras, 2007; Kitsios & Zintzaras, 2009a*). Επιπλέον, εσφαλμένη ταξινόμηση σε μελέτες πασχόντων/μαρτύρων είναι δυνατό να συμβεί δεδομένου ότι η διάγνωση των συμμετεχόντων βασίζεται σε περιορισμένο αριθμό μετρήσεων αρτηριακής πίεσης. Αυστηρότερα κριτήρια επιλογής και διάγνωσης είναι δυνατό να διασφαλίσουν ελαχιστοποίηση αυτού του κινδύνου (*Kitsios & Zintzaras, 2007; Kitsios & Zintzaras, 2009a*). Παρόλα αυτά, η υπέρταση αποτελεί νόσημα της προχωρημένης ηλικίας, με αποτέλεσμα η απουσία υπέρτασης σε νεαρά άτομα να μην εγγυάται τη μη ανάπτυξη του νοσήματος σε μεγαλύτερη ηλικία. Σε πολλές μελέτες, τα άτομα της ομάδας ελέγχου ήταν σημαντικά νεότερα από τους πάσχοντες, με αποτέλεσμα οι ομάδες ελέγχου να περιλαμβάνουν εν δυνάμει νοσούντες από υπέρταση μελλοντικά (*Kitsios & Zintzaras, 2007*).

Συμπερασματικά, η παρούσα μετα-ανάλυση (*Zintzaras et al., 2006b*) υποστήριξε την ύπαρξη συσχέτισης μεταξύ υπέρτασης και του πολυμορφισμού 4b/a του γονιδίου NOS3: το αλληλίο b παρείχε προστασία υπό το υπολειπόμενο μοντέλο, κυρίως όταν η ανάλυση περιορίστηκε στους Καυκάσιους. Δεν υπήρχε ανιχνεύσιμη επίδραση των πολυμορφισμών G894T, T786C, και G23T. Τα αποτελέσματα της παρούσας μετα-ανάλυσης χρήζουν προσεκτικής ερμηνείας, δεδομένου ότι ο αριθμός των μελετών και συμμετεχόντων ήταν σχετικά μικρός. Η διαλεύκανση της γενετικής της υπέρτασης εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τη διεξαγωγή μεγαλύτερων και τεχνικά αρτιότερων ΜΓΣ, οι οποίες θα λαμβάνουν υπόψη την πιθανή ύπαρξη γενετικών και περιβαλλοντικών αλληλεπιδράσεων.

Μετά τη δημοσίευση της παρούσας μετα-ανάλυσης στην επιθεώρηση Hypertension (*Zintzaras et al., 2006b*), οι Tanus-Santos & Casella-Filho (*Tanus-Santos & Casella-Filho, 2007*) με επιστολή τους στον εκδότη της επιθεώρησης έκριναν ότι μια μετα-ανάλυση απλοτύπων θα μπορούσε να είναι πιο πληροφοριακή από την ανάλυση γονοτύπων που εφαρμόστηκε στην εργασία μας. Είναι γνωστό ότι μεμονωμένοι πολυμορφισμοί δεν αποτελούν αξιόπιστους γενετικούς δείκτες ενός νοσήματος, ενώ η ανάλυση απλοτύπων είναι δυνατό να παρέχει περισσότερες πληροφορίες και να αποτελεί μια ισχυρότερη στατιστικά προσέγγιση. Παρόλα αυτά, στην απάντησή μας στο άνωθεν σχόλιο (*Zintzaras et al., 2006c*) καταστήσαμε σαφές

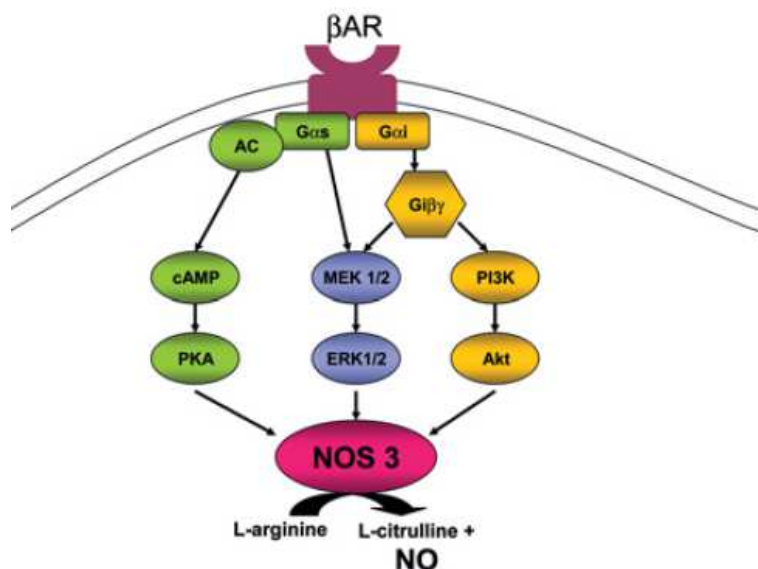
ότι ενώ αναγνωρίζουμε την ανωτερότητα της ανάλυσης απλοτύπων, μια τέτοια μετα-ανάλυση δεν ήταν δυνατή λόγω των ετερογενώς ορισμένων απλοτύπων που μελετήθηκαν από μικρό αριθμό εργασιών. Στην κλινική προσέγγιση της παρούσας διατριβής, αναφέρουμε εκτενώς την προσέγγιση απλοτύπων που πραγματοποιήσαμε στη δική μας ΜΓΣ.

**Ειδικός σκοπός 3: Η σύνθεση των δεδομένων των μελετών γενετικής συσχέτισης των γονιδίων της οικογένειας των αδρενεργικών υποδοχέων στην υπέρταση ώστε να αποσαφηνιστεί ο ρόλος των γονιδίων αυτών καθώς και να διερευνηθούν πιθανές πηγές ετερογένειας μεταξύ των επιμέρους μελετών.**

**Μετα-ανάλυση μελετών γενετικής συσχέτισης στην υπέρταση για τα γονίδια της οικογένειας των αδρενεργικών υποδοχέων**

Πλήθος πειραματικών δεδομένων τα τελευταία χρόνια υποστηρίζει την ύπαρξη μοριακής σύνδεσης μεταξύ των αδρενεργικών υποδοχέων (adrenergic receptors ARs) και της σύνθεσης NO, υποστηρίζοντας έναν καινούριο και πιθανώς σημαντικό μηχανισμό αδρενεργικού ελέγχου της καρδιαγγειακής λειτουργίας (Εικόνα 16) (*Queen & Ferro, 2006*). Τα γονίδια των αδρενεργικών υποδοχέων αποτελούν μια ομάδα από τα πλέον συχνά μελετούμενα γονίδια στην υπέρταση και κατατάσσονται στις πρώτες θέσης της λίστας με πιθανή συσχέτιση με την υπέρταση, σύμφωνα με σύγχρονα εργαλεία βιοπληροφορικής (*Yu et al., 2008b*). Με το πέρας μάλιστα της παρούσας διδακτορικής διατριβής, δημοσιεύτηκε από ανεξάρτητη ερευνητική ομάδα η πρώτη ΜΓΣ που εξετάζει την πιθανή ύπαρξη αλληλεπίδρασης μεταξύ του γονιδίου NOS3 και των γονιδίων των αδρενεργικών υποδοχέων, υποστηρίζοντας την αρχική μας υπόθεση ότι τα γονίδια αυτά πιθανόν καθορίζουν από κοινού το ρυθμό σύνθεσης του NO (*Misono et al., 2009*).

Προκειμένου λοιπόν να διαλευκανθεί ο ρόλος και άλλων γονιδίων (περαν του γονιδίου NOS3) που σχετίζονται με τον κρίσιμο μηχανισμό γένεσης του NO στο καρδιαγγειακό σύστημα, προχωρήσαμε σε μια συστηματική ανασκόπηση και μετα-ανάλυση των ΜΓΣ των γονιδίων της οικογένειας των αδρενεργικών υποδοχέων στην υπέρταση.



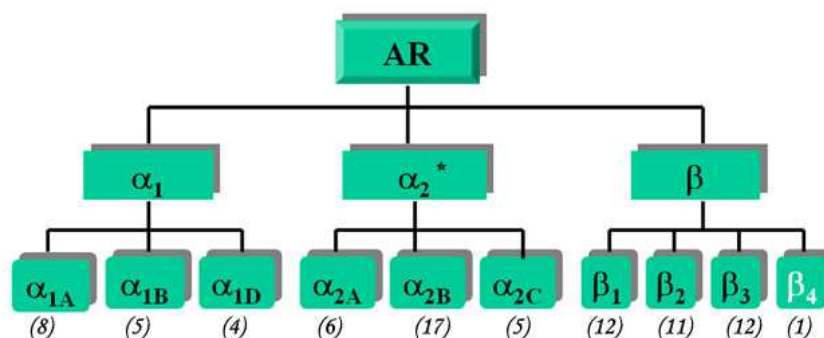
Εικόνα 16. Πιθανά ενδοκυττάρια μονοπάτια σχετιζόμενα με τη ρύθμιση της σύνθεσης NO από τους αδρενεργικούς υποδοχείς στα καρδιαγγειακά κύτταρα. Τροποποιημένη εικόνα από (Queen & Ferro, 2006).

Το συμπαθητικό νευρικό σύστημα (ΣΝΣ) διαδραματίζει κεντρικό ρόλο στη νευρο-ορμονική ρύθμιση του καρδιαγγειακού συστήματος και εμπλέκεται σε πολλά καρδιαγγειακά νοσήματα (DeQuattro & Feng, 2002; Zhu et al., 2005a; Biaggioni, 2003). Οι κατεχολαμίνες (αδρεναλίνη και νοραδρεναλίνη) λειτουργούν ως νευροδιαβιβαστές του ΣΝΣ και ως ορμόνες στην περιφέρεια και στο κεντρικό νευρικό σύστημα για να διεγείρουν μια απάντηση του συμπαθητικού (fight-or-flight response). Οι επιδράσεις των κατεχολαμινών διαμεσολαβούνται από έναν ή περισσότερους αδρενεργικούς υποδοχείς (Insel, 1996; Small et al., 2003).

#### Οικογένεια των αδρενεργικών υποδοχέων

Οι αδρενεργικοί υποδοχείς ανήκουν στην υπεροικογένεια των συνδεδεμένων με G-πρωτεΐνες υποδοχέων, οι οποίοι αποτελούν διαμεμβρανικές πρωτεΐνες (οφιοειδείς υποδοχείς με 7 διαμεμβρανικά τμήματα) υπεύθυνες για την κυτταρική σηματοδότηση μιας πλειάδας εξωκυττάρων μηνυμάτων. Νευρωνικά εκκρινόμενες ή κυκλοφορούσες κατεχολαμίνες συνδέονται στους αδρενεργικούς υποδοχείς για να διεγείρουν τον ενδοκυττάριο σηματοδοτικό καταρράκτη και να ασκήσουν τελικά τη βιολογική τους επίδραση. Η οικογένεια των αδρενεργικών υποδοχέων υποταξινομείται στους  $\alpha 1$ -AR,  $\alpha 2$ -AR και  $\beta$ -ARs, αν και κάθε μια από αυτές τις τάξεις υποδοχέων έχει πολλαπλούς υποτύπους ώστε συνολικά να έχουν χαρακτηριστεί 9 υπότυποι:  $\alpha 1_A$ -,  $\alpha 1_B$ -,  $\alpha 1_D$ -,  $\alpha 2_A$ -

,  $\alpha_{2B}$ -,  $\alpha_{2C}$ -,  $\beta_1$ -,  $\beta_2$ - και  $\beta_3$ -ARs. Καθένας από αυτούς τους υποτύπους κωδικοποιείται από διαφορετικό γονίδιο (*ADRA1A*, *ADRA1B*, *ADRA1D*, *ADRA2A*, *ADRA2B*, *ADRA2C*, *ADRB1*, *ADRB2* και *ADRB3*, αντίστοιχα), με διαφορετική ιστική κατανομή και λειτουργία (*Gavras & Gavras, 2001; Insel, 1996; Small et al., 2003; Taylor, 2007*). (Εικόνα 17)



Εικόνα 17: Οικογένεια των αδρενεργικών υποδοχέων.

Η εμπλοκή των ARs στην παθοφυσιολογία της υπέρτασης έχει τεκμηριωθεί από αλληλοσυμπληρούμενα ευρήματα ερευνών σε ανθρώπους και σε ζωικά πειραματικά μοντέλα (*Biaggioni, 2003; DeQuattro & Feng, 2002; Zhu et al., 2005a*).

Επιπρόσθετα, οι ARs αποτελούν μοριακούς στόχους για μια πληθώρα φαρμακευτικών παραγόντων που χρησιμοποιούνται στη θεραπεία της υπέρτασης (αποκλειστές ARs) (*Insel, 1996; Small et al., 2003*). Συνεπώς, τα γονίδια που ανήκουν στην οικογένεια των ARs έχουν προταθεί ως υποψήφια γονίδια για την προδιάθεση στην ανάπτυξη υπέρτασης από πολλές μελέτες, αν και οι υπεύθυνοι γενετικοί πολυμορφισμοί δεν έχουν καθοριστεί (*Zhu et al., 2005a*).

### Γενετικοί Πολυμορφισμοί

Συνολικά, 2250 πολυμορφισμοί έχουν χαρακτηριστεί στα γονίδια της οικογένειας των ARs (1147 στο γονίδιο *ADRA1A*, 286 στο γονίδιο *ADRA1B*, 324 στο γονίδιο *ADRA1D*, 49 στο γονίδιο *ADRA2A*, 69 στο γονίδιο *ADRA2B*, 34 στο γονίδιο *ADRA2C*, 92 στο γονίδιο *ADRB1*, 192 στο γονίδιο *ADRB2* και 57 στο γονίδιο *ADRB3*). Από αυτούς τους πολυμορφισμούς, 37 έχουν μελετηθεί σε ΜΓΣ στην υπέρταση. Η επιλογή των πολυμορφισμών πιθανώς καθοδηγήθηκε από ευρήματα λειτουργικότητας των υποψηφίων πολυμορφισμών, από τη συσχρότητα του

ελλάσσοнос αλληλίου ή από πρακτικές επιλογές σχετιζόμενες με τη διαδικασία γονοτύπωσης (*Castellano et al., 2003*).

Για το γονίδιο *ADRA1A*, ο πλέον συχνά μελετούμενος πολυμορφισμός είναι ένας μη συνώνυμος SNP (rs1048101) που κωδικοποιεί μια αντικατάσταση arginine σε cysteine στην αμινοξική θέση 347, αν και δεν έχουν περιγραφεί οι λειτουργικές του ιδιότητες (*Gu et al., 2006*). Κανένας πολυμορφισμός στα γονίδια *ADRA1B* και *ADRA1D* δεν έχει μελετηθεί σε ΜΓΣ στην υπέρταση (*Small et al., 2003*).

Ένας πολυμορφισμός στην 3'-αμετάφραστη περιοχή του γονιδίου *ADRA2A* (rs553668), συχνά αναφερόμενος ως DraI RFLP, βρέθηκε να παράγει ένα πιο ασταθές μεταγράφημα. Δεδομένου ότι ο υποδοχέας  $\alpha_2A$ -AR ελαττώνει τη συμπαθητική αγωγή στην καρδιά και την περιφερική κυκλοφορία, αυτή η μετάλλαξη απώλειας λειτουργίας (loss-of-function mutation) θα μπορούσε να αυξήσει την αρτηριακή πίεση (*Kurnik et al., 2006*). Στο γονίδιο *ADRA2B*, ένας συχνός πολυμορφισμός (rs28365031), οδηγεί στην ένθεση/έλλειψη τριών υπολειμμάτων γλουταμικού στις αμινοξικές θέσεις 301 έως 303, και έχει συσχετιστεί με ελαττωμένη απευαισθητοποίηση διαμεσολαβούμενη από αγωνιστή του υποδοχέα  $\alpha_2B$ -AR (*Muszkat et al., 2005; Zhang et al., 2005*). Στο γονίδιο *ADRA2C*, ένας πολυμορφισμός που παρατηρείται πιο συχνά σε μαύρους (rs2234888) κωδικοποιεί μια απάλειψη τεσσάρων αμινοξέων στον υποδοχέα  $\alpha_2C$ -AR (Del 322-325) (*Kurnik et al., 2007; Li et al., 2006*). Ο μεταλλαγμένος υποδοχέας επιδεικνύει ελαττωμένη σύνδεση διαμεσολαβούμενη από αγωνιστή στις ανασταλτικές G πρωτεΐνες και έχει συσχετιστεί με αυξημένο κίνδυνο καρδιακής ανεπάρκειας κατά 5 φορές (*Small et al., 2002*).

Στο γονίδιο *ADRB1* έχουν μελετηθεί 2 μη συνώνυμοι SNPs στην υπέρταση: ο rs1801253, ο οποίος προκαλεί μια αντικατάσταση arginine σε glycine στην αμινοξική θέση 389, και ο rs1801252, ο οποίος αντικαθιστά τη serine με glycine στη θέση 49. Ο «αγριος τύπος» Arg389 του υποδοχέα προκαλεί αυξημένη συνδεσιμότητα αγωνιστή-υποδοχέα και ενισχυμένη ενεργότητα αδενυλικής κυκλάσης συγκρινόμενος με τον μεταλλαγμένο τύπο του υποδοχέα. Το αλλήλιο Gly49 έχει συσχετιστεί με αυξημένη κατιούσα ρύθμιση διαμεσολαβούμενη από αγωνιστή (*Gjesing et al., 2007; Shioji et al., 2004; Wilk et al., 2006*). Το γονίδιο *ADRB2* είναι το πλέον συχνά μελετούμενο στην υπέρταση και 3 πολυμορφισμοί του έχουν συγκεντρώσει το κύριο ενδιαφέρον. Δύο μη συνώνυμοι SNPs (rs1042713 ή Arg16Gly, και rs1042714 ή Gln27Glu) παρουσιάζουν διαφοροποιημένη κατιούσα ρύθμιση του υποδοχέα διαμεσολαβούμενη

από αγωνιστή καθώς και επηρεασμένη αγγειακή αντιδραστικότητα. Ένας ακόμη πολυμορφισμός στην περιοχή του προαγωγέα του γονιδίου (rs1042711) έχει φανεί να ρυθμίζει την κυτταρική έκφραση της πρωτεΐνης του (*Castellano et al., 2003; Herrmann et al., 2002; Rosmond et al., 2000; Zak et al., 2008; Zee et al., 2005*). Για το γονίδιο *ADRB3*, ο μη συνώνυμος πολυμορφισμός rs4994 οδηγεί στην αντικατάσταση arginine από tryptophan στο κωδικόνιο 64 (Trp64Arg), η οποία έχει συσχετιστεί με ανεπαρκή σύνδεση στη διεγερτική G πρωτεΐνη (*Zafarmand et al., 2008; Corella et al., 2001; Hao et al., 2004*).

Τα αποτελέσματα των επιμέρους ΜΓΣ για τους ARs στην υπέρταση είναι αντικρουόμενα και μη συμπερασματικά, πιθανώς εξαιτίας μεθοδολογικών περιορισμών, ανεπαρκούς μεγέθους, εσφαλμένης επιλογής ασθενών, διαφορετική εθνικότητα των μελετώμενων πληθυσμών και μη προσαρμογή των αναλύσεων για επιδράσεις συγχυτικών παραγόντων.

Προκειμένου να διαλευκανθεί ο ρόλος των γονιδίων της οικογένειας των ARs στην υπέρταση, πραγματοποιήσαμε μια συστηματική αναζήτηση για όλες τις διαθέσιμες ΜΓΣ και κατασκευάσαμε το πληροφοριακό σύστημα CUMAGAS-HYPERT (Cumulative Meta-analysis of Genetic Association Studies – HYPERTension). Ανασύρθηκαν όλες οι σχετικές μελέτες και υπολογίστηκαν οι γενετικές επιδράσεις για όλα τα μελετούμενα γονίδια και πολυμορφισμούς. Τέλος, πραγματοποιήθηκε σύνθεση των διαθέσιμων δεδομένων με τεχνικές μετα-ανάλυσης προκειμένου να αυξηθεί η στατιστική ισχύς για την ανίχνευση των σημαντικών αποτελεσμάτων και να ελαττωθεί η αβεβαιότητα για το μέγεθος του εκτιμώμενου γενετικού κινδύνου (*Kitsios GD & Zintzaras E, 2009c*).

### Πληροφοριακό σύστημα

Η βάση δεδομένων CUMAGAS-HYPERT (*Zintzaras & Zdoukopoulos, 2009; Zintzaras E & Kitsios G, 2009*) είναι μια δια-δικτυακή βάση δεδομένων και ένα πληροφοριακό σύστημα για τη διεξαγωγή επισσωρευτικής μετα-ανάλυσης των ΜΓΣ, εδραζόμενη στο δικτυακό τύπο του Εργαστηρίου Βιομαθηματικών (<http://biomath.med.uth.gr>). Η βάση CUMAGAS-HYPERT πραγματοποιεί μετα-ανάλυση για όλα τα γενετικά μοντέλα κληρονόμησης (αντίθεσης αλληλίων, επικρατούν, υπολειπόμενο και συν-επικρατούν) και παρέχει πληροφορίες σχετικές με το σχεδιασμό των μελετών και τα χαρακτηριστικά των γενετικών πολυμορφισμών, συμπεριλαμβανομένων των αλλαγών νουκλεοτιδίων και των αριθμών rs-numbers. Η



βάση CUMAGAS-HYPERT έχει τη δυνατότητα συνεχούς ανανέωσης (ο τωρινός σκοπός μας είναι να ανανεώνουμε το σύστημα σε ετήσια βάση και μελλοντικά να συμπεριληφθούν όλες οι ΜΓΣ στο πεδίο της υπέρτασης) και οι συγγραφείς δημοσιευμένων μελετών έχουν το προνόμιο εισαγωγής δεδομένων στο σύστημα κατόπιν σχετικού αιτήματος.

## **Υλικά και Μέθοδοι**

### *Επιλογή των μελετών*

Όλες οι δημοσιευμένες ΜΓΣ πριν τον Μάρτιο του 2009 προσδιορίστηκαν με συστηματική αναζήτηση στις βάσεις δεδομένων Ovid Medline και HuGE PubLit. Το κριτήριο αναζήτησης στη βάση Ovid Medline φαίνεται στο κάτωθι διάγραμμα:

```

1 adrenergic.mp. 124476
2 exp Receptors, Adrenergic/ or exp Receptors, Adrenergic,
  alpha/ or exp Receptors, Adrenergic, beta/ or exp Receptors,
  Adrenergic, alpha-2/ 37777
3 ADRA1B.mp. 10
4 ADRA1A.mp. 16
5 ADRA1D.mp. 5
6 ADRA2A.mp. 54
7 ADRA2B.mp. 22
8 ADRA2C.mp. 33
9 ADRB1.mp. 66
10 ADRB2.mp. 200
11 ADRB3.mp. 89
12 hypertension.mp. 292065
13 hypertensive.mp. 74685
14 blood pressure.mp. 301055
15 gene.mp. 1081030
16 polymorphism.mp. 151253
17 variant.mp. 84791
18 allele.mp. 75747
19 mutant.mp. 213141
20 mutation.mp. 375357
21 6 or 11 or 3 or 7 or 9 or 2 or 8 or 1 or 4 or 10 or 5 124533
22 13 or 12 or 14 502181
23 18 or 19 or 16 or 17 or 20 or 15 1440177
24 22 and 21 and 23 957
25 limit 24 to english language 897
26 limit 25 to humans 575
  
```

Το κριτήριο αναζήτησης στη βάση δεδομένων HuGE PubLit database συμπεριέλαβε τους όρους “hypertension” και “ADRA1A”, “ADRA1B”, “ADRA1D”, “ADRA2A”, “ADRA2B”, “ADRA2C”, “ADRB1”, “ADRB2”, “ADRB3”.

Οι επιλέξιμες μελέτες αξιολογήθηκαν έναντι των ακόλουθων κριτηρίων συμπερίληψης: 1) μελέτη με πάσχοντες από κλινικά διεγνωσμένη αρτηριακή υπέρταση και μάρτυρες ελεύθεροι υπερτάσεως, 2) διαθέσιμη πληροφορία σχετικά με τους γονοτύπους ή τον εκτιμώμενο γενετικό κίνδυνο, 3) χρήση επαληθευμένων μοριακών μεθόδων για γονοτύπωση, και 4) διεξαγωγή σε ανθρώπινο πληθυσμό. Μελέτες που εξέτασαν προγνώση ή βαρύτητα του νοσήματος καθώς και φαρμακογονιδιωματικές μελέτες εξαιρέθηκαν από την ανάλυσή μας. Αναφορές περιστατικών και άρθρα ανασκόπησης εξαιρέθηκαν επίσης.

Επιπλέον, τα πλήρη κείμενα και τα συμπληρωματικά υλικά των διαθέσιμων μελετών ευρείας γονιδιωματικής συσχέτισης (MEΓΣ-GWAS) στην υπέρταση (από τις βάσεις HuGE PubLit και NHGRI Catalog of Published Genome-Wide Association Studies) εξετάστηκαν συστηματικά για την ανεύρεση δεδομένων σχετικών με τα γονίδια των ARs (*Hindorff et al., 2009; Johnson & O'Donnell, 2009*). Επίσης, εξετάστηκε η έκταση της γονοτυπικής κάλυψης των γονιδίων της οικογένειας των ARs από τις εμπορικά διαθέσιμες μικροσυστοιχίες γονοτύπωσης που έχουν χρησιμοποιηθεί στις MEΓΣ (*Johnson et al., 2008*).

#### *Εξαγωγή των δεδομένων*

Σε κάθε μελέτη καταγράφθηκαν οι ακόλουθες πληροφορίες: Πρώτος συγγραφέας, Περιοδικό δημοσίευσης της εργασίας, έτος δημοσίευσης, εθνικότητα του μελετώμενου πληθυσμού, δημογραφικά στοιχεία, κλινικά χαρακτηριστικά, ταύτιση με ομάδα ελέγχου, εγκυρότητα της μεθόδου γονοτύπωσης, και αριθμός πασχόντων και μαρτύρων για τον κάθε γονότυπο. Με εκτεταμένες αναζητήσεις σε βιοπληροφοριακές βάσεις δεδομένων προσδιορίστηκαν οι αριθμοί rs-numbers, οι χρωμοσωμικές θέσεις και οι αλλαγές νουκλεοτιδίων για όλους τους μελετώμενους πολυμορφισμούς.

#### *Ανάλυση των δεδομένων*

Η ανάλυση των δεδομένων πραγματοποιήθηκε με μεθοδολογία αντίστοιχη της περιγραφόμενης στο τμήμα του ειδικού σκοπού 2 της παρούσας διατριβής. Επιπλέον, η στατιστική ισχύς κάθε μελέτης υπολογίστηκε για την υπόθεση μιας ήπιας γενετικής επίδρασης (OR=1.2), επίπεδο σημαντικότητας 5%, επιπολασμό του νοσήματος 30% και συχνότητα του ελλάσσονος αλληλίου ισή με την παρατηρούμενη σε κάθε πληθυσμό. Οι

αναλύσεις έγιναν με το πληροφοριακό σύστημα CUMAGAS-HYPERT (<http://biomath.med.uth.gr>) και τα λογισμικά Compaq Visual Fortran90 και CaTS Power Calculator for Genetic Studies (Center for Statistical Genetics, University of Michigan).

### **Αποτελέσματα:**

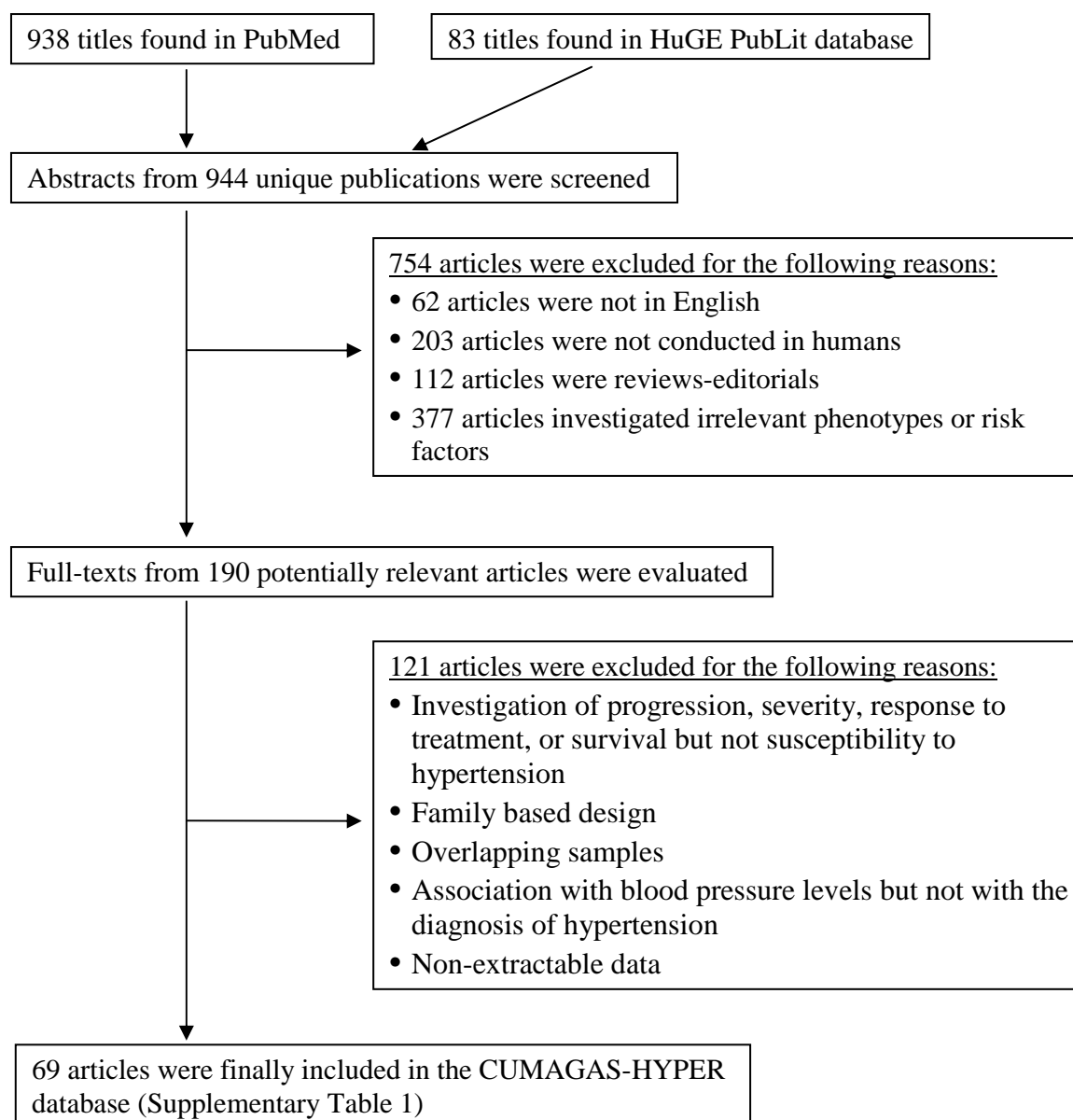
#### *Διαθέσιμες μελέτες*

Η βιβλιογραφική αναζήτηση απέφερε 938 τίτλους εκ των οποίων επελέγησαν 69 άρθρα ως κατάλληλα για συμπερίληψη στη συστηματική ανασκόπηση. Η εικόνα 18 παρέχει ένα διάγραμμα ροής για την διαδικασία επιλογής των μελετών αυτών.

Συνολικά, 7 γονίδια και 37 πολυμορφισμοί εξετάστηκαν σε 163 ΜΓΣ, δημοσιευμένες μεταξύ 1992 and 2009. Λεπτομερής καταγραφή των δεδομένων κάθε μελέτης παρέχεται στην ιστοσελίδα του Εργαστηρίου Βιομαθηματικών (<http://biomath.med.uth.gr>).

#### *Χαρακτηριστικά των μελετών και αποτελέσματα συσχετίσεων*

Οι μελέτες διεξήχθησαν σε πληθυσμούς διαφορετικών εθνικοτήτων: 76 ΜΓΣ σε Καυκάσιους, 45 ΜΓΣ σε Ασιάτες, 25 ΜΓΣ σε μαύρους και 15 ΜΓΣ σε εθνικά ανάμεικτους πληθυσμούς. Η κατανομή των γονοτύπων στις ομάδες ελέγχου απέκλινε από την ισορροπία HWE σε 13 μελέτες, ενώ δεν υπήρχε επαρκής πληροφορία σε 77 μελέτες. Στο 6.7% των μελετών, η στατιστική ισχύς υπερέβαινε το 50%, και σε 11.6% των μελετών κυμαινόταν μεταξύ 25% και 50%. Μόνον 1.2% των μελετών είχε στατιστική ισχύ άνω του 80%.



Εικόνα 18: Διάγραμμα ροής της διαδικασίας επιλογής των κατάλληλων μελετών  
Διάγραμμα από (Kitsios GD & Zintzaras E, 2009c).

#### Μετα-αναλύσεις:

Συνολικά, 13 πολυμορφισμοί εξετάστηκαν από 3 ή περισσότερες μελέτες και τα αποτελέσματα των μελετών αυτών υποβλήθηκαν σε μετα-ανάλυση. Στον πίνακα 13 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της μετα-ανάλυσης για καθένα από αυτούς τους πολυμορφισμούς. Σημαντική συσχέτιση ανιχνεύθηκε για 6 πολυμορφισμούς υπό κάθε μοντέλο κληρονομής ή ανάλυση υπο-ομάδας.

Στις κύριες αναλύσεις ανιχνεύθηκαν σημαντικά αποτελέσματα για πολυμορφισμούς των γονιδίων *ADRB1*, *ADRB2*, *ADRB3* και *ADRA1A*. Παρόλα αυτά,

τα αποτελέσματα βασίζονται σε ένα σχετικά μικρό αριθμό μελετών (3 έως 15) και για το λόγο αυτό θα πρέπει να ερμηνευτούν με προσοχή.

Οι μετα-αναλύσεις για το γονίδιο *ADRB1* εμφάνισαν σημαντική συσχέτιση και για τους δύο υπό εξέταση πολυμορφισμούς. Οι φορείς του αλληλίου Arg\* από τον πολυμορφισμό Arg389Gly είχαν αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης υπέρτασης κατά 16% [επικρατούν μοντέλο OR=0.84 (0.73-0.97)], μια επίδραση που ήταν οριακά σημαντική στην ανάλυση ευαισθησίας και παρουσίασε σημαντική ετερογένεια μεταξύ των μελετών ( $p_Q=0.06$ ,  $I^2=50\%$ ). Η ανάλυση υπο-ομάδας κατά εθνικότητα ανίχνευσε σημαντική επίδραση μόνον στους Ασιάτες [αντίθεση αλληλίων OR=0.91 (0.83-0.99)]. Σχετικά με τον πολυμορφισμό Ser49Gly, οι φορείς του αλληλίου Ser\* είχαν αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης υπέρτασης κατά 24%. Η ετερογένεια δεν ήταν σημαντική ( $p_Q=0.91$ ) για το επικρατούν μοντέλο και οι αναλύσεις υπο-ομάδας για την εθνικότητα δεν ανίχνευσαν σημαντικά αποτελέσματα.

Η μετανάλυση για τον πολυμορφισμό *ADRB3* Trp64Arg ήταν σημαντική μόνον για το επικρατούν μοντέλο [OR=1.36 (1.12-1.64)] και ανέδειξε σημαντική ετερογένεια ( $p_Q=0.01$ ,  $I^2=0.49$ ). Η συσχέτιση παρέμεινε σημαντική στην ανάλυση ευαισθησίας και στην ανάλυση υπο-ομάδας για Καυκάσιους και για άρρενες. Η σύγκριση με την αντίθεση αλληλίων συμπεριέλαβε μικρότερο αριθμό μελετών (εξαιτίας της μη διαθεσιμότητας δεδομένων για την πλήρη κατανομή γονοτύπων, δεδομένης της χαμηλής συχνότητας του ελάσσονος αλληλίου στους Καυκάσιους) και ήταν μη σημαντική, με την εξαίρεση της ανάλυσης υπο-ομάδας για άρρενες [OR=1.37 (1.14-1.63)].

Η κύρια ανάλυση για το μη συνώνυμο πολυμορφισμό *ADRA1A* Cys347Arg ανίχνευσε μια σημαντική προστατευτική επίδραση για το αλληλίο Cys\* στην αντίθεση αλληλίων και στο επικρατούν μοντέλο, χωρίς σημαντική ετερογένεια των αποτελεσμάτων ( $p_Q=0.55$ ). Τέλος, για το γονίδιο *ADRB2*, η μετα-ανάλυση 3 μελετών για τον πολυμορφισμό του προαγωγέα A-1023G έδειξε σημαντικά αποτελέσματα στην αντίθεση αλληλίων [OR=0.79 (0.63-0.99)].

Μεταξύ των πολυμορφισμών με αρνητικά αποτελέσματα στην κύρια ανάλυση, θετική ανάλυση υπο-ομάδας καταγράφηκε μόνον για τον πολυμορφισμό *ADRB2* Gln27Glu στους Καυκάσιους. Η συσχέτιση ήταν σημαντική για την αντίθεση αλληλίων [OR=0.92 (0.86-0.97)] και το επικρατούν μοντέλο [OR=0.89 (0.82-0.98)], ενώ η ανάλυση ετερογένειας ήταν μη σημαντική ( $p_Q=0.82$  και  $p_Q=0.93$ , αντίστοιχα).

Στις κύριες μετα-αναλύσεις δεν καταγράφηκε διαφορετικό μέγεθος γενετικής επίδρασης στις μεγάλες έναντι των μικρών μελετών, για κανένα από τους μελετώμενους πολυμορφισμούς ( $p_H > 0.05$ ).

### **Μελέτες ευρείας γονιδιωματικής συσχέτισης**

Στις 8 διαθέσιμες ΜΕΓΣ που εξέτασαν το φαινότυπο υπέρταση (ως διχοτομούμενη μεταβλητή), κανένα γονίδιο από την οικογένεια των ARs δεν εμφάνισε συσχέτιση σε ευρυ-γονιδιωματικό επίπεδο σημαντικότητας (Πίνακας 14). Επτά από τους 13 πολυμορφισμούς που εξετάστηκαν στις μετα-αναλύσεις συλλαμβάνονται επαρκώς από τις εμπορικά διαθέσιμες πλατφόρμες γονοτύπωσης (Πίνακας 15). Ονομαστική συσχέτιση παρατηρήθηκε μόνον για δύο αναπληρωματικούς πολυμορφισμούς (proxies) του *ADRB2* Gln28Glu, αν και το στατιστικό σήμα ήταν πολύ ασθενές ( $p = 10^{-2}$ ).

Πίνακας 13. Αποτελέσματα μετα-ανάλυσης, λόγοι αναλογιών (OR) και αντίστοιχα διαστήματα εμπιστοσύνης 95% (CI), στατιστικοί έλεγχοι ετερογένειας ( $p_Q$ ,  $I^2$ ) και διαφορικού μεγέθους γενετικής επίδρασης σε μεγάλες έναντι μικρών μελετών ( $p_H$ ). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται για την αντίθεση αλληλίων και το επικρατούν μοντέλο.

Γονίδιο, πολυμορφισμός	Πληθυσμός	αντίθεση αλληλίων					επικρατούν μοντέλο				
		Αριθμός μελετών	OR (95% CI)	$p_Q$	$I^2$	$p_H$	Αριθμός μελετών	OR (95% CI)	$p_Q$	$I^2$	$p_H$
ADRB1 Arg389Gly	Συνολικά	6	0.86 (0.76-0.97)	0.04	0.57	0.23	7	0.84 (0.73-0.97)	0.06	0.50	0.24
	Συνολικά σε HWE	5	0.86 (0.74-1.00)	0.03	0.62	0.32	6	0.83 (0.69-1.00)	0.04	0.56	0.31
	Καυκάσιοι	3	0.80 (0.59-1.08)	0.05	0.67	na	3	0.75 (0.52-1.08)	0.05	0.66	na
	Ασιάτες	3	0.91 (0.83-0.99)	0.26	0.25	na	3	0.92 (0.84-1.00)	0.35	0.02	na
ADRB1 Ser49Gly	Συνολικά	3	1.21 (1.04-1.41)	0.80	0.00	0.60	5	1.24 (1.05-1.45)	0.91	0.00	0.15
	Καυκάσιοι						2	1.30 (0.98-1.74)	0.72	na	na
	Ασιάτες	2	1.19 (1.01-1.46)	0.57	na	na	2	1.19 (0.98-1.45)	0.55	na	na
ADRB2 Arg16Gly	Συνολικά	27	1.03 (0.95-1.12)	0.00	0.57	0.75	25	1.01 (0.86-1.18)	0.00	0.63	0.64
	Συνολικά σε HWE	21	0.98 (0.91-1.06)	0.03	0.40	0.86	19	0.94 (0.80-1.11)	0.00	0.54	0.96
	Καυκάσιοι	14	1.01 (0.94-1.09)	0.88	0.00	0.62	13	1.01 (0.88-1.15)	0.50	0.00	0.60
	Ασιάτες	7	1.08 (0.89-1.30)	0.00	0.79	0.91	7	1.12 (0.81-1.53)	0.00	0.83	0.91
	Μαύροι	6	1.04 (0.76-1.42)	0.00	0.78	0.25	5	0.90 (0.53-1.53)	0.01	0.69	0.39
	Αρρενες	3	1.09 (0.94-1.25)	0.76	0.00	na	3	1.15 (0.92-1.44)	0.58	0.00	na
	Θήλεις	3	0.95 (0.53-1.71)	0.00	0.92	na	3	1.01 (0.59-1.73)	0.00	0.80	na
ADRB2 Gln27Glu	Συνολικά	22	0.93 (0.85-1.01)	0.01	0.45	0.59	21	0.91 (0.81-1.02)	0.01	0.46	0.51
	Συνολικά σε HWE	20	0.92 (0.84-1.01)	0.00	0.50	0.07	19	0.90 (0.79-1.02)	0.00	0.50	0.65
	Καυκάσιοι	12	0.92 (0.86-0.97)	0.82	0.00	0.73	11	0.89 (0.82-0.98)	0.93	0.00	0.82
	Ασιάτες	6	0.90 (0.61-1.33)	0.00	0.78	0.41	6	0.86 (0.56-1.33)	0.00	0.80	0.49
	Μαύροι	4	1.10 (0.93-1.30)	0.37	0.03	0.48	3	1.15 (0.91-1.47)	0.33	0.10	na
	Αρρενες	2	0.95 (0.22-4.14)	0.00	na	na	3	0.76 (0.37-1.57)	0.00	0.80	na

	Θήλεις	2	0.76 (0.44-1.33)	0.21	na	na	3	0.73 (0.48-1.10)	0.23	0.31	na
<i>ADRB2</i> Cys-47Arg	Συνολικά	7	0.91 (0.75-1.10)	0.00	0.71	0.32	5	0.85 (0.64-1.15)	0.25	0.25	0.55
	Συνολικά σε										
	HWE	6	0.89 (0.73-1.10)	0.00	0.75	0.41	4	1.21 (0.88-1.66)	0.21	0.34	0.81
	Καυκάσιοι	3	0.80 (0.56-1.14)	0.00	0.86	na	2	0.82 (0.51-1.32)	0.03	na	na
	Ασιάτες	3	1.03 (0.86-1.22)	0.89	0.00	na	3	1.05 (0.54-2.05)	0.79	0.00	na
<i>ADRB2</i> A-1023G	Συνολικά	3	0.79 (0.63-0.99)	0.11	0.54	na					
<i>ADRB2</i> A-654G	Συνολικά	3	0.91 (0.67-1.24)	0.02	0.73	na					
<i>ADRB2</i> G252A	Συνολικά	3	0.94 (0.61-1.44)	0.00	0.86	na					
<i>ADRB2</i> C523A	Συνολικά	3	0.96 (0.62-1.48)	0.00	0.85	na	2	0.75 (0.26-2.15)	0.02	na	na
<i>ADRB3</i> Trp64Arg	Συνολικά	8	1.12 (0.88-1.43)	0.00	0.66	0.67	15	1.36 (1.12-1.64)	0.01	0.49	0.23
	Συνολικά σε										
	HWE	6	1.00 (0.83-1.21)	0.32	0.14	0.22	13	1.31 (1.07-1.60)	0.07	0.39	0.32
	Καυκάσιοι						7	1.59 (1.28-1.97)	0.40	0.02	0.00
	Ασιάτες	8	1.12 (0.88-1.43)	0.00	0.66	0.67	8	1.16 (0.91-1.49)	0.02	0.56	0.66
	Αρρενες	4	1.37 (1.14-1.63)	0.42	0.00	0.39	5	1.51 (1.21-1.89)	0.31	0.15	0.20
	Θήλεις	4	1.12 (0.93-1.36)	0.53	0.00	0.37	5	1.16 (0.93-1.44)	0.86	0.00	0.20
<i>ADRA1A</i> Cys347Arg	Συνολικά	4	0.88 (0.79-0.97)	0.55	0.00	0.78	4	0.85 (0.72-0.99)	0.47	0.00	0.30
<i>ADRA2A</i> G1780A	Συνολικά	6	0.93 (0.79-1.10)	0.39	0.03	0.34	6	0.89 (0.74-1.08)	0.45	0.00	0.22
	Καυκάσιοι	3	0.72 (0.37-1.38)	0.12	0.53	na	3	0.76 (0.41-1.40)	0.22	0.33	na
	Μαύροι	3	0.96 (0.82-1.13)	0.94	0.00	na	3	0.91 (0.74-1.12)	0.47	0.00	na
<i>ADRA2B</i> I/D	Συνολικά	5	1.12 (0.96-1.32)	0.01	0.68	0.29	5	1.12 (0.89-1.40)	0.02	0.65	0.34
	Καυκάσιοι	4	1.06 (0.94-1.20)	0.12	0.47	0.97	4	1.04 (0.89-1.22)	0.22	0.32	0.72



Αρρενες	2	1.51 (0.61-3.76)	0.00	na	na	2	2.00 (0.38-10.48)	0.00	na	na
Θήλεις	2	1.00 (0.82-1.22)	0.64	na	na	2	1.13 (0.85-1.49)	0.59	na	na

*Πίνακας 14. Ευρήματα από τις ΜΕΓΣ στην υπέρταση για τα γονίδια της οικογένειας των αδρενεργικών υποδοχέων. Πίνακας από Kitsios GD & Zintzaras E. Synopsis and data synthesis of genetic association studies in hypertension for the adrenergic receptors family genes: the CUMAGAS-HYPERT database. 2009 [under revision].*

Πρώτος συγγραφέας, έτος δημοσίευσης	Μέγεθος	Πλατφόρμα γονοτύπωσης [αριθμός SNPs που αναλύθηκαν]	Σύνοψη των αποτελεσμάτων για τα γονίδια της οικογένειας των αδρενεργικών υποδοχέων
Adeyemo,2009	509 African American cases, 508 African American controls	Affymetrix [808,465]	ADRA2A: SNPs rs11195417 and rs602618 were associated with hypertension ( $P \approx 10^{-3}$ ) but not at a genome-wide significance level.
Levy,2009	29,136 individuals	Affymetrix & Illumina [2,533,153]	No significant findings
Org,2009	364 cases, 590 controls	Affymetrix [395,912]	No significant findings
WTCCC,2007	1,952 cases, 2,938 controls	Affymetrix [469,557]	ADRB2: SNPs rs11959615 and rs2400707 were associated with hypertension ( $P \approx 10^{-2}$ ) but not at a genome-wide significance level.
Yang,2009	175 Han Chinese cases, 175 Han Chinese controls	Affymetrix [91,713]	No significant findings
Wang,2009	542 individuals	Affymetrix [79,447]	No significant findings for association with hypertension [the ADRA1A SNP rs10503798 was associated with diastolic blood pressure ( $P \approx 10^{-4}$ )]
Saxena,2007	up to 5,217 individuals	Affymetrix [386,731]	No significant findings
Newton-Cheh,2009	34,433 individuals	Affymetrix & Illumina [2,497,993]	No significant findings for association with hypertension [the ADRB1 SNP rs7098454 was associated with diastolic blood pressure ( $P \approx 10^{-2}$ )].

*Πίνακας 15. Αναπληρωματικοί (Proxy) πολυμορφισμοί των μετα-ανελυμένων πολυμορφισμών στις εμπορικές πλατφόρμες γονοτύπωσης. Πίνακας από Kitsios GD & Zintzaras E. Synopsis and data synthesis of genetic association studies in hypertension for the adrenergic receptors family genes: the CUMAGAS-HYPERT database. 2009 [under revision].*

SNPs included in meta-analyses of candidate-gene studies	Proxy SNPs in commercial genotyping arrays <sup>#</sup>					
	rs740746	rs2484294	rs7076938			
ADRB1 rs1801253 (Arg389Gly)						
ADRB1 rs1801252 (Ser49Gly)	-					
ADRB2 rs1042713 (Arg16Gly)	rs17778257	rs12654778				
ADRB2 rs1042714 (Gln27Glu)	rs2400707*	rs1432622	rs11168066	rs2082395	rs2082382	rs11959615*
ADRB2 rs1042711 (Cys-47Arg)	-					
ADRB2 rs2053044 (A-1023G)	-					
ADRB2 rs12654778 (A-654G)	rs17778257	rs1042713				
ADRB2 rs1042717 (G252A)	rs1042718					
ADRB2 rs1042718 (C523A)	rs1042717					
ADRB3 rs4994 (Trp64Arg)	-					
ADRA1A rs1048101 (Cys347Arg)	rs13277287	rs7842829	rs937351	rs6557946	rs6998591	rs4236678
ADRA2A rs553668 (G1780A)	-					
ADRA2B rs28365031 (I/D)	-					

# Proxy SNPs (Illumina and Affymetrix) - SNAP tool  
(<https://www.broad.harvard.edu/mpg/snap/ldsearch.php>)

\*SNPs που εμφάνισαν συσχέτιση ( $P \approx 10^{-2}$ ) σε μία ΜΕΓΣ (WTCCC, 2007) αλλά όχι σε επίπεδο ευρείας γονιδιωματικής σημαντικότητας.

### Συζήτηση των αποτελεσμάτων

Στην παρούσα εργασία, πρωταρχικός σκοπός μας ήταν η σύνθεση των σύγχρονα διαθέσιμων δεδομένων γενετικής συσχέτισης για τα γονίδια της οικογένειας των ARs και της υπέρτασης. Οι περισσότερες από τις δημοσιευμένες ΜΓΣ είχαν ανεπαρκή στατιστική ισχύ για να ανιχνεύσουν την ήπια γενετική επίδραση που θεωρείται ότι επιφέρουν συχνοί πολυμορφισμοί (*Goldstein, 2009*). Δεδομένου ότι η πιο ρεαλιστική γενετική συσχέτιση μεταξύ ενός πολυμορφικού τύπου και ενός πολύπλοκου νοσήματος, όπως η υπέρταση, εκτιμάται ότι θα αποφέρει ένα OR τάξης μεγέθους μεταξύ 1.1 και 1.5, ένα μέγεθος δείγματος 10.000 ατόμων θα απαιτούνταν για να επιτευχθεί επαρκής ισχύς (>80%) (*Zintzaras et al., 2008; Zintzaras & Lau, 2008a*). Η μετα-ανάλυση έχει να προσφέρει ένα ξεκάθαρο και καθοριστικό ρόλο με την προοπτική της αυξημένης ισχύος μέσα από άθροιση των αποτελεσμάτων ανεξαρτήτων αναλύσεων (*Zintzaras & Lau, 2008a*).

Οι κύριες μετα-αναλύσεις ανέδειξαν σημαντικό ρόλο για 5 πολυμορφισμούς των γονιδίων *ADRB1*, *ADRB2*, *ADRB3* και *ADRA1A*. Οι 2 σχετιζόμενοι πολυμορφισμοί του γονιδίου *ADRB1* (Arg389Gly και Ser49Gly) είναι πιθανότατα λειτουργικοί και βρίσκονται σε ισχυρή ανισορροπία σύνδεσης μεταξύ τους, σηματοδοτώντας πιθανώς την έδρα αιτιολογικής και λειτουργικά σημαντικής γενετικής ποικιλομορφίας. Επίσης, η θετική συσχέτιση για τον πολυμορφισμό *ADRB3* Trp64Arg υποστηρίζεται από δεδομένα λειτουργικότητας, αν και η συνολική συσχέτιση αποδίδεται κυρίως στους Καυκάσιους, όπου το μεταλλαγμένο αλληλίο είναι σπανιότερο σε σχέση με τους Ασιάτες (*Cheung et al., 2000*). Αξίζει να σημειωθεί ότι η κύρια μετα-ανάλυση ήταν αρνητική για τους πλέον εντόνως μελετημένους πολυμορφισμούς (Arg16Gly και Gln27Glu) του γονιδίου *ADRB2*, το οποίο κατατάσσεται στις πρώτες θέσης της λίστας γονιδίων με πιθανή συσχέτιση με την υπέρταση, σύμφωνα με σύγχρονα εργαλεία βιοπληροφορικής (*Yu et al., 2008b*). Συσχέτιση εμφανίστηκε μόνον με για τον πολυμορφισμό Gln27Glu στους Καυκάσιους, υποστηρίζοντας έτσι την ύπαρξη εθνικά καθορισμένων επιδράσεων (*Xie et al., 2000*).

Οι παρατηρούμενες αποκλίσεις στα αποτελέσματα των επιμέρους μελετών είναι δυνατό να πηγάζουν από μια σειρά μεθοδολογικών προβλημάτων που είναι συχνά παρόντα στη βιβλιογραφία της γενετικής επιδημιολογίας της υπέρτασης (*Franks, 2009*). Σημαντική ποικιλομορφία στο σχεδιασμό των μελετών, στα κριτήρια εισαγωγής, στον ορισμό του φαινοτύπου και στο μέγεθος των μελετών παρατηρήθηκε

και στο δείγμα της βιβλιογραφίας που αναλύσαμε. Επιπλέον, η ελλιπής εξέταση της απλοτυπικής μορφολογίας των γονιδίων καθώς και των αλληλεπιδράσεων με περιβαλλοντικούς παράγοντες πιθανώς έχει συμβάλλει στο παρατηρούμενο πρότυπο αποτελεσμάτων (*Tanus-Santos & Casella-Filho, 2007; Zintzaras et al., 2006c*).

Οι ΜΕΓΣ δεν έχουν αναδείξει κάποιο σημαντικό ρόλο για τα γονίδια της οικογένειας των ARs. Εντούτοις, η κάλυψη των 13 μετα-ανελυμένων πολυμορφισμών δεν ήταν ιδανική και οι πολυμορφισμοί που έχουν ανακαλυφθεί από τις ΜΕΓΣ μέχρι σήμερα ερμηνεύουν μόνον ένα μικρό κλάσμα της κληρονομικότητας του νοσήματος, με αποτέλεσμα να μην είναι δυνατό να αποκλειστεί η συμμετοχή και άλλων γονιδίων (*Johnson et al., 2008*). Επιπρόσθετα, οι αναλύσεις κυρίων επιδράσεων που εφαρμόζονται στις ΜΕΓΣ (μη λαμβάνοντας υπόψη αλληλεπιδράσεις) έχουν πιθανώς απολέσει συσχετίσεις πολυγονιδιακών συμβολών γονιδίων, τα οποία συμμετέχουν σε παθοφυσιολογικά μονοπάτια σχετιζόμενα με το νόσημα (*Kitsios GD & Zintzaras E, 2009b*). Αν και οι σχετικές μεθοδολογίες «ανάλυσης μονοπατιού» βρίσκονται υπό ανάπτυξη και βελτιστοποίηση, τα γονίδια της οικογένειας των ARs θα μπορούσαν να αποτελέσουν γονίδια υψηλής προτεραιότητας για τέτοιες αναλύσεις (*Kraft & Raychaudhuri, 2009*).

Με την επιλογή του δυαδικού φαινοτύπου «υπέρταση», η στατιστική ισχύς της ανάλυσής μας ενδεχομένως να περιορίστηκε, δεδομένου ότι εξαιρέθηκαν μελέτες που παρουσίασαν συσχέτιση με επίπεδα αρτηριακής πίεσεως καθώς και το γεγονός ότι αναλύσεις σε συνεχείς μεταβλητές παρουσιάζουν αυξημένη στατιστική ισχύ. Παρόλα αυτά, η επιλογή αυτού του τελικού εξαγόμενου έγινε προκειμένου να προσδιοριστεί ο ρόλος των ARs στη διαμόρφωση προδιάθεσης για μια κλινικά βαρύνουσα κατάσταση, πράγμα που θα μπορούσε να έχει σημαντικές προεκτάσεις στη δημόσια υγεία (*Zintzaras et al., 2006b*). Επιπλέον, η ανάλυση απλοτύπων αντί της ανάλυσης μεμονωμένων πολυμορφισμών θα μπορούσε να είναι πιο διαφωτιστική. Μια τέτοια ανάλυση όμως κρίθηκε ανέφικτη δεδομένης της έλλειψης εναρμονισμένου καθορισμού των απλοτύπων στις διάφορες μελέτες και την απουσία μεθοδολογικής σταθεράς για την σύνθεση δεδομένων απλοτύπων (*Bao et al., 2005; Zintzaras & Lau, 2008a*).

Η βάση δεδομένων CUMAGAS-HYPERT παριστά μια προσέγγιση ιατρικής βασισμένης σε ενδείξεις για τη συστηματική αναζήτηση, ανασκόπηση και σύνθεση του ταχέως αυξανόμενου πλήθους των ΜΓΣ στην υπέρταση (*Kitsios GD & Zintzaras E, 2009c*). Τα διαθέσιμα δεδομένα καταχωρούνται και όπου κρίνεται κατάλληλο,

συντίθενται με μεθόδους μετα-ανάλυσης, αναδεικνύοντας σημαντικά ευρήματα αλλά και κενά έρευνας στο πεδίο. Στόχος μας είναι να ανανεώνουμε τα δεδομένα της βάσης σε ετήσια βάση και να επεκτείνουμε το σύστημα ώστε να συμπεριλάβει όλες τις ΜΓΣ στην υπέρταση. Το σύστημα θα επεκταθεί ώστε να συμπεριλαμβάνει τα αποτελέσματα των δημοσιευόμενων ΜΕΓΣ, ενώ ήδη περιλαμβάνει συνόψεις πεδίου (field synopses) για 2 άλλα πολυπαραγοντικά νοσήματα (περιφερική αρτηριακή νόσο και χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία) (*Zintzaras & Zdoukopoulos, 2009; Zintzaras & Kitsios, 2009*).

Συμπερασματικά, υπάρχουν αρκετά δεδομένα συμμετοχής των γονιδίων της οικογένειας των ARs στον καθορισμό της προδιάθεσης ανάπτυξης υπέρτασης. Μελλοντικές μελέτες που θα λαμβάνουν υπόψην επιστατικές και περιβαλλοντικές αλληλεπιδράσεις θα συνδράμουν στην περαιτέρω διαλεύκανση της γενετικής αιτιολογίας της υπέρτασης. Το πληροφοριακό σύστημα CUMAGAS-HYPERT (*Kitsios GD & Zintzaras E, 2009c*) αναμένεται να αποτελέσει έναν χρήσιμο πόρο για την ανασκόπηση και ερμηνεία των ευρημάτων της συσσωρευόμενης έρευνας γενετικής επιδημιολογίας στην υπέρταση.

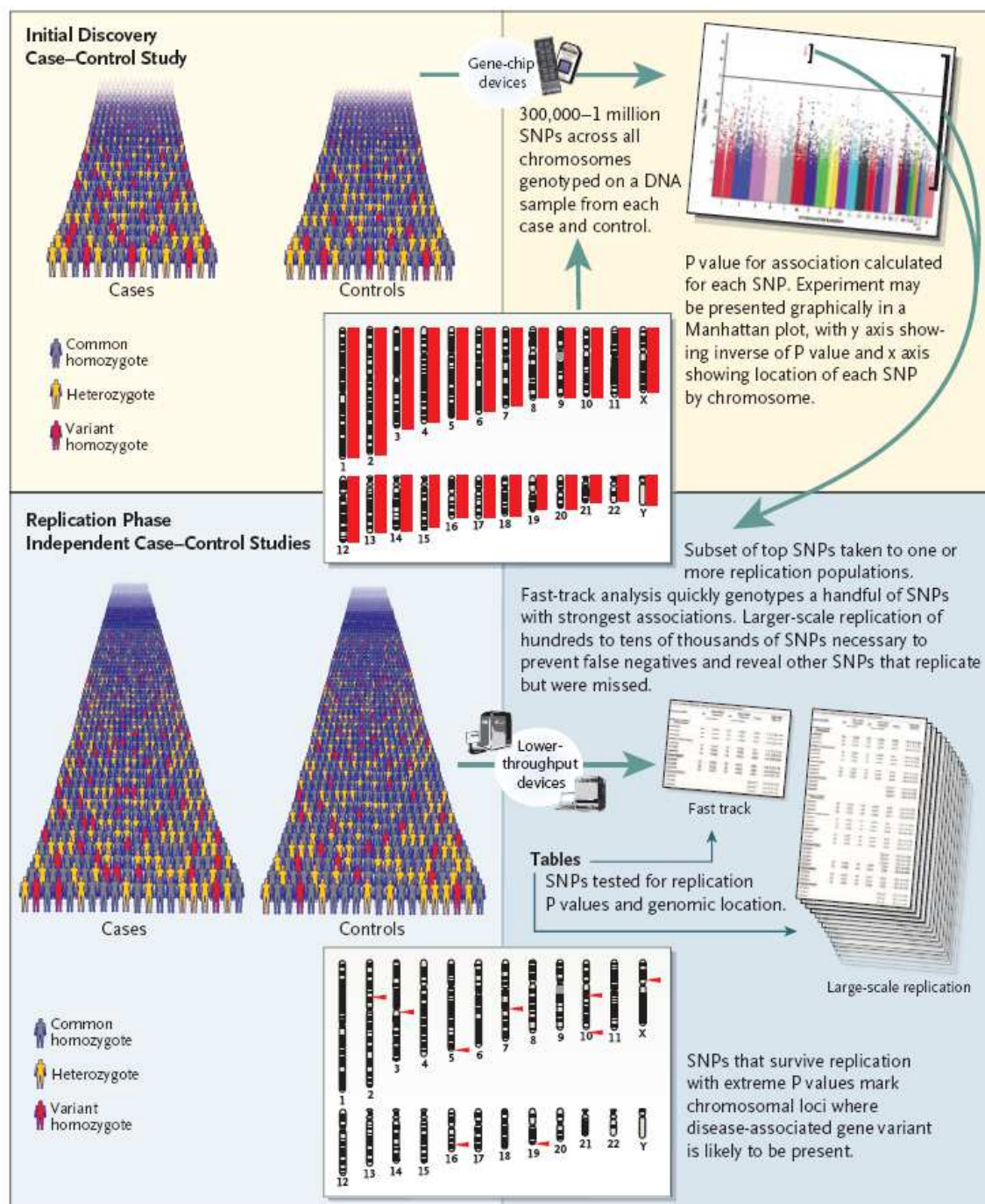
## ii) Μελέτες ευρείας γονιδιωματικής συσχέτισης

**Ειδικός σκοπός 4: Η μεθοδολογική αξιολόγηση των μελετών ευρυγονιδιωματικής συσχέτισης και η εφαρμογή τεχνικών γονιδιωματικής σύγκλισης στις μελέτες της υπέρτασης.**

*(Ο ειδικός σκοπός 4 δεν συμπεριλαμβανόταν στο αρχικώς κατατεθέν πρωτόκολλο διότι δεν υπήρχαν δημοσιευμένες μελέτες το 2006, αλλά θεωρήθηκε ότι θα αποτελούσε παράλειψη η μη αναφορά αποτελεσμάτων έρευνας στο πεδίο των μελετών ευρείας γονιδιωματικής συσχέτισης)*

### A. Μεθοδολογική αξιολόγηση

Οι μελέτες ευρείας γονιδιωματικής συσχέτισης –ΜΕΓΣ (genome-wide association studies-GWAS) εξετάζουν την γενετική ποικιλομορφία σε όλη την έκταση του γονιδιώματος με τη χρησιμοποίηση μικροσυστοιχιών γονοτύπωσης μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών προς ανίχνευση συσχετίσεων με κλινικούς φαινοτύπους (2007;Hirschhorn & Daly, 2005;McCarthy et al., 2008;McCarthy & Hirschhorn, 2008a;McCarthy & Hirschhorn, 2008b). Η πραγματοποίησή τους διευκολύνθηκε από την ολοκλήρωση του Human Genome Project, από τη χαρτογράφηση των απλοτύπων σε 4 ανθρώπινους πληθυσμούς (HapMap Project) και από την τεχνολογική πρόοδο των μεθόδων γονοτύπωσης με την ανάπτυξη των γονοτυπικών πλατφόρμων (SNP-microchips) που είναι ικανές να ελέγξουν περισσότερους από 1.000.000 δείκτες ταυτόχρονα (Hamet & Seda, 2007;Johnson & O'Donnell, 2009). Μια συνοπτική περιγραφή της διαδικασίας που ακολουθείται στις μελέτες αυτές παρουσιάζεται στην ακόλουθη εικόνα 19.



Εικόνα 19: Σχηματική περιγραφή της διαδικασίας που ακολουθείται σε μια ΜΕΓΣ. Εικόνα από (Hardy & Singleton, 2009).

Αντί λοιπόν να εστιάζεται το ενδιαφέρον σε βιολογικά υπονήγρια γονίδια, το γονιδίωμα σαρώνεται χωρίς προεπιλογή για περιοχές, γονίδια ή πολυμορφισμούς. Εξαιτίας αυτής της διερεύνησης της γενετικής ποικιλομορφίας σε ευρεία γονιδιωματική βάση, οι ΜΕΓΣ έχουν χαρακτηριστεί ως προσέγγιση «ελεύθερη υποθέσεων» (“hypothesis-free”) ή «αγνωστική» (Hardy & Singleton, 2009). Με μια



προσέγγιση «ελεύθερη υποθέσεων», η επιστημονική κοινότητα ευελπιστεί ότι θα ξεπεραστούν τα προβλήματα που δημιουργεί η ατελής κατανόηση της παθοφυσιολογίας των νοσημάτων (*Hindorff et al., 2009*).

Οι αρχικές επιτυχίες των ΜΕΓΣ παρείχαν έμπρακτες αποδείξεις της δυνατότητας να ανιχνεύουν γενετικές συσχετίσεις. Γονίδια και μονοπάτια που δεν είχαν προηγουμένως εμπλακεί στην παθοφυσιολογία νοσημάτων αποκαλύφθηκαν ενώ ορισμένα ευρήματα προκάλεσαν έντονη έκπληξη (όπως οι συσχετίσεις περιοχών χωρίς γονίδια –«έρημοι γονιδίων»– με τη στεφανιαία νόσο ή τον καρκίνο) και έθεσαν πρωτόγνωρα ερωτήματα σχετικά με το μηχανιστικό ρόλο της γενετικής ποικιλομορφίας (*Manolio et al., 2008; Hindorff et al., 2009*). Πολυμορφισμοί σε τέτοιες περιοχές θα παρέμεναν πάντοτε εκτός πεδίου έρευνας με την προσέγγιση του υποψηφίου γονιδίου.

Ο ενθουσιασμός που συνόδευσε αυτές τις μελέτες βασιζόταν στην προσμονή ότι ως μελέτες «ελεύθερες υποθέσεων» θα ήταν ανεξάρτητες συστηματικών σφαλμάτων της παραδοσιακής βιολογικής έρευνας και θα μπορούσαν να παρέχουν μια πλήρη εικόνα της γενετικής αιτιολογίας των πολύπλοκων νοσημάτων (*Hardy & Singleton, 2009*). Παρόλα αυτά, οι συσχετίσεις που έχουν προκύψει από τις ΜΕΓΣ ερμηνεύουν μόνον ένα μικρό κλάσμα της κληρονομικότητας των νοσημάτων, ενώ οι ήπιες γενετικές επιδράσεις που έχουν ανιχνευθεί μέχρι σήμερα έχουν μικρή προγνωστική αξία (*Kraft & Hunter, 2009; Goldstein, 2009*). Οι ανακαλυπτόμενοι συσχετιζόμενοι με νοσήματα πολυμορφισμοί από τις ΜΕΓΣ αποτελούν στις περισσότερες περιπτώσεις συνδεδεμένους δείκτες (tagging markers) παρά την αιτιολογική γενετική ποικιλομορφία (*Hardy & Singleton, 2009*). Για τους παραπάνω λόγους, έχουν προταθεί μια σειρά από μεθοδολογικά ζητήματα προς επίλυση σχετικά με το σχεδιασμό, την ανάλυση και την ερμηνεία των ΜΕΓΣ (*Hardy & Singleton, 2009; Hirschhorn & Daly, 2005; McCarthy et al., 2008; McCarthy & Hirschhorn, 2008a; McCarthy & Hirschhorn, 2008b*).

Παρόλα αυτά, παρέμενε υποεκτιμημένο το γεγονός ότι οι ΜΕΓΣ βασίζονται σε υποκείμενες υποθέσεις – παρά τον χαρακτηρισμό τους ως «ελεύθερες υποθέσεων»– και οι υποθέσεις αυτές θα μπορούσαν να ερμηνεύσουν τους περιορισμούς που παρατηρήθηκαν στην εφαρμογή των μελετών αυτών. Χαρακτηρισμοί όπως «ελεύθερη υποθέσεων» (“hypothesis-free”) ή «αγνωστική» προσέγγιση είναι

παραπλανητικοί και αγνοούν το γεγονός ότι το αποτέλεσμα κάθε βιολογικού πειράματος εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από το βαθμό στον οποίο ισχύουν οι εξεταζόμενες υποθέσεις του. Στα πλαίσια της παρούσας διατριβής δημοσιεύτηκε ένα προσκεκλημένο άρθρο σχολιασμού στην επιθεώρηση Translational Research, στο οποίο παρουσιάζουμε για πρώτη φορά τις *a priori* υποθέσεις των ΜΕΓΣ, οι οποίες προκύπτουν από το σχεδιασμό της πλατφόρμας γονοτύπωσης ή από την μεθοδολογία ανάλυσής τους (**Kitsios GD & Zintzaras E, 2009b**):

1. Υπόθεση Συχνού Νοσήματος/Συχνής Παραλλαγής  
Common Disease/Common Variant hypothesis

Ο σχεδιασμός των σύγχρονων ΜΕΓΣ τις καθιστά κατάλληλες κυρίως για την ανακάλυψη συχνών πολυμορφισμών που συμβάλλουν με ήπιες επιδράσεις στην εμφάνιση νοσημάτων στα πλαίσια της υπόθεσης Συχνού Νοσήματος/Συχνής Παραλλαγής (common disease/common variant hypothesis-CDCV). Δεδομένης της αδυναμίας τους να ανιχνεύσουν τις επιδράσεις των σπάνιων αλληλίων (λόγω μεγέθους δείγματος ή δυσχερειών γονοτύπωσης), οι πιο πολλές ΜΕΓΣ μέχρι σήμερα έχουν αναλύσει μονονουκλεοτιδικούς πολυμορφισμούς (single nucleotide polymorphisms-SNPs) με συχνότητες ελάσσονος αλληλίου >5%. Οι σπάνιες παραλλαγές, με συχνότητες μεταξύ πολυμορφισμών και σπάνιων μεταλλάξεων (0.1-1%) δεν εξετάζονται από τις ΜΕΓΣ. Σύμφωνα όμως με μια εναλλακτική υπόθεση, την υπόθεση Συχνού Νοσήματος/Σπάνιας Παραλλαγής (common disease/rare variant hypothesis), τα πολυπαραγοντικά νοσήματα προκαλούνται αθροιστικά από την επίδραση πολλαπλών σπάνιων παραλλαγών με μέτρια έως υψηλή διεισδυτικότητα. Η υπόθεση αυτή υποστηρίζεται από εξελικτικές θεωρίες, από εμπειρικά δεδομένα και από δεδομένα από το HapMap project (**Bodmer & Bonilla, 2008**). Δεδομένης της χαμηλής συχνότητάς τους και τις μεμονωμένα μικρού μεγέθους συμβολές τους στην συνολική κληρονομικότητα του νοσήματος, οι σπάνιες παραλλαγές δε θα είναι ανιχνεύσιμες από μελέτες πληθυσμού με τη χρήση συνδεδεμένων πολυμορφικών δεικτών. Συνεπώς, εάν η υπόθεση CDCV δεν ισχύει ή ισχύει μόνον σε μερικές περιπτώσεις, τότε η «χαμένη κληρονομικότητα» δε θα ερμηνευτεί από τις ΜΕΓΣ (**Kraft & Hunter, 2009**). Οι σπάνιες παραλλαγές είναι πιο πιθανό να ανιχνευθούν από προσεκτικά επιλεγμένα υποψηφία γονίδια σε μεγάλα δείγματα εκλεκτικά επιλεγμένων πασχόντων/μαρτύρων. Πολλές τέτοιες παραλλαγές έχουν ανιχνευθεί με μια τέτοια προσέγγιση. Παρόλα αυτά, η γονοτύπωση υποψηφίων

γονιδίων δε θα επαρκέσει και θα απαιτηθεί γονοτύπωση σε όλο το μήκος της γονιδιωματικής αλληλουχίας. Εκτιμάται ότι η τεχνολογική πρόοδος στις μεθόδους γονοτύπωσης και οι καινούριοι γενετικοί χάρτες που χαρτογραφούν σπάνιες παραλλαγές (1,000 Genomes Project) (2009) θα καταστήσουν δυνατή την αναζήτηση σπάνιων παραλλαγών σε μια ολογονιδιωματική βάση.

2. Οι SNPs αποτελούν την υπεύθυνη μορφή γενετικής ποικιλομορφίας ή δύνανται να λειτουργήσουν ως ανιχνευτές αυτής.

Οι SNPs αποτελούν τους γενετικούς δείκτες που έχουν επιλεγεί ως οι στόχοι γονοτύπωσης στις ΜΕΓΣ εξαιτίας της αφθονίας τους (> 12 εκατομμύρια) και των τεχνολογικών διευκολύνσεων που επιτρέπουν την ταχεία γονοτύπωσή τους σε ευρεία κλίμακα. Βάσει του σύγχρονου σχεδιασμού των ΜΕΓΣ παραμερίζονται άλλες σημαντικές μορφές γενετικής ποικιλομορφίας, όπως οι δομικές παραλλαγές ή οι επιγενετικές αλλαγές. Οι πιο συχνές μορφές παραλλαγής είναι οι προσκτήσεις και απώλειες DNA, αποκαλούμενες παραλλαγές αριθμού αντιγράφων (copy number variants-CNVs), οι οποίες ασκούν πιθανότατα σημαντική επίδραση στη γονιδιακή έκφραση και λειτουργία (Aren et al., 2008). Οι πιο πολλές καταγεγραμμένες συσχετίσεις μεταξύ CNVs και πολύπλοκων νοσημάτων έχουν προκύψει μέσω της προσέγγισης υποψηφίου γονιδίου. Αν και υπάρχουν μερικά επιτυχημένα παραδείγματα ανίχνευσης συσχετίσεων μέσω των ΜΕΓΣ, το πρώτο κύμα των ΜΕΓΣ έχει ουσιαστικά απολέσει τη συμβολή των CNVs. Αυτό συνέβη κυρίως διότι οι CNVs δεν δεσμεύονται εύκολα από τους SNPs (επηρεάζοντας την ισορροπία Hardy-Weinberg Equilibrium και έτσι συχνά απορρίπτονται στους ελέγχους ποιότητας γονοτύπωσης), οι CNVs έχουν συχνά εκτεταμένη ποικιλομορφία, εδράζονται σε περιοχές που δεν καλύπτονται επαρκώς από τις μικροσυστοιχίες γονοτύπωσης ή δεν έχουν γονοτυπωθεί στα πλαίσια του HarMap project (Estivill et al., 2008; O'Donovan et al., 2008). Πρόσφατα ανεπτυγμένα μικροτσιπ γονοτύπωσης επιτρέπουν τον ταυτόχρονο έλεγχο και CNVs σε όλο το γονιδίωμα με ενισχυμένη κάλυψη. Παρόλα αυτά, η ευρυγονιδιωματική ανίχνευση των σπάνιων παραλλαγών καθώς και η διακρίση CNVs με μεγάλο εύρος ποικιλομορφίας αποτελούν σημαντικές προκλήσεις για την έρευνα των τεχνολογιών γονοτύπωσης. Δεδομένου ότι η παγκόσμια τράπεζα δεδομένων για τις CNVs παραμένει ατελώς εμπλουτισμένη και με περιορισμένα εμπειρικά δεδομένα διαθέσιμα, η επάρκεια των εμπορικών μικροτσιπ στην ανίχνευση των CNVs παραμένει αδιευκρίνιστη (Beckmann et al., 2008; Johansson &

*Ingelman-Sundberg, 2008*). Παρόλα αυτά, ακόμα και υπό ιδανικά σενάρια, οι ευρείες γονιδιωματικές σαρώσεις των SNPs δε θα παρέχουν πληροφορίες σχετικές με το ρόλο άλλων ρυθμιστικών συνιστωσών του γονιδιώματος, όπως οι επιγενετικές τροποποιήσεις (σωματικά-κτηθείσες ή δια-γενετικά κληρονομηθείσες) (*Ramagopalan et al., 2007*). Συμπληρωματικές τεχνικές, όπως η ευρεία ανάλυση του μεθυλιώματος, θα απαιτηθούν για τη διαλεύκανση του ρόλου τέτοιων τροποποιήσεων.

3. *Η γενετική προδιάθεση στην ανάπτυξη πολυπαραγοντικών νοσημάτων οφείλεται στις κύριες (ανεξάρτητες) επιδράσεις των SNPs.*

Οι περισσότερες από τις ΜΕΓΣ μέχρι σήμερα έχουν χρησιμοποιήσει μονοσημειακή ανάλυση, στην οποία κάθε πολυμορφισμός εξετάζεται ξεχωριστά για συσχέτιση με έναν φαινότυπο, υποθέτοντας ανεξάρτητες επιδράσεις, παρά την σχεδόν αξιωματική παραδοχή ότι τα πολυπαραγοντικά νοσήματα προκαλούνται από τις πολύπλοκες αλληλεπιδράσεις μεταξύ πολλαπλών γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων. Συνεπώς, ένας πολυμορφισμός που δρα μέσα από έναν τέτοιο πολύπλοκο μηχανισμό δε θα ανιχνευθεί σε μια ΜΕΓΣ, αν εξεταστεί απομονωμένα και όχι στο πλαίσιο αλληλεπιδράσεων με άλλους παράγοντες. Πολλοί πολυμορφισμοί ενδεχομένως έχουν μικρού μεγέθους επιδράσεις μεμονωμένα, αλλά ισχυρές συνδυαζόμενες επιδράσεις. Δυστυχώς τέτοια χρήσιμα στατιστικά σήματα βρίσκονται βυθισμένα σε έναν γονιδιωματικό ωκεανό στατιστικού θορύβου (*Cordell, 2009*). Δεδομένου του ταυτόχρονου ελέγχου πολλαπλών υποθέσεων, πολύ λίγα τέτοια σήματα ξεπερνούν το ευρυ-γονιδιωματικό επίπεδο σημαντικότητας και τα περισσότερα που δεν το ξεπερνούν καταλήγουν να αγνοούνται. Ο έλεγχος επιστατικών (γενετικών) επιδράσεων είναι απαιτητικός υπολογιστικά, δεδομένου ότι υπάρχουν δισεκατομμύρια πιθανών συνδυασμών SNPs. Πρόσφατα έχουν προταθεί μεθοδολογίες και λογισμικά πακέτα για την ενσωμάτωση τέτοιων αναλύσεων στην κύρια ανάλυση των δεδομένων μιας ΜΕΓΣ (*Musani et al., 2007; Kooperberg & Leblanc, 2008; Cordell, 2009*). Αν και η ανίχνευση και η ερμηνεία αλληλεπιδράσεων δε θα είναι εύκολη, ο ευρυ-γονιδιωματικός έλεγχος αλληλεπιδράσεων αποτελεί το επόμενο λογικό βήμα μετά τις μονοσημειακές και μονοπαραγοντικές αναλύσεις που έχουν γίνει ως σήμερα.

Συμπερασματικά, οι ΜΕΓΣ συμβολίζουν μια σημαντικότερη πρόοδο προς την καλύτερη κατανόηση της γενετικής αρχιτεκτονικής των πολυπαραγοντικών νοσημάτων. Περισσότερες από 350 ΜΕΓΣ έχουν αλλάξει δραματικά το πεδίο των γενετικών συσχετίσεων για περισσότερα από 80 νοσήματα και έχουν παρέχει σημαντικές πληροφορίες για την κατανόηση της παθοφυσιολογίας των νοσημάτων (*Manolio et al., 2008*). Η ανεξαρτησία των ΜΕΓΣ από την ανάγκη βιολογικά υποψηφίων γονιδίων οδήγησε στο χαρακτηρισμό τους ως μελέτες «ελεύθερες υποθέσεων» ή «αγνωστικές». Εντούτοις, οι όροι αυτοί είναι παραπλανητικοί: στην πραγματικότητα, οι ΜΕΓΣ βασίζονται σε υποκείμενες υποθέσεις, υπαγορευόμενες από τη μεθοδολογία στατιστικής ανάλυσης ή από το σχεδιασμό της γονοτυπικής πλατφόρμας. Οι ΜΕΓΣ μέχρι σήμερα έχουν εν πολλοίς εστιάσει στο ρόλο συχνών SNPs και πιθανώς το μέγιστο τμήμα της κληρονομικότητας που δύναται να ερμηνευτεί από τέτοιου είδους γενετικές παραλλαγές έχει ήδη ανακαλυφθεί. Η υπολειπόμενη «χαμένη κληρονομικότητα» πιθανώς οφείλεται σε σπάνιες παραλλαγές, δομικές παραλλαγές, επιγενετικές επιδράσεις, άλλους άγνωστους γονιδιωματικούς μηχανισμούς ή επιστατικές και περιβαλλοντικές επιδράσεις που δεν έχουν μελετηθεί (*Kitsios GD & Zintzaras E, 2009b*).

Στο πρόσφατο παρελθόν άλλες ερευνητικές προσεγγίσεις (σαρώσεις ευρυγονιδιωματικής σύνδεσης και μελέτες έκφρασης με μικροσυστοιχίες) είχαν πανηγυριστεί ως προσεγγίσεις ελεύθερες υποθέσεων και συστηματικών σφαλμάτων, θεωρώντας ότι είναι ανεξάρτητες δεσμευτικών υποθέσεων για τους αιτιολογικούς μοριακούς μηχανισμούς των νοσημάτων (*Kitsios GD & Zintzaras E, 2009b*). Παρόλα αυτά, οι προσεγγίσεις αυτές απέτυχαν να αποδώσουν μια περιεκτική περιγραφή της γενετικής βάσης των πολυπαραγοντικών νοσημάτων. Είναι σημαντικό να αναγνωριστούν οι υποκείμενες υποθέσεις των ΜΕΓΣ, δεδομένου ότι κάθε είδος βιολογικής έρευνας βασίζεται σε κάποιες υποθέσεις, έστω και αν αυτές δεν διατυπώνονται ρητώς. Ενδεχομένως και επιπρόσθετες υποθέσεις των ΜΕΓΣ να αποκαλυφθούν με την πρόοδο της κατανόησης των μοριακών μηχανισμών. Εάν δεν αντιμετωπιστούν οι εγγενείς περιορισμοί των ΜΕΓΣ και εάν δεν χρησιμοποιηθούν παράλληλα και άλλες μεθοδολογίες, όπως η ολογονιδιωματική γονοτύπωση, τα πλήρη πλεονεκτήματα που δύναται να προσφέρει η τεχνολογία σάρωσης του ανθρώπινου γονιδιώματος δε θα έχουν κεφαλαιοποιηθεί (*Kitsios GD & Zintzaras E, 2009b*).

## **B. Μελέτες ευρείας γονιδιωματικής συσχέτισης στην υπέρταση –γονιδιωματική σύγκλιση.**

Δεδομένα από τις διαθέσιμες ΜΕΓΣ στην υπέρταση και την αρτηριακή πίεση παρουσιάζονται στον παρακάτω Πίνακα 16. Συνολικά 20 ανεξάρτητοι γενετικοί τόποι έχουν συσχετιστεί με υπέρταση ή αυξημένες τιμές αρτηρικής πίεσεως, με ισχυρή στατιστική υποστήριξη. Αξιοσημείωτο είναι ότι κανένας από τους νέους αυτούς γενετικούς τόπους δεν είχε προηγουμένως μελετηθεί από μελέτες υποψηφίου γονιδίου (*Johnson & O'Donnell, 2009*).

Προκειμένου να εξετάσουμε τη συμφωνία ευρημάτων μεταξύ ΣΕΓΣ και ΜΕΓΣ εφαρμόσαμε την τεχνική της γονιδιωματικής σύγκλισης (genomic convergence) στις διαθέσιμες μελέτες για την υπέρταση. Η μεθοδολογία αυτή εφαρμόστηκε σε ευρεία γονιδιωματική κλίμακα για πρώτη φορά από το Εργαστήριο Βιομαθηματικών (*Kitsios & Zintzaras, 2009b*) και επιχειρεί να εξετάσει τη συμφωνία δύο μεθόδων που δεν επιλέγουν υποψήφιες περιοχές του γονιδιώματος (ΣΕΓΣ και ΜΕΓΣ) και να προσδιορίσει γενετικούς τόπους με υποστήριξη σημαντικότητας από 2 ανεξάρτητες μεθόδους. Οι τόποι αυτοί μπορούσαν να σηματοδοτούν περιοχές υψηλής προτεραιότητας για μελέτες επαλήθευσης και λειτουργικότητας.

Για το λόγο αυτό, από όλες τις μελέτες ΣΕΓΣ σύνδεσης κατασκευάστηκαν διαστήματα εμπιστοσύνης σύνδεσης (1.0-LOD–unit-down) γύρω από κάθε πολυμορφικό δείκτη που εμφάνισε σημαντικότητα σε κάθε μελέτη, με μεθοδολογία που αναπτύχθηκε στο εργαστήριο Βιομαθηματικών (*Zintzaras & Kitsios, 2006; Zintzaras et al., 2006a; Zintzaras et al., 2007; Kitsios & Zintzaras, 2009b*). Επίσης καταγράφηκε η έκταση της γονιδιωματικής κάλυψης (σε ένα γονιδίωμα συνολικού μήκος 3487cM σύμφωνα με τον γενετικό χάρτη Marshfield) των μη αλληλοεπικαλυπτόμενων διαστημάτων. Για την υπέρταση, κατασκευάστηκαν 96 διαστήματα εμπιστοσύνης, τα οποία κάλυπταν 30.7% του γονιδιώματος. Στη συνέχεια, τα συνοριακά τμήματα των διαστημάτων αυτών μεταφράστηκαν με εργαλεία πληροφορικής σε φυσικές αποστάσεις και εξετάστηκε το ποσοστό των σημαντικών SNPs από τις ΜΕΓΣ που εδραζόταν εντός τέτοιων διαστημάτων (ποσοστό γονιδιωματικής σύγκλισης). Στην υπέρταση, το ποσοστό αυτό ήταν 35%, το οποίο ελεγχόμενο με μια δοκιμασία z-test (συγκρινόμενο με τη γονιδιωματική σύγκλιση που αναμένονταν με βάση την τυχαιότητα και ισούταν με το ποσοστό γονιδιωματικής κάλυψης) φάνηκε ότι δεν ήταν στατιστικά σημαντικό ( $p=0.673$ ).

Τα ευρήματα που εμφάνισαν σύγκλιση θα μπορούσαν να εξεταστούν πιο επισταμένα σε μελλοντικές μελέτες, καθώς εμφανίζουν επαλήθευση/υποστήριξη από ανεξάρτητες πηγές δεδομένων (*Kitsios & Zintzaras, 2009b*). Παρόλο που η γονιδιωματική σύγκλιση είναι υποστηρικτική αληθών γενετικών επιδράσεων, η συνολικά παρατηρούμενη έλλειψη συμφωνίας μεταξύ ΣΕΓΣ και ΜΕΓΣ είναι ενδεικτική ότι οι δύο αυτοί τύποι μελετών είναι σχεδιασμένοι να απαντούν διαφορετικές ερωτήσεις και δεν είναι εξίσου κατάλληλοι για τη διαλεύκανση της γενετικής των πολυπαραγοντικών νοσημάτων (*Kitsios & Zintzaras, 2009b*).

*Πίνακας 16. Στατιστικά σημαντικά ευρήματα από τις ΜΕΓΣ για την υπέρταση και την αρτηριακή πίεση.*

Πρώτος συγγραφέας, έτος	Φαινότυπος	Χρωμ. Περιοχή	Γονίδια	SNP-Αλληλίο	Συχνότητα αλληλίου	p-Value	Platform [SNPs passing QC]
Adeyemo, 2009	Υπέρταση	4q23	ADH7	rs991316-T	0.45	0.000005	Affymetrix [808,465]
Adeyemo, 2009	Υπέρταση	15q22.1	ALDH1A2	rs1550576-?	0.86	0.000003	Affymetrix [808,465]
Levy, 2009	Υπέρταση	12q21.33	ATP2B1	rs2681472-A	0.83	2.00E-11	Affymetrix & Illumina [2,533,153]
Levy, 2009	Υπέρταση	20q13.32	ZNF831, EDN3	rs16982520-A	0.88	2.00E-07	Affymetrix & Illumina [2,533,153]
Levy, 2009	Υπέρταση	10p12.33*	CACNB2	rs11014166-A	0.66	6.00E-08	Affymetrix & Illumina [2,533,153]
Levy, 2009	Υπέρταση	8p23.1	MSRA	rs11775334-A	0.32	0.000004	Affymetrix & Illumina [2,533,153]
Org, 2009	Υπέρταση	16q23.3	CDH13	rs11646213-T	0.6	0.000008	Affymetrix [395,912]
WTCCC, 2007	Υπέρταση	15q26*	NR	rs2398162-A	0.26	0.000006	Affymetrix [469,557]
WTCCC, 2007	Υπέρταση	1q43*	RYR2, CHRM3, ZP4	rs2820037-T	0.14	8.00E-07	Affymetrix [469,557]
Yang, 2009	Υπέρταση (young onset)	2p22.3*	LOC344371, MYADML, FAM98A, RASGRP3	4-SNP-haplotype	NR	3.00E-10	Affymetrix [91,713]
Wang, 2009	Αρτηριακή πίεση	2q24.3	STK39	rs6749447-G	0.28	2.00E-07	Affymetrix [79,447]
Levy, 2007	Αρτηριακή πίεση	14q24.3	Intergenic	rs935334-?	NR	0.000003	Affymetrix [70,897]
Levy, 2007	Αρτηριακή πίεση	8q13.3	Intergenic	rs1963982-?	NR	0.000003	Affymetrix [70,897]

Levy,2007	Αρτηριακή πίεση	1p31.3*	Intergenic	rs10493340-?	NR	2E-06	Affymetrix [70,897]
Levy,2007	Αρτηριακή πίεση	2q36.3	CCL20, WDR69	rs7591163-?	NR	3.00E-07	Affymetrix [70,897]
Levy,2007	Αρτηριακή πίεση	16q23.3	CDH13	rs3096277-?	NR	1.00E-09	Affymetrix [70,897]
Levy,2007	Αρτηριακή πίεση	6q15*	Intergenic	rs2509458-?	NR	7E-06	Affymetrix [70,897]
Levy,2007	Αρτηριακή πίεση	14q24.3	C14orf118	rs2121070-?	NR	0.000005	Affymetrix [70,897]
Levy,2007	Αρτηριακή πίεση	5q22.1	CAMK4	rs10491334-?	NR	4E-06	Affymetrix [70,897]
Levy,2007	Αρτηριακή πίεση	3p26.3*	CNTN4	rs4370013-?	NR	4E-06	Affymetrix [70,897]

\*Γενετικοί τόποι που εδράζονται σε γενετικά διαστήματα σύνδεσης από ΣΕΓΣ



## V. ΚΛΙΝΙΚΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ

**Ειδικός σκοπός 5: Η διεξαγωγή μελέτης γενετικής συσχέτισης πολυμορφισμών και απλοτύπων του γονιδίου *NOS3* σε πληθυσμό της Θεσσαλίας σε σχέση 5α.) με την υπέρταση, και 5β.) με την υπερτροφία της αριστερή κοιλίας.**

**5α.** Όπως παρουσιάστηκε στο τμήμα της μεθοδολογικής προσέγγισης της παρούσας διδακτορικής διατριβής, το γονίδιο *NOS3* έχει αποτελέσει ένα συχνά μελετούμενο υποψήφιο γονίδιο στην υπέρταση, στη βάση του καθοριστικού ρόλου που διαδραματίζει το μόριο του NO στη ρύθμιση της καρδιαγγειακής ομοιόστασης. Οι πλέον συχνά μελετούμενοι πολυμορφισμοί του γονιδίου είναι τρεις: ο πολυμορφισμός T786C του προαγωγέα (rs2070744), ο πολυμορφισμός ένθεσης/έλλειψης του ιντρονίου 4 (4a/b) και ο πολυμορφισμός του εξωνίου 7 G894T. Τα αποτελέσματα των επιμέρους μελετών ΜΓΣ ήταν αντικρουόμενα για το ρόλο κάθε πολυμορφισμού ενώ η μετα-ανάλυση που διεξήχθη στα πλαίσια της διατριβής ανέδειξε ένα σημαντικό ρόλο μόνο για τον πολυμορφισμό 4a/b. Παρόλα αυτά, όπως προέκυψε και στην εκδοτική συζήτηση της δημοσιευμένης μετα-ανάλυσης στην επιθεώρηση Hypertension (*Zintzaras et al., 2006b; Zintzaras et al., 2006c*), οι μεμονωμένοι πολυμορφισμοί δεν αποτελούν αξιόπιστους γενετικούς δείκτες ενός νοσήματος, ενώ η ανάλυση απλοτύπων είναι δυνατό να παρέχει περισσότερες πληροφορίες και να αποτελεί μια ισχυρότερη στατιστικά προσέγγιση. Προκειμένου λοιπόν να επαληθευθεί το εύρημα της ανωτέρω μετα-ανάλυσης αλλά και να επιτραπεί η ανάλυση απλοτύπων του γονιδίου *NOS3*, σχεδιάστηκε και διεξήχθη μια ΜΓΣ για την υπέρταση σε Καυκάσιους πάσχοντες και μάρτυρες από την περιοχή της Θεσσαλίας.

**5β.** Εκτός από τον φαινότυπο της υπέρτασης, κρίθηκε σκόπιμο να εξεταστεί με το σχεδιασμό ΜΓΣ και η σχέση του γονιδίου *NOS3* με μια σημαντική κλινική οντότητα σχετιζόμενη με την υπέρταση, την υπερτροφία της αριστερή κοιλίας (YAK). Η YAK είναι γνωστό ότι αποτελεί ισχυρό προγνωστικό παράγοντα αιφνίδιου καρδιακού θανάτου και καρδιακής ανεπάρκειας (*Schillaci et al., 2000; Levy et al., 1990*). Δεν υπάρχουν όμως επαρκή δεδομένα για το εάν η προδιάθεση στην βλάβη τελικού οργάνου-στόχου στην υπέρταση κληρονομείται μαζί ή ανεξάρτητα από την προδιάθεση ανάπτυξης υπέρτασης (*Hopkins & Hunt, 2003*). Πειραματικά δεδομένα

έχουν δείξει ότι το NO είναι δυνατό να διεγείρει την αγγειογένεση, να ελαττώσει τη μυοκαρδιακή υπερτροφία, να περιορίσει την παραγωγή πρωτεϊνών εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας, επηρεάζοντας παράλληλα πολλές διαδικασίες που εμπλέκονται στην παθογένεση της ΥΑΚ (*Kim et al., 1999; Murohara et al., 1998*). Για το λόγο αυτό πολυμορφισμοί του γονιδίου *NOS3* έχουν μελετηθεί ως παράγοντες κινδύνου για την σχετιζόμενη με την υπέρταση αναδιαμόρφωση της αριστερής κοιλίας (*Hopkins & Hunt, 2003*). Τα αποτελέσματα των επιμέρους μελετών όμως ήταν ασταθή και μη συμπερασματικά, διερευνώντας μεμονωμένους πολυμορφισμούς και καταγράφοντας οριακές ή και αντικρουόμενες συσχετίσεις. Δεδομένου όμως ότι οι απλότυποι ενός γονιδίου αναμένεται να αποτελούν τους καθοριστικούς παράγοντες ρύθμισης της λειτουργικότητας του γονιδίου, μια ανάλυση απλοτύπων του γονιδίου *NOS3* με την ΥΑΚ αναμένεται να παρέχει αυξημένη στατιστική ισχύ για την ανίχνευση συσχέτισης. Για το λόγο αυτό, προχωρήσαμε στην ανάλυση της συσχέτισης μεταξύ ΥΑΚ και απλοτύπων του γονιδίου *NOS3* στην ομάδα πασχόντων από υπέρταση από την κύρια ΜΓΣ.

*(Στο επόμενο τμήμα της διατριβής περιγράφονται οι Μέθοδοι και τα Αποτελέσματα των δύο παράλληλα πραγματοποιηθέντων μελετών γενετικής συσχέτισης)*

## **Υλικά και Μέθοδοι**

### *Μελετώμενο δείγμα πληθυσμού*

**5α, 5β.** Συνολικά, 230 μη διαβητικοί ασθενείς πάσχοντες από πρωτοπαθή υπέρταση συλλέγησαν από ιατρεία πρωτοβάθμιας περίθαλψης και από εξωτερικά ιατρεία υπέρτασης (Γενικό Νοσοκομείο Καρδίτσας, Κέντρο Υγείας Καλαμπάκας, Περιφερειακό Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Λάρισας) της περιοχής της Θεσσαλίας, σύμφωνα με τα ακόλουθα κριτήρια: 1. ηλικία άνω των 20 ετών, 2. εμφάνιση της υπέρτασης πριν την ηλικία των 60 ετών, 3. διάγνωση υπέρτασης ως χρόνια θεραπεία με αντι-υπερτασική αγωγή ή ως ΣΑΠ > 140mmHg ή ΔΑΠ > 90 mmHg για τους ασθενείς χωρίς θεραπευτική αγωγή, 4. απουσία δευτεροπαθούς μορφής υπέρτασης (έπειτα από κλινικο-εργαστηριακή διερεύνηση) και 5. απουσία σακχαρώδους διαβήτη. Το ιστορικό κάθε αρρώστου αποκτήθηκε μέσω ενός συστηματοποιημένου ερωτηματολογίου σχετικά με τρόπο ζωής/ έξεις και λήψη φαρμακευτικής αγωγής. Καταγράφηκε το ιατρικό ιστορικό υπέρτασης, καρδιαγγειακής νόσου και υπερλιπιδαιμίας. Πραγματοποιήθηκε φυσική εξέταση σε

κάθε ασθενή που συμπεριέλαμβανε μέτρηση ΣΑΠ, ΔΑΠ και καταγραφή ηλεκτροκαρδιογραφήματος.

Η διάγνωση της ΥΑΚ βασίστηκε στα ηλεκτροκαρδιογραφικά κριτήρια των Sokolow και Lyon (*SOKOLOW & LYON, 1949*), συνεπικουρούμενα από υπερηχοκαρδιογραφική επιβεβαίωση, όπου ήταν διαθέσιμη.

Επίσης, πραγματοποιήσαμε συνεντεύξεις στους συζύγους και στα άτομα του φιλικού περιβάλλοντος των πασχόντων για να αξιολογηθεί η καταλληλότητά τους για να συμπεριληφθούν στην ομάδα ελέγχου. Συνολικά, 306 νορμοτασικά, υγιή άτομα συλλέγησαν σύμφωνα με τα ακόλουθα κριτήρια: 1. ηλικία άνω των 20 ετών, 2. απουσία υπέρτασης ή λήψης αντι-υπερτασικής αγωγής στο ιατρικό ιστορικό του ατόμου, 3. ΣΑΠ/ΔΑΠ<140/90mmHg, αντίστοιχα, 4. απουσία χρονίου νοσήματος (νεφρικού, καρδιαγγειακού, ηπατικού, ενδοκρινικού νοσήματος ή καρκίνου) ή λήψη χρόνιας φαρμακευτικής αγωγής, 5. απουσία σχέσης εξ αίματος με τους πάσχοντες. Από κάθε άτομο ελήφθησαν 10 ml αίματος για προσδιορισμό βιοχημικών παραμέτρων και εξαγωγή DNA.

#### *Πειραματικές μετρήσεις*

Οι βιοχημικοί δείκτες (νεφρική λειτουργία, ηλεκτρολύτες, λιπίδια αίματος) καθορίστηκαν με καθιερωμένες μεθόδους από βιοχημικά εργαστήρια. Η εξαγωγή DNA έγινε από ολικό αίμα με την εμπορικά διαθέσιμη συσκευή QIAamp DNA blood kit (QIAGEN, Valencia, CA, USA) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Η γονοτύπωση κάθε πολυμορφισμού πραγματοποιήθηκε με την τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) και στη συνέχεια με πέψη του προϊόντος με ένζυμα περιορισμού (περιοριστικές ενδονουκλεάσες-restriction enzymes) και ηλεκτροφόρηση των θραυσμάτων σε γέλη αγαρόζης προς ανίχνευση των αντίστοιχων ζωνών για κάθε πολυμορφισμό [πολυμορφισμοί μήκους θραύσματος περιορισμού (restriction fragment length polymorphism / RFLP)].

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για κάθε PCR παρουσιάζονται στον Πίνακα 17 και αποτελούν εκκινητές που έχουν χρησιμοποιηθεί κατ'επανάληψη με επιτυχία στη βιβλιογραφία (*Kim et al., 2003; Awata et al., 2004*):

*Πίνακας 17: Ζεύγη εκκινητών για την εκτέλεση της PCR κάθε πολυμορφισμού.*

Πολυμορφισμός	Ζεύγος εκκινητών
G894T	5'-AAGGCAGGAGACAGTGGATGGA-3' 5'-CCCAGTCAATCCCTTTGGTGCTCA-3'

4a/b	5'-AGGCCCTATGGTAGTGCCTT-3' 5'-TCTCTTAGTGCTGTGGTCAC-3'
T786C	5'-TGGCCTGAAGTGCCTGGAGAGT-3' 5'-AAGTGGGGGACACAAAAGAGCA-3'

Τα εργαστηριακά πρωτόκολλα που ακολουθήθηκαν για τη γονοτυπώση κάθε πολυμορφισμού παρουσιάζονται στο Παράρτημα της παρούσας διατριβής. Τα δείγματα έφεραν κωδικοποίηση έτσι ώστε το εργαστηριακό προσωπικό να αγνοεί την κλινική κατάσταση των ατόμων κατά τη διαδικασία γονοτύπωσης (blinded genotyping).

#### Στατιστική ανάλυση

**5α, 5β.** Όλες οι στατιστικές αναλύσεις έγιναν με το λογισμικό SAS software (v9.1 SAS Institute Inc, NC USA). Οι τιμές των κλινικών παραμέτρων εκφράζονται ως μέση τιμή  $\pm$  τυπική απόκλιση. Για τη σύγκριση συνεχών και κατηγορικών μεταβλητών χρησιμοποιήθηκαν οι δοκιμασίες Student t-test και  $\chi^2$  test, αντίστοιχα. Κάθε αποτέλεσμα με  $p < 0.05$  θεωρήθηκε στατιστικά σημαντικό. Το τεστ  $\chi^2$  με έναν βαθμό ελευθερίας χρησιμοποιήθηκε για να ελεγχθεί το εάν η κατανομή των γονοτύπων στην ομάδα ελεγχου ήταν σε ισορροπία (HWE) ( $p \geq 0.05$ ). Διαφορές στην κατανομή των γονοτύπων και των συχνοτήτων αλληλίων μεταξύ πασχόντων και μαρτύρων ελέγχθηκε με το τεστ  $\chi^2$  test. Η συσχέτιση εκφράστηκε ως λόγος αναλογιών (OR) με το αντίστοιχο διάστημα εμπιστοσύνης 95% (95% CI).

**5α.** Χρησιμοποιήθηκε πολλαπλή λογαριθμιστική εξάρτηση (λογαριθμιστική παλινδρόμηση-multiple regression analysis) για να γίνει προσαρμογή της γενετικής συσχέτισης κάθε πολυμορφισμού με την υπέρταση λαμβάνοντας υπόψη τις επιδράσεις συγγενικών παραγόντων (ηλικία, ηλικία<sup>2</sup>, φύλο, δείκτης μάζας σώματος (ΔΜΣ-BMI) και καπνιστική συνήθεια). Για τα μοντέλα πολλαπλής λογαριθμιστικής εξάρτησης, το γενετικό αποτέλεσμα του μεταλλαγμένου αλληλίου (786C\*, 4a\* και 894T\*, αντίστοιχα) θεωρήθηκε ως επικρατούν (φορείς της μετάλλαξης έναντι ομοζυγωτών αγρίου τύπου), υπολειπόμενο (ομοζυγώτες της μετάλλαξης έναντι φορέων του αγρίου τύπου), προσθετικό (ομοζυγώτες της μετάλλαξης έναντι ομοζυγωτών αγρίου τύπου), ή συν-επικρατούν (ετεροζυγώτες έναντι ομοζυγωτών) για κάθε πολυμορφισμό του γονιδίου NOS3. Η ανάλυση ανισορροπίας σύνδεσης και η ανάλυση απλοτύπων έγινε με τα λογισμικά SHEsis και HAPSTAT (Shi & He, 2005). Η σειρά των πολυμορφισμών στους εκτιμώμενους απλοτύπους ήταν η

ακόλουθη T786C, 4a/b, G894T, ώστε να ανταποκρίνεται στη φυσική θέση των πολυμορφισμών στο γονίδιο *NOS3*. Η συχνότητα 3% χρησιμοποιήθηκε ως ουδός για τις αναλύσεις των απλοτύπων.

**5β.** Χρησιμοποιήθηκε πολλαπλή λογαριθμιστική εξάρτηση για να γίνει προσαρμογή της γενετικής συσχέτισης κάθε πολυμορφισμού με την ΥΑΚ λαμβάνοντας υπόψη τις επιδράσεις συγχυτικών παραγόντων. Η επιλογή των παραγόντων βασίστηκε στον έλεγχο μεταβλητών που διέφεραν μεταξύ υπερτασικών ατόμων με ή χωρίς ΥΑΚ καθώς και μεταβλητών που είναι γνωστό βιβλιογραφικά ότι αποτελούν παράγοντες κινδύνου για την ΥΑΚ (ηλικία, φύλο, BMI, στεφανιαία νόσος, ΣΑΠ, κάπνισμα, αντιυπερτασική αγωγή, διάρκεια του νοσήματος). Το τελικό μοντέλο προέκυψε μετά από παλινδρομη επιλογή των μεταβλητών και συμπεριέλαβε τις ακόλουθες μεταβλητές ως προγνωστικούς παράγοντες της ΥΑΚ: Πίεση Παλμού, καπνιστική συνήθεια, διάρκεια του νοσήματος και γονότυπος ενδιαφέροντος. Για το μοντέλο πολλαπλής λογαριθμιστικής εξάρτησης, το γενετικό αποτέλεσμα του μεταλλαγμένου αλληλίου (786C\*, 4a\* και 894T\*, αντίστοιχα) θεωρήθηκε ως επικρατούν (φορείς της μετάλλαξης έναντι ομοζυγωτών αγρίου τύπου).

Η ανάλυση απλοτύπων έγινε με το λογισμικό SHEsis (*Shi & He, 2005*). Η σειρά των πολυμορφισμών στους εκτιμώμενους απλοτύπους ήταν η ακόλουθη T786C, 4a/b, G894T, ώστε να ανταποκρίνεται στη φυσική θέση των πολυμορφισμών στο γονίδιο *NOS3*. Η συχνότητα 3% χρησιμοποιήθηκε ως ουδός για τις αναλύσεις των απλοτύπων.

### **Αποτελέσματα**

**5α.** Τα κύρια κλινικά και δημογραφικά χαρακτηριστικά των πασχόντων και των μαρτύρων περιγράφονται στον Πίνακα 18. Η ηλικία, το άρρεν φύλο ήταν στατιστικά σημαντικά συχνότερα στους πάσχοντες, ενώ οι πάσχοντες εμφάνιζαν και υψηλότερες τιμές BMI, ΣΑΠ, ΔΑΠ, κρεατινίνης και ουρίας συγκριτικά με τους μάρτυρες, ως αναμένετο. Μεταξύ των πασχόντων, 28% έπασχαν και από στεφανιαία νόσο ενώ σε ποσοστό 90% ελάμβαναν αντιυπερτασική αγωγή ή στατίνες.

Η γονοτύπωση ήταν επιτυχής σε ποσοστό 96%, 99% και 99% των ατόμων για τους πολυμορφισμούς T786C, 4a/b και G894T, αντίστοιχα. Ενδεικτικές απεικονίσεις της ηλεκτροφόρησης αгарόξης παρουσιάζονται στο Παράρτημα της παρούσας διατριβής.

Η κατανομή των γονοτύπων και η συχνότητα των αλληλίων παρουσιάζονται στον Πίνακα 19. Η κατανομή των γονοτύπων στην ομάδα ελέγχου βρισκόταν σε ισορροπία HWE σε όλους τους πολυμορφισμούς ( $p=0.39, 0.63$  και  $0.16$  για T786C, 4a/b και G894T αντίστοιχα). Η κατανομή των γονοτύπων διέφερε σημαντικά μεταξύ πασχόντων και μαρτύρων μόνον για τον ιντρονικό πολυμορφισμό 4a/b (Πίνακας 19). Στην μονοπαραγοντική ανάλυση, υπό το επικρατούν μοντέλο, οι φορείς του μεταλλαγμένου αλληλίου  $a^*$  ήταν κατά 36% λιγότερο πιθανό να ανπτύξουν υπέρταση ( $OR=0.64, 95\% CI (0.44-0.93)$ ) συγκρινόμενοι με ομοζυγώτες για το προγονικό αλληλίο  $b^*$ . Εντούτοις, το προστατευτικό αποτέλεσμα του αλληλίου  $a^*$  δεν ήταν σημαντικό μετά από προσαρμογή για συγχυτικούς παράγοντες κατά την πολλαπλή λογαριθμιστική εξάρτηση (προσαρμοσμένο  $OR=0.52, 95\% CI (0.26-1.04)$ ) (Πίνακας 20). Δεν παρατηρήθηκε σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ της φορείας του αλληλίου  $a^*$  και της καπνιστικής συνήθειας ( $p$  για αλληλεπίδραση  $=0.44$ ). Οι υπόλοιπες αναλύσεις, μονοπαραγοντικές και πολυπαραγοντικές, δεν έδειξαν σημαντικότητα για τους πολυμορφισμούς T786C και G894T και παρουσιάζονται στον Πίνακα 20.

Η ανάλυση ανισορροπίας σύνδεσης κατά ζεύγη για τους 3 πολυμορφισμούς πραγματοποιήθηκε για τις μετρήσεις Lewontin standardized disequilibrium coefficient  $D'$  και squared correlation coefficient  $r^2$ , και στις 2 ομάδες ξεχωριστά (Ardlie et al., 2002; Kruglyak, 1997). Όλες οι συγκρίσεις ήταν στατιστικά σημαντικές για ύπαρξη ανισορροπίας σύνδεσης ( $p<0.05$ ), αν και ισχυρή ανισορροπία σύνδεσης ( $D'>0.8$ ) ανευρέθη μόνον στην περίπτωση των πολυμορφισμών 4a/b και G894T στην ομάδα ελέγχου (Πίνακας 21).

Η κατανομή των συχνοτήτων των εκτιμώμενων απλοτύπων σε πάσχοντες και μάρτυρες παρουσιάζεται στον Πίνακα 22. Προσδιορίστηκαν 6 κύριοι απλότυποι με συχνότητες  $>3\%$ . Το σφαιρικό τεστ  $X^2$  για συσχέτιση των απλοτύπων έδειξε ότι υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ πασχόντων και μαρτύρων ( $p=0.03$ ). Αυτή η διαφορά οφειλόταν στον απλότυπο T-a-G\*, ο οποίος ήταν πιο συχνός στους μάρτυρες (5.5%) συγκριτικά με τους πάσχοντες (2%) ( $p=0.02$ ), προσφέροντας προστασία έναντι της ανάπτυξης υπερτάσεως. Διερεύνηση πιθανών αλληλεπιδράσεων του απλοτύπου T-a-G\* με άλλες μεταβλητές (ηλικία, φύλο, BMI, καπνιστική συνήθεια) δεν ανίχνευσε σημαντικά αποτελέσματα ( $p\text{-values}>0.05$ ).

**5β.** Τα κύρια κλινικά και δημογραφικά χαρακτηριστικά των υπερτασικών ασθενών με ή χωρίς YAK περιγράφονται στον Πίνακα 23. Η πίεση παλμού ήταν

σημαντικά υψηλότερη στα άτομα με ΥΑΚ, τα οποία ήταν σε σημαντικά μεγαλύτερο ποσοστό καπνιστές.

Η γονοτύπωση ήταν επιτυχής σε ποσοστό 98% των ατόμων και για τους 3 πολυμορφισμούς. Η κατανομή των γονοτύπων παρουσιάζεται στον Πίνακα 24 και βρισκόταν σε ισορροπία HWE σε όλους τους πολυμορφισμούς ( $p=0.09$ ,  $0.21$  και  $0.28$  για T786C, 4a/b και G894T, αντίστοιχα) στην ομάδα ελέγχου. Δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές συσχετίσεις στις μονοπαραγοντικές και πολυπαραγοντικές αναλύσεις για κάθε πραγματοποιηθείσα σύγκριση (Πίνακας 25).

Η κατανομή των συχνοτήτων των εκτιμώμενων απλοτύπων σε υπερτασικούς με και χωρίς ΥΑΚ παρουσιάζεται στον Πίνακα 26. Προσδιορίστηκαν 7 κύριοι απλότυποι με συχνότητες  $>3\%$ . Το σφαιρικό τεστ  $\chi^2$  για συσχέτιση των απλοτύπων έδειξε ότι υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των 2 ομάδων ( $p=0.048$ ). Αυτή η διαφορά οφειλόταν στον απλότυπο C-a-T\*, ο οποίος ήταν παρών μόνον στην ομάδα των ασθενών με ΥΑΚ (3.4%,  $p=0.02$ ), συμβάλλοντας έτσι στην αύξηση του κινδύνου εμφάνισης ΥΑΚ.

*Πίνακας 18. Κλινικά χαρακτηριστικά σε πάσχοντες και μάρτυρες*

	Πάσχοντες (n=230)	Μάρτυρες (n=306)	p-value
Ηλικία (έτη)	63.9 (9.4)	40.8 (18.3)	<0.05
Άρρενες, n (%)	125 (54.4)	68 (22.2)	<0.05
BMI	28.7 (4.1)	27.5 (4.4)	<0.05
Καπνιστές, n (%)	84 (36.5)	80 (29.9)	0.08
ΣΑΠ (mmHg)	145.3 (15.7)	124.4 (12.3)	<0.05
ΔΑΠ (mmHg)	85.1 (10.2)	68.8 (9.7)	<0.05
ΠΠ (mmHg)	59.3 (17.2)	57.1 (14.1)	0.19
Στεφανιαία νόσος, n (%)	65 (28.3)	-	N/A
Creatinine (mg/dL)	1.09 (0.8)	0.92 (0.9)	<0.05
Urea (mg/dL)	40.8 (8.6)	36.5 (6.6)	<0.05
Potassium (mmol/L)	4.3 (0.5)	4.4 (0.3)	0.26
Sodium (mmol/L)	138.4 (3.1)	140.0 (4.5)	0.38
Total Cholesterol (mg/dL)	190.88 (48.4)	-	-
LDL Cholesterol (mg/dL)	113.7 (39.5)	-	-
HDL Cholesterol (mg/dL)	46.9 (17.8)	-	-
Triglycerides (mg/dL)	132.4 (64.5)	-	-
Φαρμακευτική αγωγή (%)	89.6	-	-
ACE-inhibitors (%)	45.2	-	-
ARBs (%)	29.0	-	-
beta-blockers (%)	50.3	-	-
CCBs (%)	36.8	-	-
Diuretics (%)	50.9	-	-
Nitrates (%)	13.5	-	-
Statins (%)	39.7	-	-

Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή (τυπική απόκλιση), εκτός και αν ορίζεται διαφορετικά. Συντομογραφίες: BMI= body mass index, LDL= low-density lipoprotein, HDL= high density lipoprotein, ACE= angiotensin converting enzyme, ARBs= angiotensin receptor blockers, CCBs= calcium channel blockers

Πίνακας 19. Κατανομή γονοτύπων και αλληλίων σε πάσχοντες και μάρτυρες για τους 3 πολυμορφισμούς του γονιδίου NOS3.

	Πάσχοντες, n (%)	Μάρτυρες, n (%)	p-value
T786C			
TT	69 (30.4)	101 (35.0)	
TC	118 (52.0)	148 (51.2)	
CC	40 (17.6)	40 (13.8)	0.37 <sup>a</sup>
T alleles	246 (55.4)	350 (60.6)	
C alleles	198 (44.6)	228 (39.4)	0.12 <sup>b</sup>
Intron 4a/b			
4b/b	165 (72.4)	190 (62.7)	
4a/b	59 (25.9)	101 (33.3)	
4a/b	4 (1.7)	12 (4.0)	0.04 <sup>a</sup>
b alleles	389 (85.3)	481 (79.4)	
a alleles	67 (14.7)	125 (20.6)	0.03 <sup>b</sup>
G894T			
GG	99 (43.4)	135 (44.7)	
GT	95 (41.7)	130 (43.1)	
TT	34 (14.9)	37 (12.2)	0.67 <sup>a</sup>
G alleles	283 (63.5)	400 (66.2)	
T alleles	163 (36.5)	204 (33.8)	0.39 <sup>b</sup>

<sup>a</sup>p-value για τη σύγκριση της κατανομής γονοτύπων, <sup>b</sup>p-value για τη σύγκριση της συχνότητας αλληλίων.

Πίνακας 20. Προσαρμοσμένα και μη προσαρμοσμένα OR με τα αντίστοιχα 95% CI για τη συσχέτιση των γονοτύπων NOS3 με την υπέρταση.

Πολυμορφισμός	Μη προσαρμοσμένα		Προσαρμοσμένα	
	OR (95% CI)	p-value	OR (95% CI)	p-value
T786C				
Επικρατούν μοντέλο	1.23 (0.85-1.79)	0.28	1.30 (0.64-2.63)	0.47
Υπολειπόμενο μοντέλο	1.33 (0.83-2.15)	0.24	0.77 (0.33-1.83)	0.56
Προσθετικό μοντέλο	1.46 (0.86-2.49)	0.16	0.99 (0.38-2.62)	0.98
Συν-επικρατούν μοντέλο	1.03 (0.73-1.42)	0.86	1.48 (0.75-2.93)	0.26
Intron 4a/b				
Επικρατούν μοντέλο	0.64 (0.44-0.93)	0.02	0.52 (0.26-1.04)	0.06
Υπολειπόμενο μοντέλο	0.43 (0.14-1.36)	0.15	0.49 (0.08-3.07)	0.45
Προσθετικό μοντέλο	0.38 (0.12-1.21)	0.10	0.40 (0.06-2.78)	0.35
Συν-επικρατούν μοντέλο	0.69 (0.48-1.02)	0.06	0.56 (0.28-1.13)	0.10
G894T				



Επικρατούν μοντέλο	1.05 (0.75-1.49)	0.77	1.51 (0.78-2.92)	0.22
Υπολειπόμενο μοντέλο	1.25 (0.76-2.07)	0.37	1.04 (0.38-2.77)	0.94
Προσθετικό μοντέλο	1.25 (0.74-2.14)	0.41	1.28 (0.46-3.56)	0.64
Συν-επικρατούν μοντέλο	0.94 (0.67-1.34)	0.75	1.51 (0.77-2.96)	0.23

*Πίνακας 21. Μετρήσεις ανισορροπίας σύνδεσης [ $D'$ , ( $r^2$ )] κατά ζεύγη για τους πολυμορφισμούς του γονιδίου NOS3 σε πάσχοντες και μάρτυρες.*

Πολυμορφισμός	Intron 4a/b	G894T
T786C		
Πάσχοντες	0.46 <sup>a</sup> (0.05) <sup>a</sup>	0.34 <sup>a</sup> (0.09) <sup>a</sup>
Μάρτυρες	0.44 <sup>a</sup> (0.15) <sup>a</sup>	0.51 <sup>a</sup> (0.11) <sup>a</sup>
Intron 4a/b		
Πάσχοντες	-	0.44 <sup>a</sup> (0.02) <sup>a</sup>
Μάρτυρες	-	0.82 <sup>a</sup> (0.09) <sup>a</sup>

<sup>a</sup> $p < 0.05$ .

*Πίνακας 22. Κατανομή των απλοτύπων του γονιδίου NOS3 σε πάσχοντες και μάρτυρες.*

Απλότυπος	Πάσχοντες (%)	Μάρτυρες (%)	p-value
T-b-G*	47.2	43.1	0.26
C-b-T*	26.4	20.9	0.07
C-a-G*	11.9	13.7	0.43
T-b-T*	7.9	11.5	0.09
C-b-G*	3.7	4.1	0.77
T-a-G*	2	5.5	0.02
άλλος	0.9	1.2	-
Σφαιρικό τεστ συσχέτισης			0.03

*Πίνακας 23. Κλινικά χαρακτηριστικά σε υπερτασικούς ασθενείς με και χωρίς υπερτροφία της αριστερής κοιλίας (YAK).*

	Ασθενείς με YAK (n=64)	Ασθενείς χωρίς (n=166)	p-value
Ηλικία (έτη)	64.5 (8.9)	62.9 (9.2)	0.32
Άρρενες, n (%)	39 (60.5)	87 (52.3)	0.35
BMI	28.7 (4.6)	28.9 (3.9)	0.84
Καπνιστές, n (%)	43 (67.4)	70 (41.9)	0.01
ΣΑΠ (mmHg)	150.2 (26.3)	142.3 (21.0)	0.06
ΔΑΠ (mmHg)	82.1 (15.0)	81.6 (10.2)	0.82
ΠΠ (mmHg)	68.1 (17.1)	60.6 (16.2)	0.01
Στεφανιαία νόσος, n (%)	24 (37.2)	61 (36.6)	0.95
Διάρκεια υπέρτασης, έτη (median (IQR))	10 (5-20)	8 (3.5-15)	0.54
Creatinine (mg/dL)	1.06 (0.3)	1.12 (0.9)	0.73
Urea (mg/dL)	46.1 (20.4)	42.7 (14.1)	0.31
Potassium (mmol/L)	4.29 (0.5)	4.30 (0.5)	0.88
Sodium (mmol/L)	137.8 (3.4)	138.9 (2.9)	0.22
Total Cholesterol (mg/dL)	196.0 (46.1)	188.4 (48.1)	0.45
LDL Cholesterol (mg/dL)	118.8 (36.0)	111.2 (41.1)	0.38
HDL Cholesterol (mg/dL)	49.1 (25.4)	45.8 (17.2)	0.39

Triglycerides (mg/dL)	132.1 (50.1)	132.5 (70.5)	0.97
Φαρμακευτική αγωγή (%)	93	89.3	0.48
Angiotensin converting enzyme -inhibitors (%)	46.5	44.6	0.83
Angiotensin receptor blockers (%)	25.6	30.4	0.56
Beta-blockers (%)	55.8	48.2	0.40
Calcium channel blockers (%)	37.2	36.6	0.94
Diuretics (%)	48.8	51.7	0.74

*Πίνακας 24. Κατανομή γονοτύπων σε ασθενείς με και χωρίς ΥΑΚ για τους 3 πολυμορφισμούς του γονιδίου NOS3.*

Πολυμορφισμός	Ασθενείς με ΥΑΚ, n (%)	Ασθενείς χωρίς ΥΑΚ, n (%)	p-value
T786C			
TT	24 (0.37)	47 (0.28)	0.195
TC	27 (0.42)	90 (0.55)	
CC	13 (0.20)	25 (0.15)	
Intron 4a/b			
4b/b	41 (0.64)	120 (0.73)	0.069
4a/b	19 (0.29)	41 (0.25)	
4a/a	3 (0.04)	1 (0.01)	
G894T			
GG	27 (0.42)	74 (0.45)	0.464
GT	24 (0.37)	67 (0.41)	
TT	13 (0.20)	22 (0.13)	

*Πίνακας 25. Προσαρμοσμένα και μη προσαρμοσμένα OR με τα αντίστοιχα 95% CI για τη συσχέτιση των γονοτύπων NOS3 με την ΥΑΚ.*

Πολυμορφισμός	Μη προσαρμοσμένα		Προσαρμοσμένα	
	OR (95% CI)	p-value	OR (95% CI)	p-value
T786C				
786C*φορεία	0.68 (0.37-1.25)	0.27	0.46 (0.20-1.08)	0.08
786C* alleles	0.93 (0.61-1.41)	0.75	-	-
Intron 4a/b				
4a* φορεία	1.53 (0.82-2.87)	0.19	1.29 (0.57-2.89)	0.54
4a* alleles	1.62 (0.94-2.78)	0.11	-	-
G894T				
894T* φορεία	1.28 (0.71-2.31)	0.46	1.11 (0.50-2.47)	0.79
894T* alleles	1.24 (0.81-1.89)	0.33	-	-

*Πίνακας 26. Κατανομή των απλοτύπων του γονιδίου NOS3 σε πάσχοντες και μάρτυρες.*

Απλότυπος	Ασθενείς με ΥΑΚ (%)	Ασθενείς χωρίς ΥΑΚ (%)	p-value
T-b-G*	42.5	48.8	0.35
C-b-T*	24.7	27.2	0.69
C-a-G*	10.9	12.1	0.79

T-b-T*	10.2	6.5	0.26
C-b-G*	2.8	4	0.64
T-a-G*	4.2	1.1	0.07
C-a-T*	3.4	0	<b>0.008</b>
άλλος	1.2	0.5	-
Σφαιρικό τεστ συσχέτισης			<b>0.048</b>

### Συζήτηση των αποτελεσμάτων

Οι περιγραφείσες ΜΓΣ εξέτασαν τη σχέση μεταξύ πολυμορφισμών και απλοτύπων του γονιδίου *NOS3* και της εμφάνισης υπέρτασης και ΥΑΚ.

Στη ΜΓΣ της υπέρτασης, η ανάλυση μεμονωμένων πολυμορφισμών ανέδειξε συσχέτιση μόνο για τον πολυμορφισμό 4a/b. Αντίθετα με ό,τι προσμένετο, η φορεία του αλληλίου a\* συσχετίστηκε με 36% ελάττωση κινδύνου ανάπτυξης υπέρτασης (*Kitsios GD & Zintzaras E, 2009a*). Η μετα-ανάλυση που περιγράφηκε στην παρούσα διατριβή είχε αναδείξει έναν αυξημένο κίνδυνο σχετιζόμενο με το αλληλίο a\* (22% αυξημένος κίνδυνος υπέρτασης) (*Zintzaras et al., 2006b*). Αξίζει να σημειωθεί ότι αυτή η συσχέτιση είχε παρατηρηθεί μόνον σε Καυκάσιους. Στην παρούσα ανάλυση, η μη προσαρμοσμένη ανάλυση στον Καυκάσιο πληθυσμό μας απεκάλυψε την ύπαρξη συσχέτισης, αλλά στην αντίθετη κατεύθυνση (προστατευτική επίδραση του αλληλίου a\*). Εντούτοις, η συσχέτιση έχασε τη σημαντικότητά της όταν πιθανοί συγχυτικοί παράγοντες ελήφθησαν υπόψη. Επιπλέον, σε προηγούμενες μελέτες έχει περιγραφεί ότι η επίδραση του πολυμορφισμού 4a/b εξαρτάται από την καπνιστική συνήθεια (*Casas et al., 2006*). Δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές αλληλεπιδράσεις γονοτύπων με το κάπνισμα στην ανάλυσή μας. Τα αποτελέσματα για τους πολυμορφισμούς G894T και T786C ήταν συμβατά με τα αποτελέσματα της μετα-ανάλυσης (απουσία συσχέτισης).

Στην ανάλυση απλοτύπων, η κατανομή του σχετικά σπάνιου απλοτύπου T-a-G\* βρέθηκε να είναι σημαντικά διαφορετική μεταξύ πασχόντων και μαρτύρων,

προσφέροντας προστασία έναντι της ανάπτυξης υπέρτασης (*Kitsios GD & Zintzaras E, 2009a*). Ο απλότυπος αυτός περιλαμβάνει το μεταλλαγμένο αλληλίο του πολυμορφισμού 4a/b μαζί με τα προγονικά αλληλίου των πολυμορφισμών G894T και T786C. Αν και δεν ήταν στατιστικά σημαντικά στις επιμέρους αναλύσεις, οι σημειακές συσχετίσεις των αλληλίων αυτών βρισκόντουσαν στην προστατευτική κατεύθυνση. Η παρούσα μελέτη δεν ήταν σε θέση να παρέχει περισσότερες πληροφορίες σχετικά με την υπεύθυνη λειτουργική ποικιλομορφία του γονιδίου που απιεκονίζεται μέσω αυτού του απλοτύπου. Η ανάλυση ανισορροπίας σύνδεσης έδειξε την ύπαρξη ισχυρής σύνδεσης μεταξύ 4a/b και G894T στους μάρτυρες, σηματοδοτώντας ένα πιθανό σημείο ενδιαφέροντος.

Προηγούμενες μελέτες έχουν δημοσιεύσει αντικρούμενα στοιχεία σχετικά με το ρόλο του απλοτύπου T-a-G\*. Αν και δεν ανιχνεύθηκε καμία συσχέτιση με την παραγωγή NO (*Sandrim et al., 2007*), ο απλότυπος T-a-G\* έχει περιγραφεί να προδιαθέτει στην ανάπτυξη υπέρτασης (*Kumar et al., 2009*) ή να είναι προστατευτικός έναντι της ανάπτυξης υπέρτασης της κυήσεως και προεκλαμψίας (*Sandrim et al., 2007*). Δεδομένου ότι η απλοτυπική δομή του γονιδίου δεν έχει ξαναπεριγραφεί στον ελληνικό πληθυσμό, είναι πιθανόν οι διαφορές αυτές να οφείλονται στους διαφορετικές εθνικότητες που έχουν εξεταστεί. Πάντως, ο απλότυπος T-a-G\* είχε χαμηλότερη συχνότητα στη μελέτη μας (2% και 5.5% σε πάσχοντες και μάρτυρες) σε σύγκριση με προηγούμενες αναφορές (συχνότητες που κυμαίνονται από 6% έως 20%).

Στη μελέτη της YAK, τα αποτελέσματα της ανάλυσης των μεμονωμένων πολυμορφισμών ήταν συνολικά αρνητικά (*Kitsios GD et al., 2009*). Η ανάλυση απλοτύπων έδειξε ότι ένας σχετικά σπάνιος απλότυπος C-a-T\* συσχετίστηκε με την ανάπτυξη YAK, καθώς ήταν παρών μόνο σε ασθενείς με YAK και δεν παρατηρήθηκε σε υπερτασικούς ασθενείς χωρίς YAK (*Kitsios GD et al., 2009*).

Ο απλότυπος αυτός αποτελείται από τα μεταλλαγμένα αλληλίου και των τριών πολυμορφισμών του γονιδίου *NOS3*, ενώ δεν έχει περιγραφεί συσχέτισή του με υπέρταση ή YAK σε προηγούμενη μελέτη. Παρόλα αυτά, μια προηγούμενη μελέτη καταγράφει τον απλότυπο C-a-T\* ως προδιαθεσικό απλότυπο για την ανάπτυξη διαβητικής νεφροπάθειας (*Ezzidi et al., 2008*).

Ο έλεγχος των απλοτύπων είναι δυνατό να υπερκεράσει ορισμένα από τα προβλήματα που αντιμετωπίζονται στις αναλύσεις μεμονωμένων δεικτών, δεδομένου ότι οι αλληλεπιδράσεις πολλών πολυμορφισμών σε έναν απλότυπο αναμένεται να

αποτελούν τους καθοριστικούς παράγοντες λειτουργικότητας του γονιδίου (*Cardon & Abecasis, 2003; Saleheen et al., 2006; Tanus-Santos & Casella-Filho, 2007; Zintzaras et al., 2006c*). Ιδιαίτερα αν οι δείκτες που κατασκευάζουν έναν απλότυπο αποτελούν και λειτουργικά σημαντικές μεταλλάξεις, τότε οι απλότυποι θα έχουν έναν πιο κρίσιμο βιολογικό ρόλο και η όλη προσέγγιση θα εμφανίζει ενισχυμένη στατιστική ισχύ. Σε συμφωνία με αυτή την υπόθεση εργασίας, δεν ανιχνεύθηκαν σημαντικές συσχετίσεις για τους πολυμορφισμούς T786C και G894T, μολονότι λειτουργικές αναλύσεις έχουν αναδείξει σημαντικό ρόλο και για τους 2 αυτούς πολυμορφισμούς.

Πρόσφατα δεδομένα υποστηρίζουν ένα σημαντικό ρόλο των σπάνιων απλοτύπων για πολυπαραγοντικά νοσήματα, όπως η υπέρταση και η ΥΑΚ (*Liu et al., 2005; Zhu et al., 2005b*). Επιπλέον έχει υποστηριχθεί ότι η μελέτη της συχνής γενετικής ποικιλομορφίας δε θα επαρκέσει για να ερμηνευθεί η «χαμένη κληρονομηκότητα», δηλ. η κληρονομικότητα που δεν έχει ερμηνευθεί από τους πολυμορφισμούς που αποκαλύφθηκαν στις ΜΕΓΣ (*Goldstein, 2009; Kitsios GD & Zintzaras E, 2009b*). Πολλαπλές σπάνιες παραλλαγές (rare variants) εκτιμάται ότι αποτελούν σημαντικούς καθοριστές της γενετικής ευπάθειας σε νοσήματα. Αν και τέτοιες παραλλαγές δεν είναι ανιχνεύσιμες από τις σύγχρονα διαθέσιμες τεχνικές που βασίζονται στη χρήση συνδεδεμένων πολυμορφικών δεικτών, η τεχνολογική πρόοδος των τεχνικών γονοτύπωσης καθώς και η δημιουργία γενετικών χαρτών για την καταγραφή σπάνιων παραλλαγών (1,000 Genomes Project) (*2009*), εκτιμάται ότι θα καταστήσουν δυνατή τη διεξαγωγή ολογονιδιωματικών σαρώσεων για τη διερεύνηση συσχέτισης σπανίων παραλλαγών. Η μεθοδολογία της γονιδιωματικής σύγκλισης θα μπορούσε να συνεπικουρήσει στην επιλογή υποψηφίων γονιδίων για περαιτέρω ενδελεχή μελέτη (*Kitsios & Zintzaras, 2009b*). Για τους λόγους αυτούς, κρίνεται ιδιαίτερα σημαντική η μελέτη των σπάνιων απλοτύπων, οι οποίοι είναι δυνατό να απεικονίζουν επιδράσεις σπανίων παραλλαγών.

Συμπερασματικά, οι 2 ΜΓΣ ανίχνευσαν: 1α. έναν σπάνιο απλότυπο (T-a-G\*) που προσφέρει προστασία στην ανάπτυξη υπέρτασης (*Kitsios GD & Zintzaras E, 2009a*), και 1β. έναν σπάνιο απλότυπο (C-a-T\*) που σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης ΥΑΚ (*Kitsios GD et al., 2009*). Αν και ο έλεγχος σπάνιων απλοτύπων δεν αναμένεται να εφαρμοστεί στην κλινική πράξη λόγω της πιθανής περιορισμένης κλινικής τους χρησιμότητας (βάσει της σπανιότητάς τους), τέτοιοι σπάνιοι απλότυποι είναι δυνατό να παρέχουν σημαντικές πληροφορίες για την αποκάλυψη γονιδίων που

συμμετέχουν στην παθογένεση των νοσημάτων και να αναδείξουν νέους μοριακούς στόχους προς παρέμβαση. Τα αποτελέσματα των μελετών μας χρήζουν όμως επιβεβαίωσης σε διαφορετικές ομάδες πληθυσμού πριν επιχειρηθεί η διαλεύκανση του ακριβούς μοριακού μηχανισμού που αποτελεί τη βάση της παρατηρούμενης συσχέτισης.

## VII. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

### 1. Δημοσιεύσεις του υποψηφίου διδάκτορα στα πλαίσια της παρούσας διδακτορικής διατριβής και συναφών ερευνητικών δραστηριοτήτων

1. **Kitsios** GD, Zintzaras E. Genome-wide association studies: hypothesis-“free” or “engaged”? Translational Res. 2009 [In Press].
2. Stefanidis I, Kytoudis K, Papathanasiou AA, Zaragotas D, Melistas L, **Kitsios** GD, Yiannakouris N, Zintzaras E. XbaI GLUT1 gene polymorphism and the risk of type 2 diabetes with nephropathy. Dis Markers 2009 [In Press].
3. Zintzaras E, **Kitsios** GD. Synopsis and Synthesis of Candidate-Gene Association Studies in Chronic Lymphocytic Leukemia: The CUMAGAS-CLL Information System. Am J Epidemiol. 2009.
4. Zintzaras E, Ziogas DC, **Kitsios** GD et al. MTHFR gene polymorphisms and response to chemotherapy in colorectal cancer: a meta-analysis. Pharmacogenomics. 2009;10(8):1285-94.
5. **Kitsios** GD, Zintzaras E. Genomic convergence of genome-wide investigations for complex traits. Ann Hum Genet. 2009;73(Pt 5):514-9.
6. Kent DM, **Kitsios** G. Against pragmatism: on efficacy, effectiveness and the real world. Trials. 2009;1048.
7. Zintzaras E, **Kitsios** GD, Triposkiadis F et al. APOE gene polymorphisms and response to statin therapy. Pharmacogenomics J. 2009;9(4):248-57.
8. **Kitsios** G, Zintzaras E. ACE (I/D) polymorphism and response to treatment in coronary artery disease: a comprehensive database and meta-analysis involving study quality evaluation. BMC Med Genet. 2009;1050.
9. Zintzaras E, Raman G, **Kitsios** G et al. Angiotensin-converting enzyme insertion/deletion gene polymorphic variant as a marker of coronary artery disease: a meta-analysis. Arch Intern Med. 2008;168(10):1077-89.
10. **Kitsios** G, Zintzaras E. Genetic variation associated with ischemic heart failure: a HuGE review and meta-analysis. Am J Epidemiol. 2007;166(6):619-33.
11. Zintzaras E, **Kitsios** G, Kent D et al. Genome-wide scans meta-analysis for pulse pressure. Hypertension. 2007;50(3):557-64.
12. Karayannis G, **Kitsios** G, Kotidis H et al. Left atrial remodelling contributes to the progression of asymptomatic left ventricular systolic dysfunction to chronic symptomatic heart failure. Heart Fail Rev. 2008;13(1):91-8.

13. Zintzaras E, **Kitsios** G, Stefanidis I. Response to Endothelial Nitric Oxide Synthase Polymorphisms and Susceptibility to Hypertension: Genotype Versus Haplotype Analysis. *Hypertension*. 2006.
14. Zintzaras E, **Kitsios** G. Identification of chromosomal regions linked to premature myocardial infarction: a meta-analysis of whole-genome searches. *J Hum Genet*. 2006;51(11):1015-21.
15. Zintzaras E, **Kitsios** G, Stefanidis I. Endothelial NO synthase gene polymorphisms and hypertension: a meta-analysis. *Hypertension*. 2006;48(4):700-10.
16. Zintzaras E, **Kitsios** G, Harrison GA et al. Heterogeneity-based genome search meta-analysis for preeclampsia. *Hum Genet*. 2006;120(3):360-70.
17. Kanellos D, **Kitsios** G, Kanellos I et al. Anaemia as a symptom of right colon cancer. *Tech Coloproctol*. 2004;8 Suppl 1s62-s64.
18. **Kitsios** GD, Zintzaras E. Synopsis and data synthesis of genetic association studies in hypertension for the adrenergic receptors family genes: the CUMAGAS-HYPERT database. [Under review]. 2009.
19. **Kitsios** GD, Stefanidis I, Zintzaras E. A rare NOS3 haplotype is associated with left ventricular hypertrophy in Caucasian patients with hypertension. [Under review]. 2009.
20. **Kitsios** GD, Zintzaras E. A NOS3 haplotype is protective against hypertension in a Caucasian population. [Under review]. 2009.
21. Alawi A, Alsheikh-Ali, GD **Kitsios**, Balk EM, Mahoney AM, Lau J, Ip S. The vulnerable atherosclerotic plaque: an overview. [Under review]. 2009.
22. Zintzaras E, **Kitsios** GD, Konitsiotis S, Papathanasiou AA, Milingos M, Hadjigeorgiou GM. Synopsis, quality assessment and synthesis of the randomized trials of dopamine agonists in restless legs syndrome treatment. [Under review]. 2009.
23. **Kitsios** GD, Zintzaras E. The mechanistic role of the 9p21.3 gene desert variation in arterial remodeling and cardiovascular risk [Under Review] 2009.



## 2. Εργαστηριακά Πρωτόκολλα που χρησιμοποιήθηκαν για τη γονοτύπωση των πολυμορφισμών του γονιδίου *NOS3* και εικόνες από τις γέλες ηλεκτροφόρησης.

### 1. Protocol: NOS3 4a/b polymorphism

#### PCR:

##### Reaction composition:

HotStarTaq Plus Master mix	10μL
Primer A + Primer B(10μM)	1.5 μL
Coral Load Concentrate:	2μL
Template DNA	1.5μL
dd H <sub>2</sub> O	5μL

**Total volume** 20μL

##### Cycling protocol:

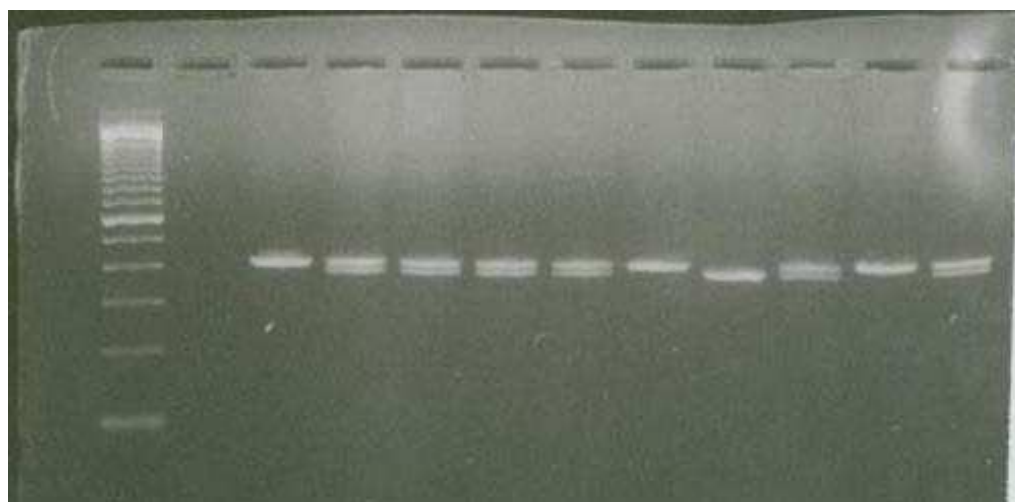
**Initial activation step: 5 min – 95 C** (HotStarTaq DNA polymerase is activated by this heating step)

##### **3-step cycling**

- Denaturation: **1min - 94 C**
- Annealing: **1min - 56 C**
- Extension: **1min – 72 C**

**Number of cycles: 35**

**Final extension: 10min - 72 C.**



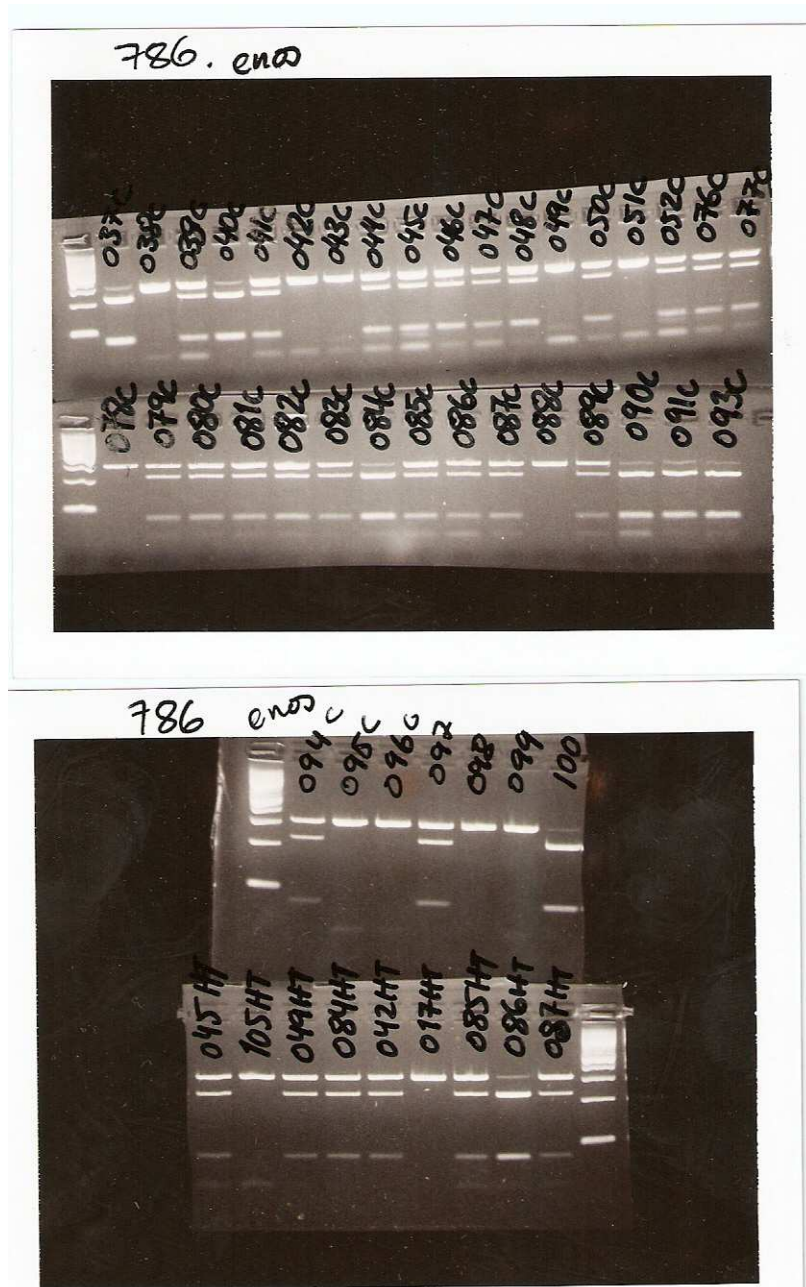
**2. Protocol: NOS3 T786C polymorphism**

HotStarTaq	12,5µL
H <sub>2</sub> O	7µL
DNA	2,5µL
Total volume	24µL

**Cycling conditions**

94o → 5 min	}	34 cycles
94o → 45 sec		
60o → 30sec		
72o → 30sec		
72o → 7 min		

Incubation at 37o C for 4h with 10U *NaeI* ( 3 µL buffer 10x, 2 µL H<sub>2</sub>O, 1 µL *NaeI* per tube)



**3. Protocol: eNOS G894T polymorphism****PCR:****Reaction composition:**

10X PCR buffer minus Mg	2 $\mu$ L
10mM dNTP mixture:	0.4 $\mu$ L
50 mM MgCl <sub>2</sub> :	0.8 $\mu$ L
Primer mix (A+ B)(10 $\mu$ M each)	1 $\mu$ L
Taq DNA Polymerase (5U/ $\mu$ L)	0.5 $\mu$ L
dd H <sub>2</sub> O	12.3 $\mu$ L
Template DNA	3 $\mu$ L
<b><u>Total volume</u></b>	<b><u>20<math>\mu</math>L</u></b>

**Cycling protocol:**

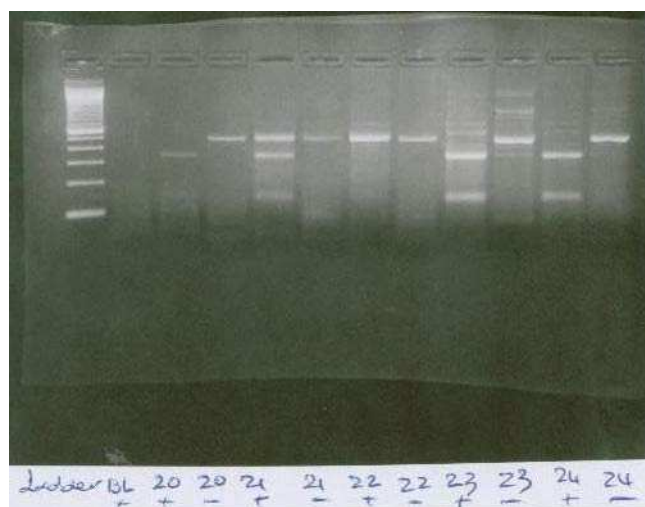
**Initial activation step: 10 min – 94 C**  
**3-step cycling**

- Denaturation: **45sec- 94 C**
- Annealing: **45sec- 61 C**
- Extension: **45sec – 71 C**

**Number of cycles: 37**

**Final extension: 10min - 72 C.**

**Incubation overnight at 37 C with 7.5U *Ban II* (R0119L)(2.5  $\mu$ L buffer +2.5  $\mu$ L *Ban II*)**  
**Electrophoresis 2% agarose gel**



### 3. Βιβλιογραφικές αναφορές των μελετών που συμπεριελήφθησαν στις μετα-αναλύσεις των ΣΕΓΣ για την πίεση παλμού και των ΜΓΣ για το γονίδιο NOS3 και τα γονίδια της οικογένειας των αδρενεργικών υποδοχέων.

Bengtsson K, Melander O, Orho-Melander M, Lindblad U, Rastam J, Rastam L et al.: Polymorphism in the beta(1)-adrenergic receptor gene and hypertension. *Circulation* 2001, 104: 187-190.

Filigheddu F, Reid JE, Troffa C, PinnaPargaglia P, Argiolas G, Testa A et al.: Genetic polymorphisms of the beta-adrenergic system: association with essential hypertension and response to beta-blockade. *Pharmacogenomics J* 2004, 4: 154-160.

Gjesing AP, Andersen G, Albrechtsen A, Glumer C, Borch-Johnsen K, Jorgensen T et al.: Studies of associations between the Arg389Gly polymorphism of the beta1-adrenergic receptor gene (ADRB1) and hypertension and obesity in 7677 Danish white subjects. *Diabet Med* 2007, 24: 392-397.

Shioji K, Kokubo Y, Mannami T, Inamoto N, Morisaki H, Mino Y et al.: Association between hypertension and the alpha-adducin, beta1-adrenoreceptor, and G-protein beta3 subunit genes in the Japanese population; the Suita study. *Hypertens Res* 2004, 27: 31-37.

Ranade K, Jorgenson E, Sheu WH, Pei D, Hsiung CA, Chiang FT et al.: A polymorphism in the beta1 adrenergic receptor is associated with resting heart rate. *Am J Hum Genet* 2002, 70: 935-942.

Borgel J, Schulz T, Bartels NK, Epplen JT, Buchner N, Rump LC et al.: Modifying effects of the R389G beta1-adrenoceptor polymorphism on resting heart rate and blood pressure in patients with obstructive sleep apnoea. *Clin Sci (Lond)* 2006, 110: 117-123.

Hassan M, York KM, Li H, Li Q, Gong Y, Langae TY et al.: Association of beta1-adrenergic receptor genetic polymorphism with mental stress-induced myocardial ischemia in patients with coronary artery disease. *Arch Intern Med* 2008, 168: 763-770.

Nieminen T, Lehtimäki T, Laiho J, Rontu R, Niemela K, Koobi T et al.: Effects of polymorphisms in beta1-adrenoceptor and alpha-subunit of G protein on heart rate and blood pressure during exercise test. The Finnish Cardiovascular Study. *J Appl Physiol* 2006, 100: 507-511.

Yamada Y, Ando F, Shimokata H: Association of gene polymorphisms with blood pressure and the prevalence of hypertension in community-dwelling Japanese individuals. *Int J Mol Med* 2007, 19: 675-683.

Morris BJ, Zee RY, Ying LH, Griffiths LR: Independent, marked associations of alleles of the insulin receptor and dipeptidyl carboxypeptidase-I genes with essential hypertension. *Clin Sci (Lond)* 1993, 85: 189-195.

Bao X, Mills PJ, Rana BK, Dimsdale JE, Schork NJ, Smith DW et al.: Interactive effects of common beta2-adrenoceptor haplotypes and age on susceptibility to hypertension and receptor function. *Hypertension* 2005, 46: 301-307.

Bartels NK, Borgel J, Wieczorek S, Buchner N, Hanefeld C, Bulut D et al.: Risk factors and myocardial infarction in patients with obstructive sleep apnea: impact of beta2-adrenergic receptor polymorphisms. *BMC Med* 2007, 5: 1: 1.

Bengtsson K, Orho-Melander M, Melander O, Lindblad U, Rastam J, Rastam L et al.: Beta(2)-adrenergic receptor gene variation and hypertension in subjects with type 2 diabetes. *Hypertension* 2001, 37: 1303-1308.

Castellano M, Rossi F, Giacche M, Perani C, Rivadossi F, Muesan ML et al.: Beta(2)-adrenergic receptor gene polymorphism, age, and cardiovascular phenotypes. *Hypertension* 2003, 41: 361-367.

Fossum E, Berge KE, Hoiegggen A, Moan A, Rostrup M, Kjeldsen SE et al.: Polymorphisms in candidate genes for blood pressure regulation in young men with normal or elevated screening blood pressure. *Blood Press* 2001, 10: 92-100.

Galletti F, Iacone R, Ragone E, Russo O, Della VE, Siani A et al.: Lack of association between polymorphism in the beta2-adrenergic receptor gene, hypertension, and obesity in the Olivetti heart study. *Am J Hypertens* 2004, 17: 718-720.

Ge D, Huang J, He J, Li B, Duan X, Chen R et al.: beta2-Adrenergic receptor gene variations associated with stage-2 hypertension in northern Han Chinese. *Ann Hum Genet* 2005, 69: 36-44.

Gjesing AP, Andersen G, Burgdorf KS, Borch-Johnsen K, Jorgensen T, Hansen T et al.: Studies of the associations between functional beta2-adrenergic receptor variants and obesity, hypertension and type 2 diabetes in 7,808 white subjects. *Diabetologia* 2007, 50: 563-568.

Heckbert SR, Hindorff LA, Edwards KL, Psaty BM, Lumley T, Siscovick DS et al.: Beta2-adrenergic receptor polymorphisms and risk of incident cardiovascular events in the elderly. *Circulation* 2003, 107: 2021-2024.

Herrmann V, Buscher R, Go MM, Ring KM, Hofer JK, Kailasam MT et al.: Beta2-adrenergic receptor polymorphisms at codon 16, cardiovascular phenotypes and essential hypertension in whites and African Americans. *Am J Hypertens* 2000, 13: 1021-1026.

Kato N, Sugiyama T, Morita H, Kurihara H, Sato T, Yamori Y et al.: Association analysis of beta(2)-adrenergic receptor polymorphisms with hypertension in Japanese. *Hypertension* 2001, 37: 286-292.

Mo W, Zhang GG, Yang TL, Dai XP, Li HH, Zeng H et al.: The genetic polymorphisms of beta3-adrenergic receptor (AR) Trp64Arg and beta2-AR Gln27Glu are associated with obesity in Chinese male hypertensive patients. *Clin Chem Lab Med* 2007, 45: 493-498.

Pereira AC, Floriano MS, Mota GF, Cunha RS, Herkenhoff FL, Mill JG et al.: Beta2 adrenoceptor functional gene variants, obesity, and blood pressure level interactions in the general population. *Hypertension* 2003, 42: 685-692.

Pojoga L, Kolatkar NS, Williams JS, Perlstein TS, Jeunemaitre X, Brown NJ et al.: Beta-2 adrenergic receptor diplotype defines a subset of salt-sensitive hypertension. *Hypertension* 2006, 48: 892-900.

Ranade K, Shue WH, Hung YJ, Hsuing CA, Chiang FT, Pesich R et al.: The glycine allele of a glycine/arginine polymorphism in the beta2-adrenergic receptor gene is associated with essential hypertension in a population of Chinese origin. *Am J Hypertens* 2001, 14: 1196-1200.

Sethi AA, Tybjaerg-Hansen A, Jensen GB, Nordestgaard BG: 164Ile allele in the beta2-Adrenergic receptor gene is associated with risk of elevated blood pressure in women. The Copenhagen City Heart Study. *Pharmacogenet Genomics* 2005, 15: 633-645.

Sunder-Plassmann G, Kittler H, Eberle C, Hirschl MM, Woisetschlager C, Derhaschnig U et al.: Angiotensin converting enzyme DD genotype is associated with hypertensive crisis. *Crit Care Med* 2002, 30: 2236-2241.

Tang W, Devereux RB, Kitzman DW, Province MA, Leppert M, Oberman A et al.: The Arg16Gly polymorphism of the beta2-adrenergic receptor and left ventricular systolic function. *Am J Hypertens* 2003, 16: 945-951.

Xie HG, Stein CM, Kim RB, Gainer JV, Sofowora G, Dishy V et al.: Human beta2-adrenergic receptor polymorphisms: no association with essential hypertension in black or white Americans. *Clin Pharmacol Ther* 2000, 67: 670-675.

Kotanko P, Binder A, Tasker J, DeFreitas P, Kamdar S, Clark AJ et al.: Essential hypertension in African Caribbeans associates with a variant of the beta2-adrenoceptor. *Hypertension* 1997, 30: 773-776.

Candy G, Samani N, Norton G, Woodiwiss A, Radevski I, Wheatley A et al.: Association analysis of beta2 adrenoceptor polymorphisms with hypertension in a Black African population. *J Hypertens* 2000, 18: 167-172.

Jia H, Sharma P, Hopper R, Dickerson C, Lloyd DD, Brown MJ: beta2-adrenoceptor gene polymorphisms and blood pressure variations in East Anglian Caucasians. *J Hypertens* 2000, 18: 687-693.

Wu H, Tang W, Li H, Zhou X, Yang Y, Yu H et al.: Association of the beta2-adrenergic receptor gene with essential hypertension in the non-Han Chinese Yi minority human population. *J Hypertens* 2006, 24: 1041-1047.

Bray MS, Krushkal J, Li L, Ferrell R, Kardina S, Sing CF et al.: Positional genomic analysis identifies the beta(2)-adrenergic receptor gene as a susceptibility locus for human hypertension. *Circulation* 2000, 101: 2877-2882.

Zak I, Sarecka-Hujar B, Krauze J: Cigarette smoking, carrier state of A or G allele of 46A>G and 79C>G polymorphisms of beta2-adrenergic receptor gene, and the risk of coronary artery disease. *Kardiol Pol* 2008, 66: 380-386.

Herrmann SM, Nicaud V, Tiret L, Evans A, Kee F, Ruidavets JB et al.: Polymorphisms of the beta2 -adrenoceptor (ADRB2) gene and essential hypertension: the ECTIM and PEGASE studies. *J Hypertens* 2002, 20: 229-235.

Binder A, Garcia E, Wallace C, Gbenga K, Ben-Shlomo Y, Yarnell J et al.: Haplotypes of the beta-2 adrenergic receptor associate with high diastolic blood pressure in the Caerphilly prospective study. *J Hypertens* 2006, 24: 471-477.

Yu SF, Zhou WH, Jiang KY, Gu GZ, Wang S: Job stress, gene polymorphism of beta2-AR, and prevalence of hypertension. *Biomed Environ Sci* 2008, 21: 239-246.

Misono M, Maeda S, Iemitsu M, Nakata Y, Otsuki T, Sugawara J et al.: Combination of polymorphisms in the beta2-adrenergic receptor and nitric oxide synthase 3 genes increases the risk for hypertension. *J Hypertens* 2009, 27: 1377-1383.

Lin RCY, Ericsson JO, Benjafield AV, Morris BJ: Association of beta2-adrenoceptor Gln27Glu variant with body weight but not hypertension. *Am J Hypertens* 2001, 14: 1201-1204.

Svetkey LP, Timmons PZ, Emovon O, Anderson NB, Preis L, Chen YT: Association of hypertension with beta2- and alpha2c10-adrenergic receptor genotype. *Hypertension* 1996, 27: 1210-1215.

- Lee YW, Oh VM, Garcia E, Taylor EA, Wu H, Yap EP et al.: Haplotypes of the beta2-adrenergic receptor gene are associated with essential hypertension in a Singaporean Chinese population. *J Hypertens* 2004, 22: 2111-2116.
- Bendlova B, Mazura I, Vcelak J, Perusicova J, Palyzova D, Klimes I et al.: Is a mutation of the beta 3-adrenergic receptor gene related to non-insulin-dependent diabetes mellitus and juvenile hypertension in the Czech population? *Ann N Y Acad Sci* 1997, 827:135-43.: 135-143.
- Buettner R, Schaffler A, Arndt H, Rogler G, Nusser J, Zietz B et al.: The Trp64Arg polymorphism of the beta 3-adrenergic receptor gene is not associated with obesity or type 2 diabetes mellitus in a large population-based Caucasian cohort. *J Clin Endocrinol Metab* 1998, 83: 2892-2897.
- Fujisawa T, Ikegami H, Yamato E, Hamada Y, Kamide K, Rakugi H et al.: Trp64Arg mutation of beta3-adrenergic receptor in essential hypertension: insulin resistance and the adrenergic system. *Am J Hypertens* 1997, 10: 101-105.
- Hui P, Nakayama T, Morita A, Sato N, Hishiki M, Saito K et al.: Common single nucleotide polymorphisms in Japanese patients with essential hypertension: aldehyde dehydrogenase 2 gene as a risk factor independent of alcohol consumption. *Hypertens Res* 2007, 30: 585-592.
- Nagano T, Matsuda Y, Tanioka T, Yoshioka T, Hiroi T, Yoshikawa K et al.: No association of the Trp 64 Arg mutation of the beta3-adrenergic receptor gene with obesity, type 2 diabetes mellitus, hyperlipidemia, and hypertension in Japanese patients with schizophrenia. *J Med Invest* 2005, 52: 57-64.
- Pierola J, Barcelo A, de la PM, Barbe F, Soriano JB, Sanchez AA et al.: beta3-Adrenergic receptor Trp64Arg polymorphism and increased body mass index in sleep apnoea. *Eur Respir J* 2007, 30: 743-747.
- Porto PI, Garcia SI, Dieuzeide G, Gonzalez C, Landa MS, Pirola CJ: Clinical features of the metabolic syndrome in adolescents: minor role of the Trp64Arg beta3-adrenergic receptor gene variant. *Pediatr Res* 2004, 55: 836-841.
- Ringel J, Kreutz R, Distler A, Sharma AM: The Trp64Arg polymorphism of the beta3-adrenergic receptor gene is associated with hypertension in men with type 2 diabetes mellitus. *Am J Hypertens* 2000, 13: 1027-1031.
- Ruixing Y, Jinzhen W, Shangling P, Weixiong L, Dezhai Y, Yuming C: Sex differences in environmental and genetic factors for hypertension. *Am J Med* 2008, 121: 811-819.
- Tamaki S, Nakamura Y, Tabara Y, Okamura T, Kita Y, Kadowaki T et al.: Relationship between metabolic syndrome and Trp64arg polymorphism of the beta-adrenergic receptor gene in a general sample: the Shigaraki study. *Hypertens Res* 2006, 29: 891-896.
- Zafarmand MH, van der Schouw YT, Grobbee DE, de Leeuw PW, Bots ML: T64A polymorphism in beta3-adrenergic receptor gene (ADRB3) and coronary heart disease: a case-cohort study and meta-analysis. *J Intern Med* 2008, 263: 79-89.
- Tonolo G, Melis MG, Secchi G, Atzeni MM, Angius MF, Carboni A et al.: Association of Trp64Arg beta 3-adrenergic-receptor gene polymorphism with essential hypertension in the Sardinian population. *J Hypertens* 1999, 17: 33-38.
- Oeveren van-Dybiez AM, Vonkeman HE, Bon MA, van den Bergh FA, Vermes I: Beta 3-adrenergic receptor gene polymorphism and type 2 diabetes in a Caucasian population. *Diabetes Obes Metab* 2001, 3: 47-51.
- Thomas GN, Tomlinson B, Chan JC, Young RP, Critchley JA: The Trp64Arg polymorphism of the beta3-adrenergic receptor gene and obesity in Chinese subjects with components of the metabolic syndrome. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2000, 24: 545-551.
- Strazzullo P, Iacone R, Siani A, Cappuccio FP, Russo O, Barba G et al.: Relationship of the Trp64Arg polymorphism of the beta3-adrenoceptor gene to central adiposity and high blood pressure: interaction with age. Cross-sectional and longitudinal findings of the Olivetti Prospective Heart Study. *J Hypertens* 2001, 19: 399-406.
- Baba T, Nakajima S, Yajima Y: Beta3-adrenergic receptor gene polymorphism is not associated with hypertension in NIDDM patients without nephropathy. *Horm Metab Res* 1998, 30: 629-632.
- Freitas SR, Pereira AC, Floriano MS, Mill JG, Krieger JE: Association of alpha1a-adrenergic receptor polymorphism and blood pressure phenotypes in the Brazilian population. *BMC Cardiovasc Disord* 2008, 8: 40.
- Gu D, Su S, Ge D, Chen S, Huang J, Li B et al.: Association study with 33 single-nucleotide polymorphisms in 11 candidate genes for hypertension in Chinese. *Hypertension* 2006, 47: 1147-1154.
- Etzell JP, Rana BK, Wen G, Parmer RJ, Schork NJ, O'Connor DT et al.: Genetic variation at the human alpha2B-adrenergic receptor locus: role in blood pressure variation and yohimbine response. *Hypertension* 2005, 45: 1207-1213.
- Li JL, Canham RM, Vongpatanasin W, Leonard D, Auchus RJ, Victor RG: Do allelic variants in alpha2A and alpha2C adrenergic receptors predispose to hypertension in blacks? *Hypertension* 2006, 47: 1140-1146.

- Lockette W, Ghosh S, Farrow S, MacKenzie S, Baker S, Miles P et al.: Alpha 2-adrenergic receptor gene polymorphism and hypertension in blacks. *Am J Hypertens* 1995, 8: 390-394.
- Umemura S, Hirawa N, Iwamoto T, Yamaguchi S, Toya Y, Kobayashi S et al.: Association analysis of restriction fragment length polymorphism for alpha 2-adrenergic receptor genes in essential hypertension in Japan. *Hypertension* 1994, 23: I203-I206.
- Sun L, Schulte N, Pettinger P, Regan JW, Pettinger WA: The frequency of alpha 2-adrenoceptor restriction fragment length polymorphisms in normotensive and hypertensive humans. *J Hypertens* 1992, 10: 1011-1015.
- Snapi A, Heinonen P, Tuomainen TP, Alhopuro P, Karvonen MK, Lakka TA et al.: An insertion/deletion polymorphism in the alpha2B-adrenergic receptor gene is a novel genetic risk factor for acute coronary events. *J Am Coll Cardiol* 2001, 37: 1516-1522.
- Vasudevan R, Ismail P, Stanslas J, Shamsudin N, Ali AB: Association of insertion/deletion polymorphism of alpha-adrenoceptor gene in essential hypertension with or without type 2 diabetes mellitus in Malaysian subjects. *Int J Biol Sci* 2008, 4: 362-367.
- Von WF, Bengtsson K, Lindblad U, Rastam L, Melander O: Functional variant in the (alpha)2B adrenoceptor gene, a positional candidate on chromosome 2, associates with hypertension. *Hypertension* 2004, 43: 592-597.
- Ohlin B, Berglund G, Nilsson PM, Melander O: Job strain, decision latitude and alpha2B-adrenergic receptor polymorphism significantly interact, and associate with higher blood pressures in men. *J Hypertens* 2007, 25: 1613-1619.
- Chen W, Srinivasan SR, Elkasabany A, Ellsworth DL, Boerwinkle E, Berenson GS. Combined effects of endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism (G894T) and insulin resistance status on blood pressure and familial risk of hypertension in young adults: the Bogalusa Heart Study. *Am J Hypertens*. 2001;14:1046-1052.
- Lacolley P, Gautier S, Poirier O, Pannier B, Cambien F, Benetos A. Nitric oxide synthase gene polymorphisms, blood pressure and aortic stiffness in normotensive and hypertensive subjects. *J Hypertens*. 1998;16:31-35.
- Miyamoto Y, Saito Y, Kajiyama N, Yoshimura M, Shimasaki Y, Nakayama M, Kamitani S, Harada M, Ishikawa M, Kuwahara K, Ogawa E, Hamanaka I, Takahashi N, Kaneshige T, Teraoka H, Akamizu T, Azuma N, Yoshimasa Y, Yoshimasa T, Itoh H, Masuda I, Yasue H, Nakao K. Endothelial nitric oxide synthase gene is positively associated with essential hypertension. *Hypertension*. 1998;32:3-8.
- Kato N, Sugiyama T, Morita H, Nabika T, Kurihara H, Yamori Y, Yazaki Y. Lack of evidence for association between the endothelial nitric oxide synthase gene and hypertension. *Hypertension*. 1999;33:933-936.
- Benjafield AV, Morris BJ. Association analyses of endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms in essential hypertension. *Am J Hypertens*. 2000;13:994-998.
- Shoji M, Tsutaya S, Saito R, Takamatu H, Yasujima M. Positive association of endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism with hypertension in northern Japan. *Life Sci*. 2000;66:2557-2562.
- Tsujita Y, Baba S, Yamauchi R, Mannami T, Kinoshita M, Yamamoto R, Katsuya T, Higaki J, Ogihara T, Ogata J, Iwai N. Association analyses between genetic polymorphisms of endothelial nitric oxide synthase gene and hypertension in Japanese: The Suita Study. *J Hypertens*. 2001;19:1941-1948.
- Karvonen J, Kauma H, Kervinen K, Rantala M, Ikaheimo M, Paivansalo M, Savolainen MJ, Kesaniemi YA. Endothelial nitric oxide synthase gene Glu298Asp polymorphism and blood pressure, left ventricular mass and carotid artery atherosclerosis in a population-based cohort. *J Intern Med*. 2002;251:102-110.
- Kishimoto T, Misawa Y, Kaetu A, Nagai M, Osaki Y, Okamoto M, Yoshida S, Kurosawa Y, Fukumoto S. eNOS Glu298Asp polymorphism and hypertension in a cohort study in Japanese. *Prev Med*. 2004;39:927-231.
- Fernandez ML, Ruiz R, Gonzalez MA, Ramirez-Lorca R, Couto C, Ramos A, Gutierrez-Tous R, Rivera JM, Ruiz A, Real LM, Grilo A. Association of NOS3 gene with metabolic syndrome in hypertensive patients. *Thromb Haemost*. 2004;92:413-418.
- Djuric T, Zivkovic M, Stankovic A, Mecanin S, Alavantic D. Endothelial NOS G894 T and MMP-3 5A/6A gene polymorphisms and hypertension in Serbian population. *J Clin Lab Anal*. 2005;19:241-246.
- Wolff B, Grabe HJ, Schluter C, Popowski K, Volzke H, Ludemann J, John U, Felix SB, Cascorbi I. Endothelial nitric oxide synthase Glu298Asp gene polymorphism, blood pressure and hypertension in a general population sample. *J Hypertens*. 2005;23:1361-1366.
- Heltianu C, Costache G, Gafencu A, Diaconu M, Bodeanu M, Cristea C, Azibi K, Poenaru L, Simionescu M. Relationship of eNOS gene variants to diseases that have in common an endothelial cell dysfunction. *J Cell Mol Med*. 2005;9:135-142.
- Czarnecka C, Kawecka-Jaszcz K, Stolarz K, Olszanecka A, Dembinska-Kiec A, Kiec-Wilk B. Ambulatory blood pressure, left ventricular mass and vascular phenotypes in relation to the endothelial nitric oxide synthase gene Glu298Asp and intron 4 polymorphisms in a population-based family study. *J Hum Hypertens*. 2005;19:413-420.



Pereira AC, Sposito AC, Mota GF, Cunha RS, Herkenhoff FL, Mill JG, Krieger JE. Endothelial nitric oxide synthase gene variant modulates the relationship between serum cholesterol levels and blood pressure in the general population: new evidence for a direct effect of lipids in arterial blood pressure. *Atherosclerosis*. 2006;184:193-200.

Jachymova M, Horky K, Bultas J, Kozich V, Jindra A, Peleska J, Martasek P. Association of the Glu298Asp polymorphism in the endothelial nitric oxide synthase gene with essential hypertension resistant to conventional therapy. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001;284:426-430.

Ukkola O, Erkkila PH, Savolainen MJ, Kesaniemi YA. Lack of association between polymorphisms of catalase, copper-zinc superoxide dismutase (SOD), extracellular SOD and endothelial nitric oxide synthase genes and macroangiopathy in patients with type 2 diabetes mellitus. *J Intern Med*. 2001;249:451-459.

Nagib El-Kilany GE, Nayel E, Hazzaa S. Nitric oxide synthase gene G298 allele Is it a marker for microvascular angina in hypertensive patients? *Cardiovasc Radiat Med*. 2004;5:113-118.

Uwabo J, Soma M, Nakayama T, Kanmatsuse K. Association of a Variable Number of Tandem Repeats in the Endothelial Constitutive Nitric Oxide Synthase Gene With Essential Hypertension in Japanese. *Am J Hypertens*. 1998;11:125-128.

Rodriguez-Esparragon F, Rodriguez-Perez J, Macias-Reyes A, Alamo-Santana F. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma2-Pro12Ala and endothelial nitric oxide synthase-4a/b gene polymorphisms are associated with essential hypertension. *J Hypertens*. 2003;21:1649-1655.

Gouni-Berthold I, Giannakidou E, Muller-Wieland D, Faust M, Kotzka J, Berthold H, Krone W. Peroxisome proliferator-activated receptor-g2 Pro12Ala and endothelial nitric oxide synthase-4a/b gene polymorphisms are not associated with hypertension in diabetes mellitus type 2. *J Hypertens*. 2005;23:301-308.

Yokoyama K, Tsukada T, Nakayama M, Hara S, Yamada A, Kawaguchi Y, Hosoya T. An Intron 4 Gene Polymorphism in Endothelial Cell Nitric Oxide Synthase Might Modulate Volume-Dependent Hypertension in Patients on Hemodialysis. *Nephron*. 2000;85:232-237.

Taniwaki H, Ishimura E, Matsumoto N, Emoto M, Inaba M, Nishizawa Y. Relations between ACE gene and eNOS gene polymorphisms and resistive index in type 2 diabetic patients with nephropathy. *Diabetes Care*. 2001;24:1653-1660.

Grandone E, Colaizzo D, Martinelli P, Pavone G, Errico M, Vecchione G, Margaglione M. Does endothelial nitric oxide synthase gene variation play a role in the occurrence of hypertension in pregnancy? *Hypertens Pregnancy*. 2003;22:149-155.

Kimura T, Yokoyama T, Matsumura Y, Yoshiike N, Date C, Muramatsu M, Tanaka H. NOS3 genotype-dependent correlation between blood pressure and physical activity. *Hypertension*. 2003;41:355-360.

Demirel S, Akkaya V, Cine N, Oflaz H, Yekeler E, Ozturk S, Cleophas TJ, Fici F. Genetic polymorphisms and endothelial dysfunction in patients with essential hypertension: A cross-sectional case-control study. *Netherlands Heart J*. 2005;13:126-131.

Xu XJ, Wang SZ, Lin RY, Wang XF, Liang XH, Wen H, Zhang ZX. Association of episode of essential hypertension and polymorphism of endothelial nitric oxide synthase gene 27 bp VNTR in Xinjiang Kazakh population. *Chin J Clin Rehabil*. 2005;9:6-8.

Kajiyama N, Saito Y, Miyamoto Y, Yoshimura M, Nakayama M, Harada M, Kuwahara K, Kishimoto I, Yasue H, Nakao K. Lack of association between T-786-->C mutation in the 5'-flanking region of the endothelial nitric oxide synthase gene and essential hypertension. *Hypertens Res*. 2000;23:561-565.

Rossi GP, Taddei S, Virdis A, Cavallini M, Ghiadoni L, Favilla S, Versari D, Sudano I, Pessina AC, Salvetti A. The T-786C and Glu298Asp polymorphisms of the endothelial nitric oxide gene affect the forearm blood flow responses of Caucasian hypertensive patients. *J Am Coll Cardiol*. 2003;41:938-945.

Bonnardeaux A, Nadaud S, Charu A, Jeunemaitre X, Corvol P, Soubrier F. Lack of Evidence for Linkage of the Endothelial Cell Nitric Oxide Synthase Gene to Essential Hypertension. *Circulation*. 1995;91:96-102.

Derebecka N, Hoysz M, Dankowski R, Wierzychowiecki M, Trzeciak W. Polymorphism in intron 23 of the endothelial nitric oxide synthase gene (NOS3) is not associated with hypertension. *Acta Biochim Pol*. 2002;49:263-268.

Wang J, Dudley D, Wang XL. Haplotype-specific effects on endothelial NO synthase promoter efficiency: modifiable by cigarette smoking. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002;22:e1-4.

Camp NJ, Hopkins PN, Hasstedt SJ, Coon H, Malhotra A, Cawthon RM, Hunt SC. Genome-wide multipoint parametric linkage analysis of pulse pressure in large, extended Utah pedigrees. *Hypertension*. 2003;42:322-328.

Atwood LD, Samollow PB, Hixson JE, Stern MP, MacCluer JW. Genome-wide linkage analysis of pulse pressure in Mexican Americans. *Hypertension*. 2001;37:425-428.

DeStefano AL, Larson MG, Mitchell GF, Benjamin EJ, Vasan RS, Li J, Corey D, Levy D. Genome-wide scan for pulse pressure in the National Heart, Lung and Blood Institute's Framingham Heart Study. *Hypertension*. 2004;44:152-155.

Bielinski SJ, Lynch AI, Miller MB, Weder A, Cooper R, Oberman A, Chen YD, Turner ST, Fornage M, Province M, Arnett DK. Genome-wide linkage analysis for loci affecting pulse pressure: the Family Blood Pressure Program. *Hypertension*. 2005;46:1286-1293.

## VII. ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Με το πέρας της διδακτορικής διατριβής, θα επιθυμούσα να εκφράσω τις ειλικρινείς μου ευχαριστίες προς τους Καθηγητές της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής - Αναπλ. Καθηγ. Ηλία. Ζιντζαρά , Καθηγ. Φίλιππο. Τρυποσκιάδη, και Αναπλ. Καθηγητή κ. Ιωάννη Στεφανίδη-, χωρίς τη συνδρομή των οποίων δε θα ήταν δυνατή η εκπόνηση της παρούσας ερευνητικής εργασίας.

Επιπλέον, θα αποτελούσε παράλειψη να μην αναφερθώ σε μια σειρά προσώπων που συνέβαλαν ιδιαίτερα στην πραγματοποίηση του ερευνητικού έργου, μεταξύ των οποίων τον Αναπλ. Καθηγ. Νευρολογίας Χατζηγεωργίου Γεωργίο, τον κ. Μπριάνα Λάμπρο, Διευθ. Αναπλ. Α Παθολ. Κλινική Γενικού Νοσοκομείου Καρδίτσας, τον κ. Παπανίκο Ιωάννη, Διευθ. ΚΥ Καλαμπάκας, την κ. Δοξάνη Χρύσα, Ιατρό, τον κ. Ζδουκόπουλο Νικόλαο, Ιατρό, την κ. Παπαθανασίου Αφροδίτη, λέκτορα Βιομετρίας, το προσωπικό των εργαστηρίων Γενετικής και Νευρογενετικής και τους ιατρούς και νοσηλευτές των εξωτερικών ιατρείων. Τους ευχαριστώ όλους θερμά για τη συμβολή και τη συμπαράστασή τους.

## VIII. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

### References

Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature*. 2007; 447: 661-678.

Ref Type: Journal

1000 Genomes Project. <http://www.1000genomes.org>. Accessed at 7-30-2009 . 2009.

Ref Type: Electronic Citation

Ardlie KG Kruglyak L Seielstad M. Patterns of linkage disequilibrium in the human genome. *Nat.Rev.Genet*. 2002; 3: 299-309.

Ref Type: Journal

Aten E White S J Kalf M E Vossen R H Thygesen H H Ruivenkamp C A Kriek M Breuning M H den Dunnen J T. Methods to detect CNVs in the human genome. *Cytogenet.Genome Res* 2008; 123: 313-321.

Ref Type: Journal

Atwood LD Samollow P B Hixson J E Stern M P MacCluer J W. Genome-wide linkage analysis of pulse pressure in Mexican Americans. *Hypertension* 2001; 37: 425-428.

Ref Type: Journal

Aviv A. Hypothesis: pulse pressure and human longevity. *Hypertension* 2001; 37: 1060-1066.

Ref Type: Journal

Awata T Neda T Iizuka H Kurihara S Ohkubo T Takata N Osaki M Watanabe M Nakashima Y Sawa T Inukai K Inoue I Shibuya M Mori K Yoneya S Katayama S. Endothelial nitric oxide synthase gene is associated with diabetic macular edema in type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2004; 27: 2184-2190.

Ref Type: Journal

Bao X Mills P J Rana B K Dimsdale J E Schork N J Smith D W Rao F Milic M O'Connor D T Ziegler M G. Interactive effects of common beta2-adrenoceptor haplotypes and age on susceptibility to hypertension and receptor function. *Hypertension*. 2005; 46: 301-307.

Ref Type: Journal

Beckmann JS Sharp A J Antonarakis S E. CNVs and genetic medicine (excitement and consequences of a rediscovery). *Cytogenet.Genome Res* 2008; 123: 7-16.

Ref Type: Journal

Biaggioni I. Sympathetic control of the circulation in hypertension: lessons from autonomic disorders. *Curr.Opin.Nephrol.Hypertens*. 2003; 12: 175-180.

Ref Type: Journal

Bielinski SJ Lynch A I Miller M B Weder A Cooper R Oberman A Chen Y D Turner S T Fornage M Province M Arnett D K. Genome-wide linkage analysis for loci affecting pulse pressure: the Family Blood Pressure Program. *Hypertension* 2005; 46: 1286-1293.

Ref Type: Journal

Binder A. A review of the genetics of essential hypertension. *Curr.Opin.Cardiol.* 2007; 22: 176-184.

Ref Type: Journal

Bodmer W Bonilla C. Common and rare variants in multifactorial susceptibility to common diseases. *Nat.Genet* 2008; 40: 695-701.

Ref Type: Journal

Camp NJ Hopkins P N Hasstedt S J Coon H Malhotra A Cawthon R M Hunt S C. Genome-wide multipoint parametric linkage analysis of pulse pressure in large, extended utah pedigrees. *Hypertension* 2003; 42: 322-328.

Ref Type: Journal

Cardon LR Abecasis G R. Using haplotype blocks to map human complex trait loci. *Trends Genet.* 2003; 19: 135-140.

Ref Type: Journal

Casas JP Cavalleri G L Bautista L E Smeeth L Humphries S E Hingorani A D. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms and cardiovascular disease: a HuGE review. *Am J Epidemiol* 2006; 164: 921-935.

Ref Type: Journal

Castellano M Rossi F Giacche M Perani C Rivadossi F Muiesan M L Salvetti M Beschi M Rizzoni D gabiti-Rosei E. Beta(2)-adrenergic receptor gene polymorphism, age, and cardiovascular phenotypes. *Hypertension.* 2003; 41: 361-367.

Ref Type: Journal

Chanock SJ Manolio T Boehnke M Boerwinkle E Hunter D J Thomas G Hirschhorn J N Abecasis G Altshuler D Bailey-Wilson J E Brooks L D Cardon L R Daly M Donnelly P Fraumeni J F, Jr. Freimer N B Gerhard D S Gunter C Guttmacher A E Guyer M S Harris E L Hoh J Hoover R Kong C A Merikangas K R Morton C C Palmer L J Phimister E G Rice J P Roberts J Rotimi C Tucker M A Vogan K J Wacholder S Wijsman E M Winn D M Collins F S. Replicating genotype-phenotype associations. *Nature* 2007; 447: 655-660.

Ref Type: Journal

Cheung KH Osier M V Kidd J R Pakstis A J Miller P L Kidd K K. ALFRED: an allele frequency database for diverse populations and DNA polymorphisms. *Nucleic Acids Res* 2000; 28: 361-363.

Ref Type: Journal

Cooke JP Dzau V J. Nitric oxide synthase: role in the genesis of vascular disease. *Annu.Rev.Med.* 1997; 48:489-509.: 489-509.

Ref Type: Journal

Cordell HJ. Genome-wide association studies: Detecting gene-gene interactions that underlie human diseases. *Nat.Rev.Genet* 2009.

Ref Type: Journal

Corella D Guillen M Portoles O Sorli J V Alonso V Folch J Saiz C. Gender specific associations of the Trp64Arg mutation in the beta3-adrenergic receptor gene with obesity-related phenotypes in a Mediterranean population: interaction with a common lipoprotein lipase gene variation. *J Intern Med.* 2001; 250: 348-360.

Ref Type: Journal

Cowley AW, Jr. The genetic dissection of essential hypertension. *Nat.Rev.Genet* 2006; 7: 829-840.

Ref Type: Journal

DeQuattro V Feng M. The sympathetic nervous system: the muse of primary hypertension. *J Hum Hypertens.* 2002; 16 Suppl 1: S64-S69.

Ref Type: Journal

DeStefano AL Larson M G Mitchell G F Benjamin E J Vasan R S Li J Corey D Levy D. Genome-wide scan for pulse pressure in the National Heart, Lung and Blood Institute's Framingham Heart Study. *Hypertension* 2004; 44: 152-155.

Ref Type: Journal

Estivill X Cox N J Chanock S J Kwok P Y Scherer S W Brookes A J. SNPs meet CNVs in genome-wide association studies: HGV2007 meeting report. *PLoS Genet* 2008; 4: e1000068.

Ref Type: Journal

Ezzidi I Mtiraoui N Mohamed M B Mahjoub T Kacem M Almawi W Y. Endothelial nitric oxide synthase Glu298Asp, 4b/a, and T-786C polymorphisms in type 2 diabetic retinopathy. *Clin Endocrinol.(Oxf).* 2008; 68: 542-546.

Ref Type: Journal

Franks PW. Identifying genes for primary hypertension: methodological limitations and gene-environment interactions. *J Hum Hypertens.* 2009; 23: 227-237.

Ref Type: Journal

Gavras I Gavras H. Role of alpha2-adrenergic receptors in hypertension. *Am J Hypertens.* 2001; 14: 171S-177S.

Ref Type: Journal

Gjesing AP Andersen G Albrechtsen A Glumer C Borch-Johnsen K Jorgensen T Hansen T Pedersen O. Studies of associations between the Arg389Gly polymorphism of the beta1-adrenergic receptor gene (ADRB1) and hypertension and obesity in 7677 Danish white subjects. *Diabet.Med.* 2007; 24: 392-397.

Ref Type: Journal

Goldstein DB. Common genetic variation and human traits. *N Engl J Med* 2009; 360: 1696-1698.

Ref Type: Journal

Green P Helms C Weiffenbach B Stephens K Keith T Bowden D Smith D Donis-Keller H. Construction of a linkage map of the human genome, and its application to mapping genetic diseases. *Clin Chem.* 1989; 35: B33-B37.

Ref Type: Journal

Gu D Ge D Snieder H He J Chen S Huang J Li B Chen R Qiang B. Association of alpha1A adrenergic receptor gene variants on chromosome 8p21 with human stage 2 hypertension. *J Hypertens.* 2006; 24: 1049-1056.

Ref Type: Journal

Hall JE. The kidney, hypertension, and obesity. *Hypertension* 2003; 41: 625-633.

Ref Type: Journal

Hamet P Seda O. Current status of genome-wide scanning for hypertension.

*Curr.Opin.Cardiol* 2007; 22: 292-297.

Ref Type: Journal

Hao K Peng S Xing H Yu Y Huang A Hong X Wang Y Chen C Wang B Zhang X Liu J Zhu G Huo Y Chen D Zhao X Ronnenberg A Wu D Niu T Xu X. beta(3) Adrenergic receptor polymorphism and obesity-related phenotypes in hypertensive patients. *Obes.Res.* 2004; 12: 125-130.

Ref Type: Journal

Hardy J Singleton A. Genomewide association studies and human disease. *N Engl J Med* 2009; 360: 1759-1768.

Ref Type: Journal

Hermann M Flammer A Luscher T F. Nitric oxide in hypertension. *J Clin Hypertens.(Greenwich.)*. 2006; 8: 17-29.

Ref Type: Journal

Herrmann SM Nicaud V Tiret L Evans A Kee F Ruidavets J B Arveiler D Luc G Morrison C Hoehe M R Paul M Cambien F. Polymorphisms of the beta2 - adrenoceptor (ADRB2) gene and essential hypertension: the ECTIM and PEGASE studies. *J Hypertens.* 2002; 20: 229-235.

Ref Type: Journal

Hindorff LA Sethupathy P Junkins H A Ramos E M Mehta J P Collins F S Manolio T A. Potential etiologic and functional implications of genome-wide association loci for human diseases and traits. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2009; 106: 9362-9367.

Ref Type: Journal

Hirschhorn JN Daly M J. Genome-wide association studies for common diseases and complex traits. *Nat.Rev.Genet* 2005; 6: 95-108.

Ref Type: Journal

Hopkins PN Hunt S C. Genetics of hypertension. *Genet Med.* 2003; 5: 413-429.

Ref Type: Journal

Huang PL. Neuronal and endothelial nitric oxide synthase gene knockout mice. *Braz.J Med Biol Res.* 1999; 32: 1353-1359.

Ref Type: Journal

Insel PA. Seminars in medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. Adrenergic receptors--evolving concepts and clinical implications. *N Engl J Med* 1996; 334: 580-585.

Ref Type: Journal

Jachymova M Horky K Bultas J Kozich V Jindra A Peleska J Martasek P. Association of the Glu298Asp polymorphism in the endothelial nitric oxide synthase gene with essential hypertension resistant to conventional therapy. *Biochem.Biophys.Res Commun.* 2001; 284: 426-430.

Ref Type: Journal

Johansson I Ingelman-Sundberg M. CNVs of human genes and their implication in pharmacogenetics. *Cytogenet.Genome Res* 2008; 123: 195-204.

Ref Type: Journal

Johnson AD Handsaker R E Pulit S L Nizzari M M O'Donnell C J de Bakker P I. SNAP: a web-based tool for identification and annotation of proxy SNPs using HapMap. *Bioinformatics.* 2008; 24: 2938-2939.

Ref Type: Journal

Johnson AD O'Donnell C J. An open access database of genome-wide association results. *BMC Med Genet* 2009; 10: 6.

Ref Type: Journal

Kato N. Genetic analysis in human hypertension. *Hypertens.Res.* 2002; 25: 319-327.

Ref Type: Journal

Kearney PM Whelton M Reynolds K Muntner P Whelton P K He J. Global burden of hypertension: analysis of worldwide data. *Lancet* 2005; 365: 217-223.

Ref Type: Journal

Kim JU Chang H K Lee S S Kim J W Kim K T Lee S W Chung W T. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms in Behcet's disease and rheumatic diseases with vasculitis. *Ann Rheum.Dis.* 2003; 62: 1083-1087.

Ref Type: Journal

Kim NN Villegas S Summerour S R Villarreal F J. Regulation of cardiac fibroblast extracellular matrix production by bradykinin and nitric oxide. *J Mol.Cell Cardiol.* 1999; 31: 457-466.

Ref Type: Journal

Kitsios GD Stefanidis I Zintzaras E. A rare *NOS3* haplotype is associated with left ventricular hypertrophy in Caucasian patients with hypertension. [Under review] 2009.

Ref Type: Journal

Kitsios GD Zintzaras E. A *NOS3* haplotype is protective against hypertension in a Caucasian population. [Under review] 2009a.

Ref Type: Journal



Kitsios GD Zintzaras E. Genome-wide association studies: hypothesis-"free" or "engaged"? Translational Res 2009b; In Press.

Ref Type: Journal

Kitsios GD Zintzaras E. Synopsis and data synthesis of genetic association studies in hypertension for the adrenergic receptors family genes: the CUMAGAS-HYPERT database. [Under Revision] 2009c.

Ref Type: Journal

Kitsios G Zintzaras E. Genetic variation associated with ischemic heart failure: a HuGE review and meta-analysis. Am J Epidemiol 2007; 166: 619-633.

Ref Type: Journal

Kitsios G Zintzaras E. ACE (I/D) polymorphism and response to treatment in coronary artery disease: a comprehensive database and meta-analysis involving study quality evaluation. BMC Med Genet 2009a; 10: 50.

Ref Type: Journal

Kitsios GD Zintzaras E. Genomic Convergence of Genome-wide Investigations for Complex Traits. Ann Hum Genet 2009b.

Ref Type: Journal

Kooperberg C Leblanc M. Increasing the power of identifying gene x gene interactions in genome-wide association studies. Genet Epidemiol 2008; 32: 255-263.

Ref Type: Journal

Kraft P Hunter D J. Genetic risk prediction--are we there yet? N Engl J Med 2009; 360: 1701-1703.

Ref Type: Journal

Kraft P Raychaudhuri S. Complex diseases, complex genes: keeping pathways on the right track. Epidemiology 2009; 20: 508-511.

Ref Type: Journal

Kruglyak L. What is significant in whole-genome linkage disequilibrium studies? Am J Hum Genet. 1997; 61: 810-812.

Ref Type: Journal

Kumar R Nejatizadeh A Arif E Akhtar S Gupta M Tyagi S Goyal A K Jain S K Qadar Pasha M A. Multi-locus interactions of vascular homeostasis genes in essential hypertension: a gender-based study. Clin Chim.Acta 2009; 405: 87-93.

Ref Type: Journal

Kurnik D Muszkat M Friedman E A Sofowora G G Diedrich A Xie H G Harris P A Choi L Wood A J Stein C M. Effect of the alpha2C-adrenoreceptor deletion322-325 variant on sympathetic activity and cardiovascular measures in healthy subjects. J Hypertens. 2007; 25: 763-771.

Ref Type: Journal

Kurnik D Muszkat M Li C Sofowora G G Solus J Xie H G Harris P A Jiang L McMunn C Ihrie P Dawson E P Williams S M Wood A J Stein C M. Variations in the alpha2A-adrenergic receptor gene and their functional effects. Clin Pharmacol Ther.

2006; 79: 173-185.

Ref Type: Journal

Lacolley P Challande P Osborne-Pellegrin M Regnault V. Genetics and pathophysiology of arterial stiffness. *Cardiovasc.Res* 2009; 81: 637-648.

Ref Type: Journal

Levy D Garrison R J Savage D D Kannel W B Castelli W P. Prognostic implications of echocardiographically determined left ventricular mass in the Framingham Heart Study. *N Engl J Med.* 1990; 322: 1561-1566.

Ref Type: Journal

Li JL Canham R M Vongpatanasin W Leonard D Auchus R J Victor R G. Do allelic variants in alpha2A and alpha2C adrenergic receptors predispose to hypertension in blacks? *Hypertension.* 2006; 47: 1140-1146.

Ref Type: Journal

Liu PY Zhang Y Y Lu Y Long J R Shen H Zhao L J Xu F H Xiao P Xiong D H Liu Y J Recker R R Deng H W. A survey of haplotype variants at several disease candidate genes: the importance of rare variants for complex diseases. *J Med Genet.* 2005; 42: 221-227.

Ref Type: Journal

Lohmueller KE Pearce C L Pike M Lander E S Hirschhorn J N. Meta-analysis of genetic association studies supports a contribution of common variants to susceptibility to common disease. *Nat.Genet* 2003; 33: 177-182.

Ref Type: Journal

Luft FC. Molecular genetics of human hypertension. *Curr.Opin.Nephrol.Hypertens.* 2000; 9: 259-266.

Ref Type: Journal

Manolio TA Brooks L D Collins F S. A HapMap harvest of insights into the genetics of common disease. *J Clin Invest* 2008; 118: 1590-1605.

Ref Type: Journal

Massion PB Balligand J L. Modulation of cardiac contraction, relaxation and rate by the endothelial nitric oxide synthase (eNOS): lessons from genetically modified mice. *J Physiol.* 2003; 546: 63-75.

Ref Type: Journal

McCarthy MI Abecasis G R Cardon L R Goldstein D B Little J Ioannidis J P Hirschhorn J N. Genome-wide association studies for complex traits: consensus, uncertainty and challenges. *Nat.Rev.Genet* 2008; 9: 356-369.

Ref Type: Journal

McCarthy MI Hirschhorn J N. Genome-wide association studies: past, present and future. *Hum Mol.Genet* 2008a; 17: R100-R101.

Ref Type: Journal

McCarthy MI Hirschhorn J N. Genome-wide association studies: potential next steps on a genetic journey. *Hum Mol.Genet* 2008b; 17: R156-R165.

Ref Type: Journal

Misono M Maeda S Iemitsu M Nakata Y Otsuki T Sugawara J Zempo H Yoshizawa M Miyaki A Kuno S Matsuda M Ajisaka R. Combination of polymorphisms in the beta2-adrenergic receptor and nitric oxide synthase 3 genes increases the risk for hypertension. *J Hypertens.* 2009; 27: 1377-1383.

Ref Type: Journal

Mottl AK Shoham D A North K E. Angiotensin II type 1 receptor polymorphisms and susceptibility to hypertension: a HuGE review. *Genet Med* 2008; 10: 560-574.

Ref Type: Journal

Murohara T Asahara T Silver M Bauters C Masuda H Kalka C Kearney M Chen D Symes J F Fishman M C Huang P L Isner J M. Nitric oxide synthase modulates angiogenesis in response to tissue ischemia. *J Clin Invest.* 1998; 101: 2567-2578.

Ref Type: Journal

Musani SK Shriner D Liu N Feng R Coffey C S Yi N Tiwari H K Allison D B. Detection of gene x gene interactions in genome-wide association studies of human population data. *Hum Hered.* 2007; 63: 67-84.

Ref Type: Journal

Muszkat M Kurnik D Solus J Sofowora G G Xie H G Jiang L McMunn C Ihrie P Harris J R Dawson E P Williams S M Wood A J Stein C M. Variation in the alpha2B-adrenergic receptor gene (ADRA2B) and its relationship to vascular response in vivo. *Pharmacogenet.Genomics.* 2005; 15: 407-414.

Ref Type: Journal

Nichols WW Denardo S J Wilkinson I B McEniery C M Cockcroft J O'Rourke M F. Effects of arterial stiffness, pulse wave velocity, and wave reflections on the central aortic pressure waveform. *J Clin Hypertens.(Greenwich.).* 2008; 10: 295-303.

Ref Type: Journal

O'Donovan MC Kirov G Owen M J. Phenotypic variations on the theme of CNVs. *Nat.Genet* 2008; 40: 1392-1393.

Ref Type: Journal

Philip I Plantefevre G Vuillaumier-Barrot S Vicaut E LeMarie C Henrion D Poirier O Levy B I Desmonts J M Durand G Benessiano J. G894T polymorphism in the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with an enhanced vascular responsiveness to phenylephrine. *Circulation.* 1999; 99: 3096-3098.

Ref Type: Journal

Queen LR Ferro A. Beta-adrenergic receptors and nitric oxide generation in the cardiovascular system. *Cell Mol.Life Sci.* 2006; 63: 1070-1083.

Ref Type: Journal

Ramagopalan SV Knight M Ebers G C Knight J C. Origins of magic: review of genetic and epigenetic effects. *BMJ* 2007; 335: 1299-1301.

Ref Type: Journal

Rice T Rankinen T Province M A Chagnon Y C Perusse L Borecki I B Bouchard C Rao D C. Genome-wide linkage analysis of systolic and diastolic blood pressure: the Quebec Family Study. *Circulation*. 2000; 102: 1956-1963.

Ref Type: Journal

Rosmond R Ukkola O Chagnon M Bouchard C Bjorntorp P. Polymorphisms of the beta2-adrenergic receptor gene (ADRB2) in relation to cardiovascular risk factors in men. *J Intern Med*. 2000; 248: 239-244.

Ref Type: Journal

Safar ME. Pulse pressure, arterial stiffness, and cardiovascular risk.

*Curr.Opin.Cardiol*. 2000; 15: 258-263.

Ref Type: Journal

Safar ME. Pulse pressure, arterial stiffness and wave reflections (augmentation index) as cardiovascular risk factors in hypertension. *Ther.Adv.Cardiovasc.Dis*. 2008; 2: 13-24.

Ref Type: Journal

Safar ME Levy B I Struijker-Boudier H. Current perspectives on arterial stiffness and pulse pressure in hypertension and cardiovascular diseases. *Circulation*. 2003; 107: 2864-2869.

Ref Type: Journal

Safar ME Smulyan H. Coronary ischemic disease, arterial stiffness, and pulse pressure. *Am J Hypertens*. 2004; 17: 724-726.

Ref Type: Journal

Saleheen D Merwat S Frossard P. Haplotype association of the adrenergic beta2 receptor gene with essential hypertension. *J Hum Hypertens*. 2006; 20: 167-168.

Ref Type: Journal

Sandrim VC de Syllos R W Lisboa H R Tres G S Tanus-Santos J E. Influence of eNOS haplotypes on the plasma nitric oxide products concentrations in hypertensive and type 2 diabetes mellitus patients. *Nitric.Oxide*. 2007; 16: 348-355.

Ref Type: Journal

Schillaci G Verdecchia P Porcellati C Cuccurullo O Cosco C Perticone F. Continuous relation between left ventricular mass and cardiovascular risk in essential hypertension. *Hypertension*. 2000; 35: 580-586.

Ref Type: Journal

Shi YY He L. SHEsis, a powerful software platform for analyses of linkage disequilibrium, haplotype construction, and genetic association at polymorphism loci. *Cell Res*. 2005; 15: 97-98.

Ref Type: Journal

Shioji K Kokubo Y Mannami T Inamoto N Morisaki H Mino Y Tagoi N Yasui N Iwaii N. Association between hypertension and the alpha-adducin, beta1-adrenoreceptor, and G-protein beta3 subunit genes in the Japanese population; the Suita study. *Hypertens.Res.* 2004; 27: 31-37.

Ref Type: Journal

Slatkin M. Linkage disequilibrium--understanding the evolutionary past and mapping the medical future. *Nat.Rev.Genet.* 2008; 9: 477-485.

Ref Type: Journal

Small KM McGraw D W Liggett S B. Pharmacology and physiology of human adrenergic receptor polymorphisms. *Annu.Rev.Pharmacol Toxicol.* 2003; 43:381-411. Epub; %2002 Jan 10.: 381-411.

Ref Type: Journal

Small KM Wagoner L E Levin A M Kardia S L Liggett S B. Synergistic polymorphisms of beta1- and alpha2C-adrenergic receptors and the risk of congestive heart failure. *N Engl J Med* 2002; 347: 1135-1142.

Ref Type: Journal

SOKOLOW M LYON T P. The ventricular complex in left ventricular hypertrophy as obtained by unipolar precordial and limb leads. *Am Heart J.* 1949; 37: 161-186.

Ref Type: Journal

Tanus-Santos JE Casella-Filho A. Endothelial nitric oxide synthase polymorphisms and susceptibility to hypertension: genotype versus haplotype analysis. *Hypertension* 2007; 49: E1.

Ref Type: Journal

Taylor MR. Pharmacogenetics of the human beta-adrenergic receptors. *Pharmacogenomics J.* 2007; 7: 29-37.

Ref Type: Journal

Thomas GD Shaul P W Yuhanna I S Froehner S C Adams M E. Vasomodulation by skeletal muscle-derived nitric oxide requires alpha-syntrophin-mediated sarcolemmal localization of neuronal Nitric oxide synthase. *Circ.Res.* 2003; 92: 554-560.

Ref Type: Journal

Todd JA Farrall M. Panning for gold: genome-wide scanning for linkage in type 1 diabetes. *Hum Mol.Genet.* 1996; 5 Spec No:1443-8.: 1443-1448.

Ref Type: Journal

Trikalinos TA Salanti G Zintzaras E Ioannidis J P. Meta-analysis methods. *Adv.Genet* 2008; 60: 311-334.

Ref Type: Journal

Vallance P Collier J Moncada S. Effects of endothelium-derived nitric oxide on peripheral arteriolar tone in man. *Lancet.* 1989; 2: 997-1000.

Ref Type: Journal

Van Bortel LM Struijker-Boudier H A Safar M E. Pulse pressure, arterial stiffness, and drug treatment of hypertension. *Hypertension*. 2001; 38: 914-921.

Ref Type: Journal

Wattanapitayakul SK Mihm M J Young A P Bauer J A. Therapeutic implications of human endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism. *Trends Pharmacol Sci*. 2001; 22: 361-368.

Ref Type: Journal

Weissenbach J. Microsatellite polymorphisms and the genetic linkage map of the human genome. *Curr.Opin.Genet Dev*. 1993; 3: 414-417.

Ref Type: Journal

Wilk JB Myers R H Pankow J S Hunt S C Leppert M F Freedman B I Province M A Ellison R C. Adrenergic receptor polymorphisms associated with resting heart rate: the HyperGEN Study. *Ann Hum Genet*. 2006; 70: 566-573.

Ref Type: Journal

Xie HG Stein C M Kim R B Gainer J V Sofowora G Dishy V Brown N J Goree R E Haines J L Wood A J. Human beta2-adrenergic receptor polymorphisms: no association with essential hypertension in black or white Americans. *Clin Pharmacol Ther*. 2000; 67: 670-675.

Ref Type: Journal

Yu W Gwinn M Clyne M Yesupriya A Khoury M J. A navigator for human genome epidemiology. *Nat.Genet* 2008a; 40: 124-125.

Ref Type: Journal

Yu W Wulf A Liu T Khoury M J Gwinn M. Gene Prospector: an evidence gateway for evaluating potential susceptibility genes and interacting risk factors for human diseases. *BMC Bioinformatics*. 2008b; 9: 528.

Ref Type: Journal

Zafarmand MH van der Schouw Y T Grobbee D E de Leeuw P W Bots M L. T64A polymorphism in beta3-adrenergic receptor gene (ADRB3) and coronary heart disease: a case-cohort study and meta-analysis. *J Intern Med*. 2008; 263: 79-89.

Ref Type: Journal

Zak I Sarecka-Hujar B Krauze J. Cigarette smoking, carrier state of A or G allele of 46A>G and 79C>G polymorphisms of beta2-adrenergic receptor gene, and the risk of coronary artery disease. *Kardiol.Pol*. 2008; 66: 380-386.

Ref Type: Journal

Zee RY Cook N R Reynolds R Cheng S Ridker P M. Haplotype analysis of the beta2 adrenergic receptor gene and risk of myocardial infarction in humans. *Genetics*. 2005; 169: 1583-1587.

Ref Type: Journal

Zhang HF Li X L Xie S F Zhu J Wang Z Z Liang L R Cao K J De W Yuan L Huang J. ADRA2B gene insertion/deletion polymorphism and artery compliance. *Chin Med*

J (Engl). 2005; 118: 1797-1802.

Ref Type: Journal

Zhu H Poole J Lu Y Harshfield G A Treiber F A Snieder H Dong Y. Sympathetic nervous system, genes and human essential hypertension. *Curr.Neurovasc.Res.* 2005a; 2: 303-317.

Ref Type: Journal

Zhu X Fejerman L Luke A Adeyemo A Cooper R S. Haplotypes produced from rare variants in the promoter and coding regions of angiotensinogen contribute to variation in angiotensinogen levels. *Hum Mol.Genet.* 2005b; 14: 639-643.

Ref Type: Journal

Zintzaras E Kitsios G. Field synopsis and synthesis of candidate-gene association studies in chronic lymphocytic leukaemia: the CUMAGAS-CLL information system. *Am J Epidemiol* 2009; [In Press].

Ref Type: Journal

Zintzaras E Ioannidis J P. HEGESMA: genome search meta-analysis and heterogeneity testing. *Bioinformatics.* 2005a; 21: 3672-3673.

Ref Type: Journal

Zintzaras E Ioannidis J P. Heterogeneity testing in meta-analysis of genome searches. *Genet Epidemiol* 2005b; 28: 123-137.

Ref Type: Journal

Zintzaras E Ioannidis J P. Meta-analysis for ranked discovery datasets: theoretical framework and empirical demonstration for microarrays. *Comput.Biol Chem.* 2008; 32: 38-46.

Ref Type: Journal

Zintzaras E Kitsios G. Identification of chromosomal regions linked to premature myocardial infarction: a meta-analysis of whole-genome searches. *J Hum Genet* 2006; 51: 1015-1021.

Ref Type: Journal

Zintzaras E Kitsios G Harrison G A Laivuori H Kivinen K Kere J Messinis I Stefanidis I Ioannidis J P. Heterogeneity-based genome search meta-analysis for preeclampsia. *Hum Genet* 2006a; 120: 360-370.

Ref Type: Journal

Zintzaras E Kitsios G Kent D Camp N J Atwood L Hopkins P N Hunt S C. Genome-wide scans meta-analysis for pulse pressure. *Hypertension* 2007; 50: 557-564.

Ref Type: Journal

Zintzaras E Kitsios G Stefanidis I. Endothelial NO synthase gene polymorphisms and hypertension: a meta-analysis. *Hypertension* 2006b; 48: 700-710.

Ref Type: Journal

Zintzaras E Kitsios G Stefanidis I. Response to Endothelial Nitric Oxide Synthase Polymorphisms and Susceptibility to Hypertension: Genotype Versus Haplotype

Analysis. Hypertension 2006c.

Ref Type: Journal

Zintzaras E Kitsios G D. Synopsis and Synthesis of Candidate-Gene Association Studies in Chronic Lymphocytic Leukemia: The CUMAGAS-CLL Information System. Am J Epidemiol 2009.

Ref Type: Journal

Zintzaras E Lau J. Synthesis of genetic association studies for pertinent gene-disease associations requires appropriate methodological and statistical approaches. J Clin Epidemiol 2008a; 61: 634-645.

Ref Type: Journal

Zintzaras E Lau J. Trends in meta-analysis of genetic association studies. J Hum Genet 2008b; 53: 1-9.

Ref Type: Journal

Zintzaras E Raman G Kitsios G Lau J. Angiotensin-converting enzyme insertion/deletion gene polymorphic variant as a marker of coronary artery disease: a meta-analysis. Arch Intern Med 2008; 168: 1077-1089.

Ref Type: Journal

Zintzaras E Zdoukopoulos N. A field synopsis and meta-analysis of genetic association studies in peripheral arterial disease: The CUMAGAS-PAD database. Am J Epidemiol 2009; 170: 1-11.

Ref Type: Journal