

Université de Montréal

**Identification de QTL à pression artérielle dans le
chromosome 18 du rat et analyse des gènes candidats
Adrb2 et *Nedd4l* associés à l'hypertension essentielle**

par

Cristina Chauvet

Programme de biologie moléculaire

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté de Médecine

en vue de l'obtention du grade de M.Sc.

en biologie moléculaire

Juillet 2010

© Cristina Chauvet, 2010

Université de Montréal
Faculté de Médecine

Ce mémoire intitulé :

Identification de QTL à pression artérielle dans le chromosome 18 du rat et analyse des gènes candidats *Adrb2* et *Nedd4l* associés à l'hypertension essentielle

Présenté par :
Cristina Chauvet

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Timothy L. Reudelhuber, président-rapporteur
Alan Y. Deng, directeur de recherche
Suhayla Mukaddam-Daher, membre du jury

Résumé

L'hypertension constitue un facteur majeur de risque de maladies cardiovasculaires et touche à un pourcentage important de la population humaine. Il s'agit d'une maladie complexe étant donné son caractère multifactoriel. La régulation de la pression artérielle (PA) est sous contrôle de plusieurs gènes, appelés loci pour traits quantitatifs ou QTL, et elle est le résultat de leur interaction. Étant donné que la PA est un trait quantitatif sous contrôle de plusieurs composantes comme les facteurs génétiques et environnementaux, l'étude de l'hypertension est limitée chez les populations humaines. Ainsi la stratégie principale pour l'étude de cette maladie est l'identification de QTL à PA chez des souches congéniques de rat construites à partir des lignées hyper- et normotendues; à savoir les souches Dahl salt-sensitive [1] et Lewis, respectivement.

Des études précédentes dans notre laboratoire ont localisé trois QTL à PA au niveau du chromosome 18 chez le rat. Au cours de ce projet, de nouvelles sous-souches ont été construites afin de raffiner la cartographie de ces QTL. Ainsi, les C18QTL1, C18QTL3 et C18QTL4 ont été définis.

Des analyses moléculaires ont été effectuées sur deux gènes candidats pour le C18QTL3; à savoir, *Adrb2* et *Nedd4l* associés précédemment à l'hypertension. La comparaison des résultats de séquençage des régions régulatrices et codantes de ces deux gènes, ainsi que leur analyse d'expression par *q*RT-PCR chez les souches contrastantes DSS et Lewis, n'ont pas montré de différence significative pouvant expliquer la variation du phénotype observé.

Des études plus poussées devront être effectuées sur ces deux gènes et, le cas échéant, l'analyse d'autres gènes contenus dans le C18QTL3 devra être entamée afin d'identifier le gène responsable de ce QTL.

Mots-clés : Hypertension essentielle, QTL, pression artérielle, souche congénique, cartographie génétique, gène candidat, *Adrb2*, *Nedd4l*.

Abstract

Hypertension is a major risk factor in cardiovascular disease and affects a large percentage of human population. It is a complex disease because of its multifactorial nature. Blood pressure (BP) regulation is controlled by several genes, known as quantitative trait loci or QTL, and results from their interaction. Given that BP is a quantitative trait influenced by several components such as genetic and environmental factors, the study of hypertension is limited in humans. As a result, the main strategy in the study of this disease is the identification of BP QTL in congenic rat strains established from hyper- and normotensive breeds, namely, Dahl salt-sensitive [1] and Lewis.

Previous studies showed the existence of three QTL in rat chromosome 18. For this project, new congenic sub-strains were developed in order to refine these QTL containing regions. Thus, C18QTL1, C18QTL3 and C18QTL4 were defined.

Molecular analyses were carried out for two candidate genes contained in C18QTL3; namely *Adrb2* and *Nedd4l* previously associated with hypertension. Comparison of the sequencing results from regulatory and coding regions of the two genes, as well as their expression analyses, showed no significant difference able to account for the variation of the observed phenotype distinguishing DSS from Lewis.

Further investigation of these two genes must be conducted and, if needed, analyses of other genes contained in C18QTL3 should be undertaken in order to uncover the locus responsible for the QTL.

Keywords : Essential hypertension, QTL, blood pressure, congenic strain, genetic mapping, candidate gene, *Adrb2*, *Nedd4l*.

Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	ii
Liste des tableaux.....	v
Liste des figures.....	vi
Liste des sigles et abréviations.....	vii
Dédicace.....	x
Remerciements.....	xi
Introduction.....	1
1. La pression artérielle.....	2
1.1 Définition et mesures de la pression artérielle :	2
1.2 Régulation de la pression artérielle :	2
1.2.1 Régulation neuronale de la pression artérielle :	3
1.2.2 Régulation hormonale de la pression artérielle :	5
1.3 Le rôle des ions dans le maintien de la pression artérielle :	8
1.4 Le caractère quantitatif et polygénique de la pression artérielle :	8
2. L'hypertension.....	9
2.1 Définition de l'hypertension :	9
2.2 Les types d'hypertension :	9
2.2.1 L'hypertension mendélienne :	9
2.2.2 L'hypertension essentielle :	11
2.2.2.1 Les facteurs génétiques :	11
2.2.2.2 Les facteurs environnementaux :	11
3. Les modèles animaux.....	13
3.1 Utilisation de modèles animaux pour l'étude de l'hypertension :	13
3.2 Le rat comme modèle de choix :	13
3.3 Le rat Dahl salt-sensitive :	15
4. Études génétiques et identification de QTL.....	16

4.1 Définition de QTL et leurs interactions :	16
4.2 Approche gène candidat :	17
4.3 Analyses de liaison génétique :	17
4.4 Les lignées congéniques de rats:.....	20
4.5 Analyse de gènes candidats et identification du QTL :	23
5. Identification de QTL sur le chromosome 18 du rat.....	25
5.1 Lignées congéniques :	25
5.2 Les QTL du chromosome 18 chez le rat et gènes candidats :	26
5.2.1 Les récepteurs β -adrénergiques et l'hypertension:	26
5.2.2 La régulation du transport du sodium; <i>Nedd4l</i> et hypertension :	27
6. Hypothèse et objectifs.....	29
Méthodes.....	30
7. Cartographie des QTL et mesures de pression artérielle	31
7.1 Marqueurs microsatellites pour le chromosome 18 :	31
7.2 Mesures de pression artérielle :	31
Résultats.....	33
8. Publication scientifique.....	34
Discussion.....	87
9. Les QTL du chromosome 18 chez le rat.....	88
9.1 Cartographie fine des C18QTL1, C18QTL3 et C18QTL4:	88
10. Analyse des gènes candidats du C18QTL3.....	90
10.1 Le gène <i>Adrb2</i> :	90
10.2 Le gène <i>Nedd4l</i> :	91
10.3 Perspectives :	94
Conclusion	96
Bibliographie.....	98

Liste des tableaux

Tableau I. Lignées de rats établies pour l'étude de l'hypertension	14
Tableau II. Bases de données de marqueurs microsatellites	19

Liste des figures

Figure 1. Régulation neuronale de la pression artérielle	4
Figure 2. Régulation hormonale de la pression artérielle : le système rénine-angiotensine ..	7
Figure 3. Exemple de génotypage par microsatellite	18
Figure 4. Schéma représentant la construction d'une lignée congénique	22
Figure 5. Schéma chronologique de la procédure pour la prise de mesures de pression artérielle par télémétrie	32
Figure 6. Régulation de ENaC par Nedd4l	92

Liste des sigles et abréviations

ACE : enzyme de conversion de l'angiotensine

ACTH : hormone adrénocorticotropique

ADH : hormone antidiurétique

ADN : acide désoxyribonucléique

Adrb2 : gène du récepteur β -adrénergique de type II

AME : syndrome d'excès en minéralocorticoïdes

ANG I : angiotensine I

ANG II : angiotensine II

ARNm : acide ribonucléique messenger

AT : récepteurs de l'angiotensine II

BC : croisement de retour, *back-cross*

BN : souche Brown Norway

β -ARs : récepteurs β -adrénergiques

Ca^{2+} : ion calcium

cAMP : adénosine monophosphate cyclique

cDNA : acide désoxyribonucléique complémentaire

cM : centimorgan

CO_2 : dioxyde de carbone

CYP11B1 : β -hydroxylase

CYP11B2 : aldostérone synthase

DSR, R : souche Dahl salt-resistant

DSS, S : souche Dahl salt-sensitive

ENaC : canaux sodium épithéliaux

F1 : première génération issue d'un croisement quelconque

F2 : deuxième génération issue du croisement de deux individus de la F1

GRA : aldostéronisme curable par les glucocorticoïdes

K⁺ : ion potassium

LEW, L : souche Lewis

Mb : mégabase

MR : récepteurs des minéralocorticoïdes

Na⁺ : ion sodium

NaCl : chlorure de sodium

NCBI : *National Center for Biotechnology Information*

Nedd4l : *neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 4-like gene*

NO : monoxyde d'azote

O₂ : oxygène

PA : pression artérielle

PAD : pression artérielle diastolique

PAS : pression artérielle systolique

PAM : pression artérielle moyenne

Pb : paires de bases

PCR : polymerase chain reaction

PHA II : pseudohypoaldostéronisme de type II

PKA : protéine kinase A

qRT-PCR : quantitative real time PCR

SKG1 : Serine/Thréonine kinase 1

SNA : système nerveux autonome

SNC : système nerveux central

SNP : *single nucleotide polymorphism*

SR : glandes surrénales

SRA : système rénine-angiotensine

WNK : *with no lysine (K) serine/threonine kinase*

A mi Mamá, a mi Papá y a Pato

et une pensée très spéciale pour Kris

Remerciements

J'aimerais tout d'abord remercier mes parents et mon frère pour leur soutien inconditionnel, leur écoute, leurs conseils et pour leurs encouragements qui m'ont permis de me dépasser. Ma, Pa, Pato, c'est grâce à vous que j'y suis arrivée. *Gracias por todo ¡Los quiero muchísimo! Me faltan las palabras para agradecerles y pa' decirles cuánto los quiero...*

Un gros merci tout spécial à Kris pour m'avoir soutenue tout au long de cette étape. Pelon, merci *anpil* d'avoir été à mes côtés. *¡¡Te adoro mil ocho mil, pipito!!*

Merci aux membres du labo : Kimberley, Julie, Lan, Annie, Marilyne, Marie-France pour votre aide et pour toutes les journées agréables au labo.

Merci à mes amis et à toute ma famille : Sof, Kim, Chirris, Tan, Deby, Laura, Fa, Kele, Mira, David, Natalia, Tasnoufe, Elise, Soraya, Francesca, Aleus, Diego, Monis, Marta, Bety, Chimi, Eric, Marine, Rodrigo, Enri, Claude, François, Sofi, Dani, Abuelita, Tío, *y todos los demás...* votre soutien et votre amitié m'ont beaucoup aidée.

A Mme Christ et Mme Durán, pour m'avoir transmis leur goût pour les SVT. *De su gusto por dar clases nació este gusanito...*

Un merci particulier à mon directeur de recherche, Alan Y. Deng. Merci de m'avoir donnée la chance de réaliser ce projet et de m'avoir guidée. Votre attention et vos conseils ont été grandement appréciés.

Merci!

Introduction

1. La pression artérielle

1.1 Définition et mesures de la pression artérielle :

La pression artérielle (PA) est définie comme la force exercée par le sang sur les parois vasculaires. Elle dépend notamment du débit cardiaque et de la résistance vasculaire. Chez l'humain, chaque contraction cardiaque envoie 70mL de sang vers les organes via le réseau artériel. Cette propulsion périodique fait qu'il y a une pression exercée sur les parois vasculaires, appelée systole, qui diminue après le passage du sang, c'est-à-dire, entre deux contractions ventriculaires, c'est la diastole [1,2].

La PA est généralement mesurée au niveau des artères en deux temps : la pression artérielle systolique, ou PAS, qui correspond à la pression exercée par le sang sur les parois au moment de la contraction ventriculaire; et la pression artérielle diastolique, ou, PAD correspondant à la force exercée lors de la relaxation du muscle cardiaque. Il existe une troisième mesure de la PA appelée la pression artérielle moyenne et qui, comme son nom l'indique, correspond à la moyenne de pression subie par l'artère pendant un cycle cardiaque. La PAS optimale est de 120 mmHg et la PAD est de 80 mmHg [3, 4].

1.2 Régulation de la pression artérielle :

La PA est régulée par différentes voies qui contrôlent le volume sanguin, la résistance vasculaire ainsi que le débit et la fréquence cardiaques. Cette régulation peut être à court ou à long terme; ce sont, respectivement, les régulations neuronale et hormonale de la PA.

1.2.1 Régulation neuronale de la pression artérielle :

Le contrôle neuronal de la PA (figure 1) se fait par l'intermédiaire de plusieurs boucles de rétroaction négative. Ainsi, il existe différents types de récepteurs capables de détecter un changement de la PA qui vont, par les voies neuronales afférentes, transmettre le message au système nerveux central où il sera traité. La réponse au changement de PA sera transmise aux effecteurs par les voies neuronales efférentes.

La régulation neuronale de la PA est assurée notamment par deux types de récepteurs : les barorécepteurs situés au niveau des artères qui sont capables de détecter l'étirement des parois vasculaires, et les chimiorécepteurs qui détectent des changements des niveaux de CO₂, de O₂ et du pH dans le sang [3, 5, 6].

Le message de ces récepteurs est capté par le centre cardiovasculaire du système nerveux autonome (SNA) qui, en réponse, fait soit abaisser la fréquence cardiaque par une stimulation parasympathique via le nerf vague, soit l'augmenter par une stimulation sympathique [7].

La transmission du signal par les voies efférentes se fait par la libération de neurotransmetteurs tels que l'adrénaline (ou épinéphrine), la noradrénaline (ou norépinéphrine), qui vont se lier à des récepteurs adrénergiques, et l'acétylcholine qui se lie aux récepteurs cholinergiques présents au niveau des cellules cibles. Il existe deux types de récepteurs adrénergiques : α et β qui sont subdivisés en sous types α_1 , α_2 , β_1 et β_2 . De même, il existe deux types de récepteurs cholinergiques soit les récepteurs muscariniques et les récepteurs nicotiniques [3, 8, 9].

Lors d'une stimulation sympathique, la fréquence cardiaque est augmentée via les nerfs accélérateurs du cœur et il y a activation des récepteurs α -adrénergiques par la noradrénaline et l'adrénaline qui entraîne la vasoconstriction. Plus encore, la stimulation sympathique joue aussi un rôle important sur la réabsorption du sodium au niveau des reins.

Il est à noter que les catécholamines (adrénaline et noradrénaline) sont aussi produites et secrétées par les cellules chromaffines des glandes mésentériques et sont aussi considérées comme des hormones [10].

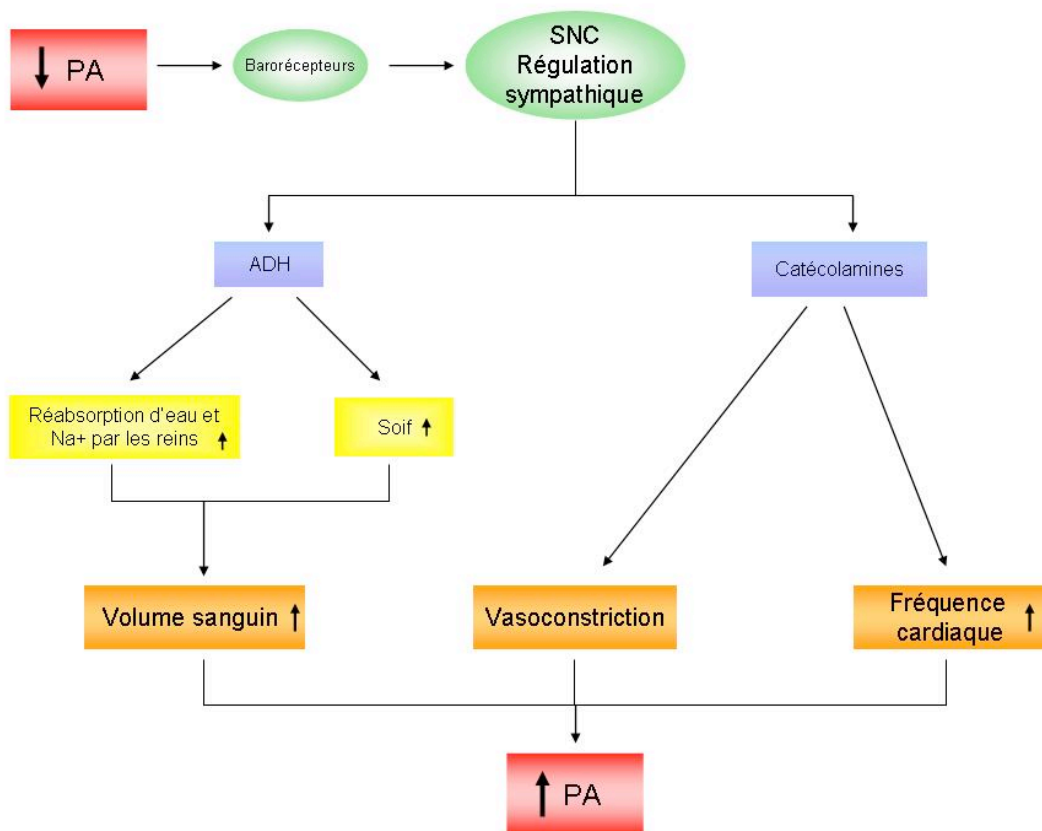


Figure 1. Régulation neuronale de la pression artérielle. Le schéma tient compte uniquement de l'exemple de la réponse neuronale à une baisse de la PA.

La stimulation parasympathique, par l'intermédiaire de l'acétylcholine, entraîne une diminution de la fréquence cardiaque ainsi qu'une vasodilatation [3, 11].

Ainsi, les boucles de rétroaction négative qui régulent la pression sanguine font en sorte qu'une augmentation de la PA cause la vasodilatation et la diminution de la fréquence cardiaque, tandis qu'une diminution de la PA aura comme conséquence une vasoconstriction ainsi que l'augmentation du volume sanguin et de la fréquence du cœur.

1.2.2 Régulation hormonale de la pression artérielle :

La régulation de la PA à long terme est assurée par des voies hormonales qui visent notamment à maintenir un équilibre entre l'activité cardiaque, le système vasculaire et le volume sanguin dans l'organisme.

Il existe plusieurs peptides qui modulent la PA. Parmi ceux-ci on trouve l'hormone antidiurétique (ADH), aussi appelée vasopressine, produite au niveau de l'hypothalamus et sécrétée par l'hypophyse qui, comme son nom l'indique, augmente la rétention de sel et d'eau au niveau des reins. En de grandes quantités, l'ADH peut aussi avoir un effet vasoconstricteur [7].

Une autre molécule qui a un effet vasoconstricteur est l'endothéline produite par les cellules de l'endothélium. Cependant, son implication dans la régulation de la PA n'est pas bien caractérisée.

Il existe aussi de nombreuses molécules à effet vasodilatateur. Les prostagandines et le monoxyde d'azote (NO) sont de bons exemples. Plus encore, les kinines, parmi lesquelles on retrouve la bradykinine, sont des vasodilatateurs puissants. Ces molécules sont les produits du clivage des kininogènes par les kallikreines et sont éliminées par les kininases dont l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE) fait partie. Ainsi l'ACE

qui, comme on le verra plus tard, génère l'angiotensine II (ANG II), un puissant vasoconstricteur, neutralise aussi l'effet vasodilatateur des kinines [3, 12-14].

Le système biologique régulant la PA le mieux caractérisé est sans doute le système rénine-angiotensine (SRA). L'activation du SRA (figure 2) aboutit à l'augmentation de la PA par intermédiaire de la vasoconstriction et d'une hausse dans la rétention de sodium par les reins grâce à l'action de l'ANG II et de l'aldostérone.

Une baisse de la PA ou de la concentration d'ions sodium (Na^+) dans le sang entraînent la sécrétion, par les cellules juxtaglomérulaires du rein, de la rénine. La rénine est l'enzyme responsable du clivage de l'angiotensinogène plasmatique produit par le foie qui donne alors l'angiotensine I (ANG I). L'ANG I est inactive, et c'est l'ACE, sécrétée par les cellules endothéliales de l'organisme, qui la convertit en ANG II [15, 16].

L'action de l'ANG II se fait par l'intermédiaire de sa liaison aux récepteurs AT_1 et AT_2 qui sont tous les deux couplés à des protéines G. Cependant, ce sont en grande majorité les récepteurs de type AT_1 qui sont les médiateurs de l'action de l'ANG II. Ces récepteurs s'expriment au niveau de plusieurs tissus parmi lesquels les reins, le cerveau et les glandes surrénales (SR). Chez les rongeurs, deux sous types de récepteurs AT_1 , soit, AT_{1a} et AT_{1b} ont été identifiés [2, 17].

L'ANG II provoque la vasoconstriction au niveau des artéioles. Au niveau du cerveau, la liaison de l'ANG II provoque la libération de l'ADH, augmente la soif et stimule la voie sympathique. Le rôle de l'ANG II dans les reins se traduit par une réabsorption de Na^+ et d'eau accompagnée de l'excrétion des ions potassium. Plus encore, les glandes surrénales vont sécréter l'aldostérone suite à la liaison de l'ANG II au niveau de ces organes. En synchronie avec l'ANG II, l'aldostérone va agir au niveau des reins pour promouvoir la rétention d'eau et de Na^+ en vue d'augmenter le volume sanguin et, par conséquent, la PA. En effet, l'aldostérone va se lier aux récepteurs minéralocorticoïdes qui, suite à leur translocation dans le noyau cellulaire, vont, entre autres, promouvoir la

transcription de gènes codant pour des protéines régulatrices de l'expression et de l'activité des canaux sodium épithéliaux (ENaC). Ces canaux, comme on le verra plus loin, sont responsables de la réabsorption du Na^+ [16-18].

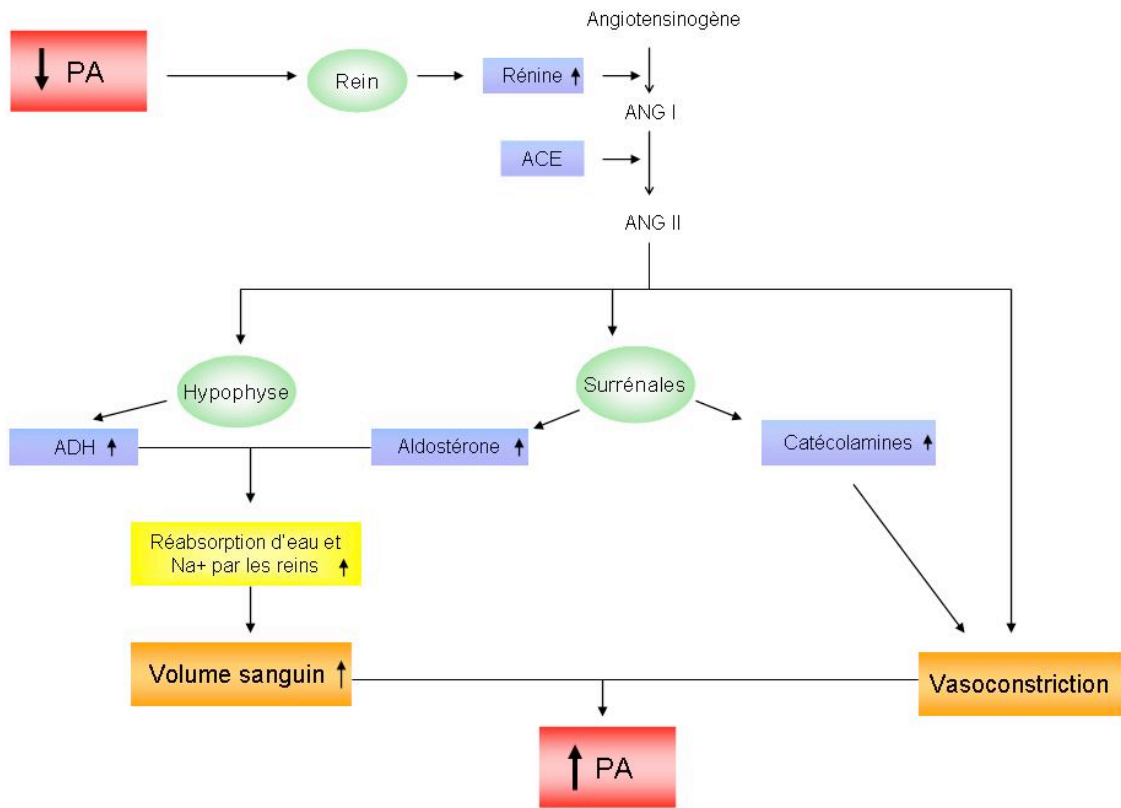


Figure 2. Régulation hormonale de la pression artérielle : le système rénine-angiotensine. Le schéma tient compte uniquement de la réponse à une baisse de la PA.

1.3 Le rôle des ions dans le maintien de la pression artérielle :

Le transport des ions, notamment du sodium, est impliqué dans le maintien du volume sanguin et par conséquent de la PA. Une augmentation du Na^+ intracellulaire est observée dans plusieurs types d'hypertension. L'homéostasie des ions sodium au niveau des reins est assurée notamment par les pompes ATPase Na^+/K^+ , les échangeurs Na^+/H^+ et les canaux sodium épithéliaux (ENaC) dont le contrôle est assuré, entre autres, par l'ANG II, l'aldostérone, l'hormone thyroïdienne, et les catécholamines. Ainsi, la régulation du transport des ions est un facteur clé dans la régulation de la pression artérielle [19].

1.4 Le caractère quantitatif et polygénique de la pression artérielle :

D'après la discussion précédente, on peut voir que la pression artérielle est un trait déterminé par l'effet de l'interaction de plusieurs gènes qui se mesure de façon quantitative. Il s'en suit que la PA est un caractère quantitatif dont le phénotype est dû à l'action de différents loci. Ces loci sont appelés loci pour traits quantitatifs ou QTL [20].

2. L'hypertension

2.1 Définition de l'hypertension :

L'hypertension est une maladie qui touche environ 20% de la population dans les pays industrialisés et est un facteur de risque d'accidents cérébrovasculaires, d'infarctus du myocarde et de maladies rénales. Elle peut se définir comme une élévation chronique de la PA, c'est-à-dire que la PA des patients atteints est supérieure ou égale à 140/90 mmHg. Il s'agit d'une maladie complexe qui est soumise à différents facteurs comme les facteurs génétiques, démographiques et environnementaux [2, 4, 21].

2.2 Les types d'hypertension :

L'hypertension peut être séparée en deux grands groupes : l'hypertension mendélienne ou monogénique et l'hypertension essentielle.

2.2.1 L'hypertension mendélienne :

Cette forme d'hypertension est attribuable à la mutation d'un seul gène et est héritée de façon mendélienne au sein d'une famille atteinte. Il s'agit d'une forme monogénique de l'hypertension [22].

Il existe plusieurs formes monogéniques de l'hypertension qui sont bien caractérisées. On retrouve notamment l'aldostéronisme curable par les glucocorticoïdes (GRA) qui est une maladie autosomique dominante causée par une duplication génique. En effet, elle survient lors de la formation d'un gène chimère issu d'un *cross-over* inégal des gènes codant pour l'aldostérone synthase (CYP11B2) et l'enzyme 11 β -hydroxylase (CYP11B1). Le gène ainsi obtenu contient la région promotrice du gène CYP11B1, sous contrôle de l'hormone adrénocorticotropique (ACTH), et la partie codante du gène

CYP11b2. Il s'en suit une surproduction d'aldostérone qui stimule la réabsorption du sel et de l'eau par les reins entraînant ainsi une augmentation de la PA.

Les patients atteints du syndrome d'excès apparent en minéralocorticoïdes (AME) montrent une élévation de la PA due à l'activation des récepteurs des minéralocorticoïdes (MR) par le cortisol. En temps normal, l'enzyme 11 β -hydroxystéroïde déhydrogénase (11 β HSD) convertit le cortisol en cortisone qui, contrairement à ce dernier, n'active pas les MR. Les patients atteints du syndrome AME, maladie autosomique récessive, montrent des mutations dans le gène encodant l'enzyme 11 β HSD qui l'inactivent.

Le syndrome de Gordon, aussi appelé pseudohypoaldostéronisme de type II (PHA II), est une maladie autosomique dominante caractérisée par l'hypertension, une hyperkaliémie et une acidose métabolique. Elle serait causée par une altération dans le transport des ions sodium et potassium (K^+) au niveau rénal due à des mutations des kinases serine/thréonine WNK1 et WNK4 (*with no lysine (K)*). Ces enzymes seraient responsables de la régulation, entre autres, des ENaC et de cotransporteurs des ions potassium, sodium et chlore.

Le syndrome de Liddle, maladie autosomique dominante, se traduit par une rétention accrue de Na^+ , des niveaux plasmatiques d'aldostérone bas, une alcalose métabolique et par la perte d'activité de la rénine qui aboutissent à l'augmentation du volume sanguin et par conséquent à l'élévation de la PA. Des études de liaison ont montré que cette maladie a été associée à des mutations dans les gènes encodant les sous unités β et γ des ENaC des tubules rénaux [2, 21-28].

2.2.2 L'hypertension essentielle :

Contrairement à l'hypertension monogénique, l'hypertension essentielle, représentant le 95% des cas d'hypertension, est d'origine multifactorielle. Il s'agit donc d'une maladie résultant de l'interaction entre plusieurs gènes et qui dépend aussi des facteurs démographiques et environnementaux. L'effet de l'environnement sur les facteurs génétiques peut ne pas être simplement additif. En effet, chaque gène impliqué dans le phénotype possède plusieurs variations alléliques dont l'expression dépend des facteurs l'environnementaux [21, 22].

2.2.2.1 Les facteurs génétiques :

Des nombreuses études montrent que les facteurs génétiques contribuent entre 30 à 50% à la variation de la PA entre les individus. Plus encore, il existe une plus grande similarité de PA entre les individus apparentés qu'entre familles. En plus d'avoir un patrimoine génétique semblable, les membres d'une famille ont souvent des modes de vie homogènes. En effet, des études sur les jumeaux et sur les enfants adoptés soutiennent la théorie que l'hypertension serait héritable, même s'il ne s'agit pas d'une forme mendélienne d'hérédité [29-31].

2.2.2.2 Les facteurs environnementaux :

Plusieurs facteurs environnementaux semblent avoir une incidence particulière sur l'hypertension essentielle. Parmi ceux-ci on trouve des facteurs démographiques tels que le sexe, l'âge, l'ethnie et le lieu de résidence géographique. En effet, il a été démontré que le taux d'incidence de l'hypertension est plus important chez les individus vivant dans des milieux industrialisés.

Il existe aussi des facteurs reliés à la santé et au mode de vie qui ont un effet sur la PA; à savoir le régime, la sensibilité au sel, le tabagisme, la consommation d'alcool, le niveau d'activité physique, le stress, le diabète et l'obésité. Chez les personnes diabétiques et/ou obèses, la prévalence de l'hypertension est très importante. Ceci peut être dû au fait que ces deux anomalies causent des dommages rénaux et cardiovasculaires qui entraînent une augmentation de la PA. De même, la sensibilité au sel semble avoir une implication dans la pathogénèse de l'hypertension due à des altérations du SRA [22, 32-37].

3. Les modèles animaux

3.1 Utilisation de modèles animaux pour l'étude de l'hypertension :

Étant donné que l'hypertension est une maladie complexe influencée à la fois par les facteurs génétiques et environnementaux, son étude est difficile chez l'humain. En vue de contrecarrer le problème que pose l'hétérogénéité des populations humaines, l'utilisation de modèles animaux est un choix populaire pour l'étude des maladies multifactorielles comme l'hypertension. Les avantages des études génétiques sur les animaux reposent principalement sur leur homogénéité génétique, la facilité contrôler les facteurs environnementaux et l'analyse d'une grande population de progénitures due à la courte période de gestation et à la simplicité d'effectuer plusieurs croisements [22, 38, 39].

3.2 Le rat comme modèle de choix :

Bien que la souris (*Mus musculus*) soit le modèle animal le plus souvent utilisé en laboratoire, le rat (*Rattus norvegicus*) est le modèle de choix pour l'étude de l'hypertension. En effet, sa taille facilite les études physiologiques comme les mesures de PA en comparaison avec la souris. La similitude génomique entre le rat et l'humain et le grand nombre de données sur la pression sanguine qui existent pour cet organisme font du rat le meilleur modèle. De plus, il existe déjà de nombreuses lignées de rats établies pour l'étude de cette maladie soit par leur nature hypertendue, soit par leur caractère normotendu [38, 40]. Quelques exemples de lignées utilisées pour l'étude de l'hypertension sont résumés dans le tableau I.

Tableau I. Lignées de rats établies pour l'étude de l'hypertension

Souche	Abréviation	Référence
Lewis	L, LEW	Stark <i>et al.</i> 1969 [41]
Genetically hypertensive	GH	Smirk <i>et al.</i> 1958 [42]
Dahl salt-sensitive	S, DSS, SS/Jr	Dahl <i>et al.</i> 1962 [43, 44]
Dahl salt-resistant	R, DSR, R/Jr	
Spontaneous hypertensive rats	SHR	Okamoto <i>et al.</i> 1963-64
Spontaneous hypertensive rats- stroke prone	SHRSP	[45, 46]
DOCA salt-sensitive (Sabra hypertensive)	SBH	Ben-Ishay <i>et al.</i> 1972 [47]
DOCA salt-resistant (Sabra normotensive)	SBN	
Lyon hypertensive	LH	Dupont <i>et al.</i> 1973 [48]
Lyon normotensive	LN	
Lyon low blood pressure	LL	
Milan hypertensive	MHS	Bianchi <i>et al.</i> 1974 [49]
Milan normotensive	MNS	
Fawn-hooded hypertensive	FHH	Kuijpers <i>et al.</i> 1984 [50]
Fawn-hooded low blood pressure	FHL	
Prague hypertensive	PHR	Heller <i>et al.</i> 1993 [51]
Prague normotensive	PNR	
Wistar Kyoto	WKY	Kyoto School of Medicine[52]

Tableau adapté de Rapp, J.P. [38]

3.3 Le rat Dahl salt-sensitive :

Les souches Dahl salt-sensitive (DSS, S) et Dahl salt-resistant (DSR, R) ont été développés à partir de rats Sprague-Dawley comme modèles génétiques de l'hypertension induite par un régime à haute teneur en sel. La souche DSS démontre de anomalies au niveau de l'homéostasie des ions Na^+ et Ca^{2+} , ainsi que dans la régulation des ATPases Na^+/K^+ ce qui la prédispose à développer une insuffisance rénale. En effet, les rats DSS souffrent d'hypertension modérée lorsque leur régime est faible en sel, mais plus la consommation en sel est importante plus le phénotype est aggravé. Par contre, la résistance au sodium de la souche DSR en fait le contrôle normotendu de la souche DSS [43, 44, 53, 54]

4. Études génétiques et identification de QTL

4.1 Définition de QTL et leurs interactions :

La stratégie principale dans la recherche de gènes impliqués dans l'hypertension est l'identification de loci de traits quantitatifs (QTL), *i.e.*, la découverte de gènes contrôlant la pression sanguine. Le trait quantitatif de l'hypertension étant la PA, les QTL sont définis comme étant des régions génotypiques qui déterminent la différence du phénotype observé entre deux souches contrastantes, *i.e.* une souche hypertendue et son contrôle normotendu [22, 55, 56].

Une des difficultés dans l'identification des QTL pour l'hypertension est l'interaction de ces derniers dans le génome. Les interactions entre les QTL peuvent être de type allélique ou génique.

Chaque gène peut avoir différentes formes au niveau du même locus appelées allèles. Chaque allèle code pour un phénotype donné et chaque individu possède deux allèles de chaque gène. Ainsi, le phénotype résultant d'une combinaison quelconque de deux allèles est le résultat de l'interaction de ceux-ci. Les phénomènes de dominance, récessivité et codominance des différents allèles rend difficile l'analyse des QTL.

Une interaction épistatique se produit lorsque deux ou plusieurs QTL font partie de la même voie de régulation. Ainsi, chaque QTL a un effet sur une étape donnée de cette voie. L'altération d'une de ces étapes rend donc la voie défectueuse. Ainsi, le défaut d'un ou plusieurs gènes mène au même phénotype. Par conséquent, s'il existe une interaction épistatique entre deux QTL, l'expression d'un gène masque l'expression de l'autre et donc le phénotype est le résultat de cette influence [57, 58].

4.2 Approche gène candidat :

Dans l'étude de l'hypertension, un gène est considéré comme candidat si sa fonction est reliée à la maladie ou s'il est localisé dans une région détectée par un balayage systématique quelconque (liaison génétique, association, etc.). Elle sous entend donc une connaissance préalable de la pathologie du trait étudié. L'approche gène candidat a permis de déceler les causes des plusieurs formes monogéniques de l'hypertension. La forte relation entre le phénotype et le génotype lorsqu'il s'agit d'une forme mendélienne de la maladie, facilite l'identification du gène candidat [59].

4.3 Analyses de liaison génétique :

Les études de liaison génétique sont très courantes dans l'étude des maladies complexes comme l'hypertension. Cette stratégie est basée sur la coségrégation de deux loci à l'intérieur d'une population donnée. En effet, plus les loci sont proches, plus il est probable qu'ils ségrégent ensemble lors de la méiose. En d'autres termes, la probabilité de recombinaison entre deux loci est proportionnelle à la distance chromosomique qui les sépare. Lorsque la fréquence de coségrégation de deux loci est plus importante que le hasard, ils sont considérés comme étant liés.

La probabilité de liaison entre un locus marqueur et le locus responsable du phénotype est mesuré en LOD score. Un LOD score ≥ 3 est significatif. La cartographie génétique des QTL dans un intervalle allant de 20 à 30 cM entre les loci marqueurs est possible grâce au calcul des LOD score de chacun de ces derniers par des logiciels tels que MAPMAKER [56, 60-62, 92].

Les polymorphismes de l'ADN sont utilisés afin de déterminer des locus marqueurs. Les marqueurs microsatellites sont des courtes répétitions en tandem de di-, tri- ou tétranucléotides répandues dans le génome. Le nombre de répétitions peut varier entre

les individus ou entre les souches. Ainsi, la variation de la longueur du microsatellite permet de génotyper les individus par une simple réaction de PCR que l'on fait migrer sur gel d'agarose. [63-65]. La figure 3 donne un exemple de génotypage par microsatellite.

Il existe plusieurs bases de données sur internet qui répertorient des microsatellites du génome du rat qui sont résumées dans le tableau II. Il est cependant possible de chercher des répétitions pour créer de nouveaux marqueurs grâce à la publication de la séquence génomique du rat.

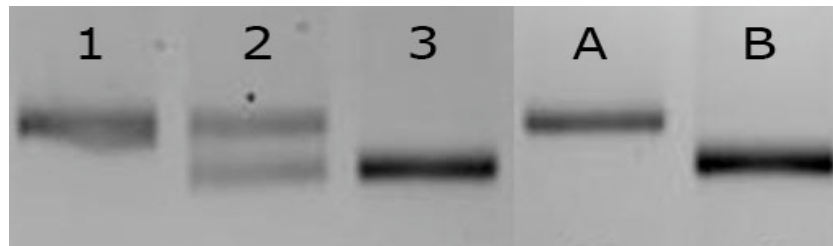


Figure 3. Exemple de génotypage par microsatellite. Le microsatellite est polymorphe entre la souche A et B. Les individus 1 et 3 sont homozygotes pour les allèles provenant des souches A et B respectivement. L'individu 2 est hétérozygote et possède donc une copie identique à chacune des souches A et B. Le microsatellite est amplifié par PCR et le produit de la réaction est migré sur gel d'agarose 4%.

Tableau II. Bases de données de marqueurs microsatellites

Base de données	Site
Otsuka GEN Research Institute	http://ratmap.hgc.jp/Marker_search.html
The Broad Institute of MIT and Harvard	http://www.broadinstitute.org/rat/public/
The Rat Genome Database	http://www.ratmap.org/
National Institute of Arthritis and Musculoskeletal and Skin Diseases	http://www.niams.nih.gov/Research
The Wellcome Trust Centre for Human Genetics	http://www.well.ox.ac.uk/rat_mapping_resources/

Chez l'humain, des études de liaison ont permis de démontrer une association entre certains gènes impliqués dans le SRA et l'hypertension [38, 40, 66].

La localisation de QTL par analyse de liaison génétique est possible chez le rat. Il suffit d'avoir une population significative issue dans un premier temps du croisement entre une souche hypertendue et une souche normotendue. La génération ainsi obtenue est appelée F1. Un croisement ultérieur entre les individus de la F1 donnera la génération F2 qui sera la population significative étudiée lorsqu'elle est constituée d'au moins cent individus [61].

Bien que l'analyse de liaison génétique soit utile pour l'identification de QTL, elle présente certains désavantages. Tout d'abord, pour que l'analyse soit statistiquement valide, il faut avoir une population assez importante. Aussi, les régions délimitées sont de taille

importante et peuvent contenir de nombreux gènes candidats ou même plusieurs QTL. De plus, il s'agit d'une étude de corrélation ne permettant pas d'établir une relation de cause à effet.

Ainsi la présence d'un QTL identifié par une analyse de liaison génétique doit être confirmée par un test génétique plus rigoureux et concluant.

4.4 Les lignées congéniques de rats:

Les analyses liaison génétiques permettent de localiser des QTL à PA mais la région obtenue est trop grande pour justifier le clonage positionnel et l'analyse statistique de ces études présente des problèmes d'interprétation des résultats. Il faut donc effectuer des études physiologiques qui permettent de confirmer la présence de QTL à PA dans la région établie par l'analyse de liaison et de la réduire le plus possible [38-40, 56].

La construction de lignées de rats congéniques permet d'établir une relation de cause à effet entre génotype et phénotype. Une souche congénique est obtenue par le remplacement, chez la souche réceptrice, d'un fragment chromosomique par son homologue provenant d'une souche dite donneuse. Dans ce cas, il s'agit de remplacer chez la souche hypertendue une région du chromosome par son homologue provenant de la souche donneuse normotendue. On obtient ainsi une souche congénique sur fond génétique hypertendu. Lorsque des études physiologiques, notamment des mesures de pression sanguine, sont effectuées sur la souche congénique, dont le fond génétique est hypertendu sauf pour le fragment remplacé par son homologue normotendu, des résultats montrant une diminution significative de la PA par rapport à la souche hypertendue confirment la présence d'un QTL dans la région d'intérêt. Les QTL ainsi définis sont donc susceptibles de contenir des gènes qui contrôlent la PA. La construction de congéniques sur des fonds génétiques normotendus est aussi possible. Dans ce cas, c'est une augmentation de la PA

de la souche congénique par rapport à la souche parentale normotendue qui indique la présence de QTL [39, 53, 67, 68].

La construction d'une souche congénique (figure 4) se résume comme suit : le croisement d'une souche donneuse (normotendue) et d'une souche réceptrice (hypertendue) donne une génération F1 d'individus hétérozygotes dont le matériel génétique provient en proportions égales de chacun des parents. La deuxième étape consiste à effectuer le premier croisement de retour (BC1) ; il s'agit de croiser les individus de la F1 avec la souche parentale réceptrice. Ensuite, les individus BC1 sont recroisés avec la souche réceptrice pour obtenir les individus BC2. Des croisements de retour sont effectués jusqu'à la 8 génération BC, environ, et c'est alors que l'on peut dire que le fond génétique est à 99% homozygote hypertendu. Cependant, l'animal obtenu est hétérozygote pour la région d'intérêt, *i.e.* le segment que l'on cherche à remplacer par son homologue normotendu. Alors, un croisement frère/sœur est effectué pour obtenir 25% de la progéniture qui sera homozygote normotendu pour la région remplacée (portion provenant de la souche donneuse) et homozygote hypertendu pour le reste du génome (provenant de la souche réceptrice) [53, 59, 66].

En raison des croisements de retour, il faut compter de trois à quatre ans pour construire une lignée congénique. C'est pourquoi il est préférable d'utiliser la méthode de congéniques rapides (*speed congenics*). Grâce aux polymorphismes existant entre les souches réceptrice et donneuse, le génotypage de la progéniture permet de cibler, à chaque génération, les individus hétérozygotes pour la région d'intérêt et qui possèdent un maximum d'homozygotie pour le reste du génome provenant de la souche réceptrice. Ainsi, on peut diminuer le nombre de croisements de retour nécessaires et réduire par conséquent le temps de production des lignées congéniques [39, 66, 69, 70].

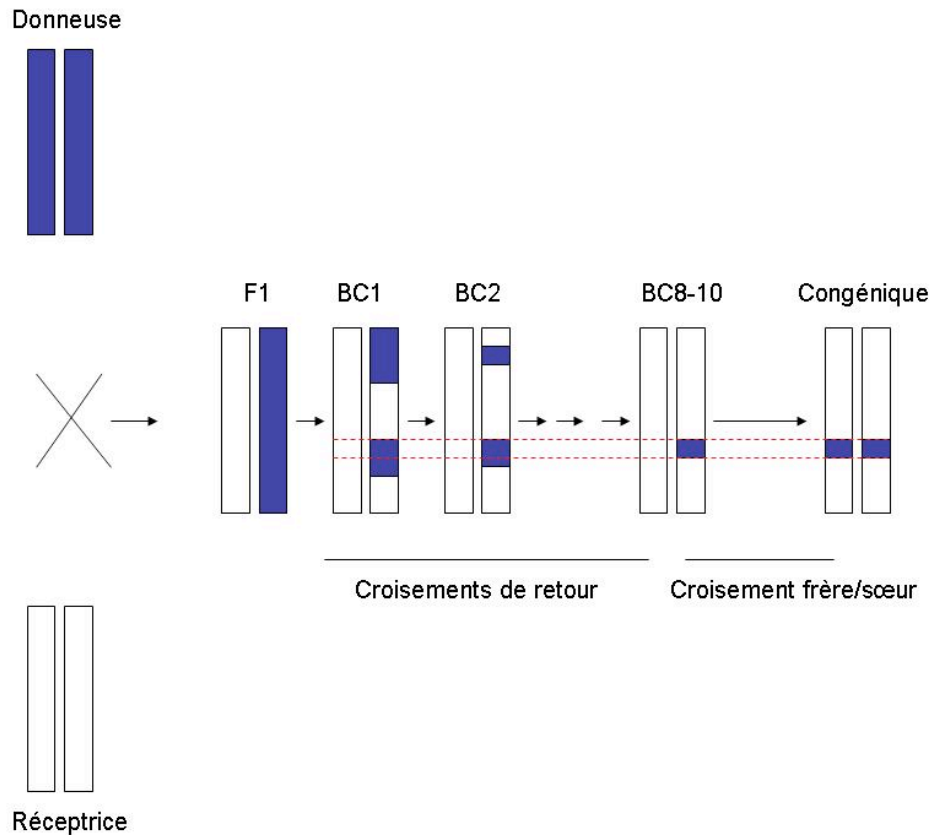


Figure 4. Schéma représentant la construction d'une lignée congénique. A des fins de simplification, la figure ne représente qu'une paire de chromosomes. Le segment délimité par la ligne en pointillés représente la région d'intérêt ciblée lors des croisements de retour. Figure adaptée de Nabika *et al.* [66].

La construction de sous-souches congéniques permet de réduire au maximum la région d'intérêt ce qui facilite ensuite l'identification de gènes responsables du QTL. L'accouplement frère/sœur des individus issus du croisement de la souche congénique avec la souche réceptrice permet, lorsqu'il y a eu recombinaison interchromosomique pendant la méiose, de diminuer le segment d'intérêt. Ce procédé permet d'obtenir une sous-souche congénique homozygote. La fréquence de recombinaison est proportionnelle à la taille de la

région d'intérêt. Ainsi la région ne peut être réduite qu'à 1 cM puisque, par définition, il n'existe que 1% de chances qu'un événement de recombinaison se produise dans une région de cette taille [38, 61, 71].

La région QTL déterminée à partir des souches et sous-souches congéniques permet d'identifier le gène responsable de la variation de la PA. Grâce au génotypage et aux annotations de la base de données du *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), il est possible de dresser des cartes physiques des chromosomes et de déterminer la grandeur de la région contenant le QTL ainsi que les gènes qu'elle contient.

Les cartes d'homologie permettent d'identifier, chez l'humain, la région chromosomique étudiée chez le rat. Leur utilisation est de grande importance puisque le but ultime de la recherche de QTL chez des modèles animaux est d'extrapoler les résultats obtenus vers l'humain.

4.5 Analyse de gènes candidats et identification du QTL :

La recherche de mutations entre les souches hyper- et normotendues dans la région codante des gènes compris dans la région QTL permet d'identifier le gène responsable du QTL. Le séquençage, puis la comparaison des séquences obtenues permettent de détecter des mutations au niveau génomique qui pourraient se traduire par des changements en acides aminés de la protéine encodée. Plus encore, il est possible de séquencer les régions non codantes de gènes puisque des mutations au niveau de ces régions pourraient avoir des effets sur l'expression et/ou l'épissage du gène en question.

Les différences au niveau de la séquence des gènes peuvent ne pas être la seule explication possible de la différence du phénotype observé chez les deux souches contrastantes. Ainsi, il est possible d'analyser le niveau d'expression des gènes par

Northern blot, qRT-PCR ou avec des micropuces d'ADN. L'expression de la protéine encodée peut être analysée par *Western blot*.

Si une différence est trouvée pour un gène soit au niveau de sa séquence soit de son expression génique ou protéique entre les deux souches, il est un bon candidat. Cependant afin de conclure qu'il est responsable du QTL, il faut confirmer que c'est cette différence qui est responsable de la variation du phénotype observé dans les souches contrastantes. Pour ce faire, on peut avoir recours à des animaux transgéniques et/ou *knock-out*, modèles avec lesquels il est possible d'étudier les effets physiologiques causés par une différence d'expression du gène d'intérêt ou par la perte de fonction de ce dernier. Une autre technique permettant d'étudier l'effet d'une perte de fonction est l'utilisation d'ARN interférence.

L'utilisation d'animaux transgéniques permet d'étudier la surexpression d'un gène. Si ce gène est exprimé en plus grande quantité chez la souche hypertendue, l'introduction de copies supplémentaires dans la souche normotendue entrainera l'augmentation de la PA. Plus encore, s'il existe une mutation au niveau de la séquence codante du gène en question responsable d'une perte de fonction chez la souche hypertendue, l'introduction d'une copie fonctionnelle du gène en provenance de la souche normotendue devrait aboutir à une diminution de la PA.

5. Identification de QTL sur le chromosome 18 du rat

5.1 Lignées congéniques :

Lors de la construction de congéniques, le choix de la souche donneuse détermine la nature des allèles introduits dans la souche réceptrice. Le choix des souches peut influencer les résultats lorsqu'il s'agit d'identifier des QTL à PA.

En effet, des analyses de liaison sur des populations F2 issues de croisements entre DSS et différentes souches normotendues ont montré l'existence de QTL sur différents chromosomes. Cependant, certains de ces QTL n'ont été détectés que sur l'un des croisements effectués ce qui démontre l'importance du choix de la souche donneuse [72].

Comme il a déjà été discuté, le rat DSS développe une hypertension importante lorsqu'il est soumis à un régime riche en sel. Lors de la construction des souches congéniques au sein de notre laboratoire, c'est la souche Lewis (LEW, L) qui est utilisée comme contrôle normotendu. Ceci est dû à la grande résistance au sel que démontre cette souche par rapport, par exemple, à la souche DSR, et aussi au taux de polymorphisme supérieur qu'il y a entre les souches DSS et Lewis comparativement à celui qui existe entre DSS et DSR [67].

De plus, au niveau du chromosome 18 du rat, des QTL ont été détectés lors de la construction de congéniques résultantes de l'introduction d'allèles LEW sur un fond génétique DSS. Les QTL n'ont pas été détectés lorsque les congéniques étaient issues de l'introduction d'allèles hypertendues [1] dans un fond normotendu (LEW). Il a été démontré que cette observation résulte de la capacité du génome de la souche Lewis à compenser pour les allèles hypertendues. Ainsi, on voit que le choix du fond génétique est très important [73].

5.2 Les QTL du chromosome 18 chez le rat et gènes candidats :

Des études précédentes ont montré l'existence de trois QTL à PA distincts au niveau du chromosome 18 du rat. Le C18QTL3 a été établi et délimité par la construction de la souche congénique C18S.L2. Cependant, la taille de la région contenant le QTL était de 32 Mb et contenait un nombre très important de gènes. La construction des sous-souches C18S.L10 et C18S.L14 à partir de C18S.L2 a permis de délimiter deux QTL indépendants; soit le nouveau C18QTL3 (4.38 Mb) et C18QTL4 (16.88 Mb).

Bien que la région du C18QTL3 contienne près de 70 gènes, il y en a deux qui attirent l'attention étant donnée leur association avec l'hypertension; il s'agit du gène codant pour le récepteur β -adrénergique de type II (*Adrb2*) et du gène encodant l'ubiquitine ligase 3, *Nedd4l*. Leur association avec la maladie chez l'humain et la fonction physiologique de ces gènes en font de bons candidats [8, 74-81].

5.2.1 Les récepteurs β -adrénergiques et l'hypertension:

Comme discuté précédemment, les récepteurs β -adrénergiques (β -ARs) jouent un rôle essentiel dans la régulation de la PA. Les β -ARs sont des récepteurs couplés à une protéine G et exprimés dans plusieurs tissus parmi lesquels les reins, le cœur et les cellules des muscles lisses vasculaires. Les récepteurs de type β_1 sont liés à l'augmentation de la contractilité du cœur et par conséquent à l'augmentation du débit cardiaque.

L'activation des récepteurs β_2 par les catécholamines induit la relaxation des muscles lisses et ils ont donc un effet vasodilatateur. L'effet vasodilatateur des β_2 -ARs est dû à l'activation de la voie cAMP et aussi à la sécrétion de NO par les cellules endothéliales vasculaires [74, 82].

Le récepteur β_2 est codé par le gène ADRB2 situé sur le chromosome 5 (5q31-q32) chez l'humain (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/154>) et sur le chromosome 18 (18q12.1)

chez le rat (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/24176>). Il s'agit d'un gène qui ne contient aucun intron. Plusieurs études ont montré un nombre important de polymorphismes associés à l'hypertension dans le gène ADRB2 parmi lesquels Arg16Gly et Gln27Glu. Ces deux SNPs sont très répandus dans les études de population. La substitution Arg16Gly cause une désensibilisation accrue du récepteur puisqu'elle modifie la régulation négative induite par l'agoniste et a pour effet de diminuer la réponse de vasodilatation. La substitution Gln27Glu est associée à une résistance à la désensibilisation. Ainsi, ces données ont mené à conclure que le récepteur β_2 -AR a un lien avec l'hypertension essentielle [23, 78, 79, 82-85].

5.2.2 La régulation du transport du sodium; Nedd4l et hypertension :

Le maintien de l'homéostasie du sodium est un facteur majeur dans la régulation de la PA. Comme il a été discuté auparavant, les canaux sodium épithéliaux du (ENaC) du néphron distal y jouent un rôle majeur étant donné que l'entrée des ions Na^+ par l'intermédiaire de ces canaux est l'étape limitante dans la réabsorption du sodium par les reins. La régulation de la réabsorption du sodium est sous contrôle principalement de l'aldostérone et de l'hormone antidiurétique (ADH) qui stimulent l'activité des ENaC [86-89].

Les ENaC sont composés de trois sous-unités homologues α , β et γ chacune comprenant un grand domaine extracellulaire, deux domaines transmembranaires et de courts domaines cytoplasmiques [77]. De nombreuses études indiquent que des mutations au niveau du motif PY d'une des sous-unités des canaux ENaC seraient à la base de formes monogéniques d'hypertension chez l'homme [2, 77, 86, 90].

En effet, le motif PY cytosolique sert de site de liaison pour les ubiquitines ligases E3 de la famille Nedd4 comme Nedd4l. Le motif PY interagit avec les domaines riches en tryptophane (WW) de Nedd4l ce qui facilite l'ubiquitination et donc la dégradation par les

protéosomes des ENaC présents au niveau de la membrane. Plus encore, les mutations au niveau du PY de ENaC, présentes dans le syndrome de Liddle, diminueraient la liaison de Nedd4l au canal empêchant ainsi son ubiquitination et donc son internalisation. Ainsi, cette ubiquitine ligase permet de réguler négativement l'expression des ENaC au niveau de la membrane par intermédiaire de leur ubiquitination [75-77]. En effet, Nedd4l joue un rôle dans l'homéostasie du sodium et donc dans le contrôle de la PA, ce qui en fait un bon candidat dans l'étude de l'hypertension.

Le gène encodant Nedd4l est présent au niveau du chromosome 18 (18q21) chez l'humain (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/23327>) et sur le chromosome 18 (18q12.1) chez le rat (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/291553>).

6. Hypothèse et objectifs

Comme il en a déjà été discuté, il existe, au niveau du chromosome 18 du rat, au moins trois QTL exerçant un effet sur la PA. La différence significative de pression observée entre les souches DSS et la congénique C18S.L14, contenant la région du C18QTL3, devrait être due à l'effet d'au moins un gène contenu au niveau de ce QTL. Ainsi, une différence soit dans la séquence codante et/ou promotrice, soit dans le niveau d'expression d'un gène de la région C18QTL3 devrait être responsable de la variation du phénotype observé.

Étant donné la taille du C18QTL3 et la grande quantité de gènes qu'il contenait, notre premier objectif a été de réduire au maximum cette région.

Par ailleurs, il est à noter que l'association avec l'hypertension des gènes *Adrb2* et *Nedd4l*, contenus dans la région du C18QTL3, en fait de bons candidats. En conséquence, notre deuxième objectif a été de séquencer les régions codantes et promotrices, ainsi que d'étudier le niveau d'expression de ces deux gènes chez les souches DSS et Lewis en vue de chercher des différences qui pourraient être responsables de la variation de PA observée.

Méthodes

7. Cartographie des QTL et mesures de pression artérielle

7.1 Marqueurs microsatellites pour le chromosome 18 :

En vue de réduire les régions QTL précédemment délimitées au niveau du chromosome 18, des sous-souches congéniques ont été construites. La construction de ces nouvelles lignées a permis de délimiter de nouvelles régions QTL plus courtes (*cf.* partie Resultats). Le génotypage des ces souches a été effectué grâce à des marqueurs microsatellites déjà connus. Cependant, il a fallu rechercher de nouveaux marqueurs afin de délimiter plus précisément la nouvelle région QTL établie. Les nouveaux marqueurs microsatellites D18Chm ont été trouvés à partir de la séquence du génome du rat (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview>) et amplifiés par PCR dont les produits ont été migrés sur gel d'agarose 4% pour tester leur polymorphisme.

7.2 Mesures de pression artérielle :

Les protocoles de manipulation des animaux et de prises de mesures de PA approuvés par le comité de notre institution (CIPA) suivent les Lignes Directrices Canadiennes et sont les mêmes que décrit précédemment [73, 91]. Brièvement, une semaine après la naissance, les rats sont identifiés par le numéro correspondant (*tag*) et un bout de la queue est coupé (*clip*) pour l'extraction d'ADN et le génotypage subséquents. A cinq semaines d'âge on commence le régime à haute teneur en sel (2% NaCl) pendant trois semaines, jusqu'à l'implantation des sondes de télémétrie.

En effet, la PA des souches étudiées au sein de notre laboratoire se fait par télémétrie grâce au système Data Sciences Inc. (St-Paul, Minnesota, USA). Il s'agit d'une méthode assez précise qui permet de prendre des mesures de façon continue et directe à distance; ce qui diminue les contraintes physiques pour l'animal qui auraient pour effet de fausser la lecture de la PA.

La sonde de télémétrie est implantée par chirurgie à 8 semaines d'âge chez les rats mâles qui ont été mis en régime riche en sel (2% NaCl). Le cathéter de la sonde est implanté dans l'artère fémorale. Les mesures commencent environ 2 semaines après l'implantation pour permettre une récupération post-opératoire. La sonde transmet les mesures par radiotélémétrie à une plaque située sous la cage de chaque animal. La plaque est reliée à un ordinateur qui collecte pendant dix secondes à toutes les deux minutes les données de PAS, PAD et PAM pour une période de trois semaines. A la fin de cette période, les animaux sont sacrifiés à froid par guillotine et les organes, ainsi que la sonde implantée sont récupérés. La figure 5 résume la procédure.

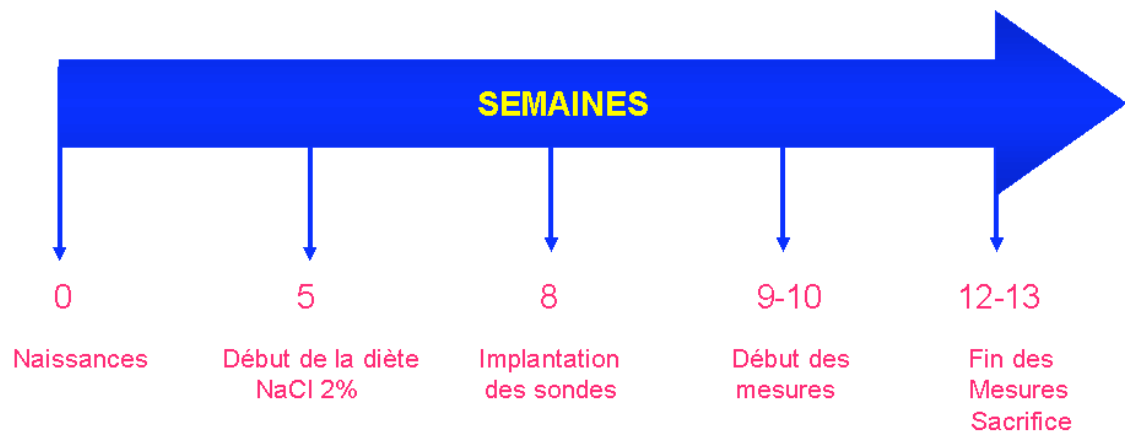


Figure 5. Schéma chronologique de la procédure pour la prise de mesures de pression artérielle par télémétrie.

Résultats

8. Publication scientifique

Convergence of animal model studies and analysis of hypothesis-based candidate genes *Adrb2* and *Nedd4l* associated with essential hypertension

Cristina Chauvet¹, Annie Ménard¹, Chunjie Xiao², Marilyne Blain¹, Julie Roy¹, Alan Y. Deng¹

¹Research Centre, CRCHUM (Centre hospitalier de l'Université de Montréal), Department of Medicine, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

²Biology Department, Yunnan University, Kunming, Yunnan, China

Short title: Genetics of polygenic hypertension

Corresponding author: Alan Y. Deng

Research Centre, Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM)

Abstract

The interval harboring a quantitative trait locus (QTL) for BP lodges α -2 adrenergic receptor (*Adrb2*) and neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 4-like (*Nedd4l*) genes. *ADRB2* and *NEDD4L* demonstrated associations with essential hypertension. To examine their potential roles in BP control, fine congenic resolution was to combine with gene analyses. Chromosome (Chr) 18 segments were dissected with congenic sub-lines. *Adrb2* and *Nedd4l* from Dahl salt-sensitive rats [1] and Lewis were compared. *Adrb2* and *Nedd4l* remained in a C18QTL3-containing interval, but can not account for the BP-lowering effect of Lewis alleles, because their DSS alleles bear the functionally identical domains as those of Lewis, and both genes are not differentially expressed in the kidney. The newly-established and actual *Nedd4l* coding region from DSS and Lewis carry 20 amino acids more than predicted from computations of Brown Norway (BN) rats. A single C-T mutation in *Nedd4l* transforms Serine (Ser) of DSS/Lewis to Phenylalanine (Phe) of BN. Except for *Adrb2* or *Nedd4l*, none of the genes in the C18QTL3-residing interspaces is known to affect BP or to be associated with essential hypertension. The identification of C18QTL3 isoforms distinguishing DSS from Lewis will probably uncover a brand-new gene that may prosper into a novel diagnostic and/or therapeutic target for essential hypertension. The mutational consequence of the Ser/Phe change in *Nedd4l* justifies further investigation. Rat hypertensive models other than DSS need to be utilized for testing the significance of *ADRB2* mutations associated with essential hypertension in BP regulation.

Key words: genetics of hypertension, fine congenic resolution, candidate genes, *Adr2b*, *Nedd4l*,

Introduction

Despite its prevalence and elevated risk for lethal cardiovascular and renal consequences (22), essential hypertension seems intractable and defies the ingenuity and power of genetic approaches widely employed to identify causal genes for other complex diseases (1; 27) . Consequently, its etiology of pathogenesis eludes clarification (7; 9). To date, not a single ‘common’ gene or quantitative trait locus (QTL) has been detected for essential hypertension (13; 24; 35), although ethnically-specific genes for systolic and/or diastolic BP have been found (6; 25; 29; 37).

Setting aside clinical misclassifications and technical issues such as inadequate tagging of gene targets, genetic explanations for this failure could be due to any or a combination of following factors. First, few ‘common’ hypertension variants may exist. Second, a large BP effect from a variant might have been obscured and diluted by heterogeneity of the study population. Third, a choice of normotensive controls for a given hypertensive population may not be discerning enough to provide contrasting alleles, thus exhibiting population-specificity.

Studies from animal models corroborate the last 2 elements as prominent factors. For example, in a heterogeneous F₂ population originated from crosses of Dahl salt-sensitive [1] and Lewis strains, a region on Chromosome (Chr) 18 displayed a suggestive linkage (i.e. a

LOD score of 2.4) to a QTL with a minor BP effect in a total genome scan (15). When a normotensive control, i.e. the Wistar Kyoto (WKY) strain, substituted Lewis, no QTL was even detected in the same region (21). Thus Lewis bestows discriminating alleles for the Chr 18 QTL, whereas WKY does not. A recent review compiles more extensive examples of population-specificity (8).

In revealing the true magnitude effect for a QTL, when the suspected Chr 18 region was isolated in a homogeneous state by congenic strains, 3 epistatically-interacting QTLs were defined, each demonstrating a major BP effect (5). Thus, a genetic transformation from heterogeneity to homogeneity was sufficient to augment the BP effect of a QTL from minor to major. Similar interpretations of genetic heterogeneity to homogeneity can be applied to solidifying the same QTL from being suggestive below a significant statistical threshold (15) to being affirmative (5).

Regardless of its magnitude of effect, the level of statistical significance and population specificity, the critical issue to address in establishing a gene in essential hypertension is whether or not a QTL can demonstrate biological significance in altering BP *in vivo*. It is based on this paradigm that the current investigation was performed.

Previously, we found an association of the α -2 adrenergic receptor gene (*ADRB2*) with essential hypertension in a population-specific manner (39), although this evidence by itself is inadequate to support its biological significance (18). Coincidentally, *Adrb2* is located in the broad region lodging C18QTL3, for which a replacement of hypertensive DSS alleles by those of normotensive Lewis rats lowered BP (40). Thus, the candidacy of

Adrb2 as a C18QTL3 *in vivo* can be directly and further tested in fine congenic resolution of our models.

Interestingly, both *Adrb2* and the neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 4-like gene (*Nedd4l*) reside in the C18QTL3 interval (5) and separated from each other by roughly 3.29 megabases (Mb). *Nedd4l* encodes a protein believed to play a part in Na⁺ and BP homeostasis by regulating the epithelial Na⁺ channel (ENaC) activity (34). Moreover, several association studies indicated that *NEDD4L* may constitute a susceptibility gene for essential hypertension (14; 30; 32). Thus, both *Adrb2* and/or *Nedd4l* appear to be logical gene candidates for C18QTL3, even though their human homologues, *ADRB2* and *NEDD4L*, are located on CHRs 5 and 18 (32; 39) separately.

The current investigation had 3 objectives. The first goal was a comprehensive fine congenic resolution of BP QTLs on Chr 18, focusing on *Adrb2* and *Nedd4l*. The second goal was to screen the DSS and Lewis *Adrb2* genes for mutations. Third, if *Adrb2* could not be supported as a candidate gene, *Nedd4l* was to be analyzed in detail. Finally, a differential expression for the 2 genes was to be assessed in comparison of DSS with Lewis.

Methods

Animals Protocols for handling as well as maintaining animals were approved by our institutional animal committee (CIPA) following the Canadian Guidelines.

Construction of new congenic sub-strains Genetically, congenic strains bear different Chr 18 segments of DSS that are replaced by the homologues of Lewis rats. The

earlier congenic strains (5) are the basis for deriving new congenic sub-strains used in the current work. The breeding and screening procedure in this process were similar to those reported previously. Briefly, DSS and LEW rats strains were bred to produce heterozygous (SL) F₁ generation. Rats from F₁ were then backcrossed to DSS rats to produce the first backcross generation (BC1). BC1 rats were genotyped for 115 markers spaced throughout the rat genome with an average spacing of about 15 cM. BC1 rats were selected and designated as breeders when they were heterozygous SL for a chromosome 18 region but possessed the maximum SS homozygosity for the rest of the untargeted genome. The same procedure was applied up until BC5 generation. To establish chromosome 18 congenic strains, a BC5 rat was bred to a DSS rat. Finally, a sister–brother breeding was carried out to generate rats homozygous LL for the region of interest, but homozygous SS the rest of the genome (5). Emphasis was paid to produce subsequent congenic sub-strains with no chromosome overlaps. Among them a congenic sub-strain was highly valued that specifically captured *Adrb2* and/or *Nedd4l* while retaining as fewer other genes surround them as possible.

For the present work, 5 informative new congenic sub-strains were produced (Figure 1), designated: DSS.Lewis-(D18Chm162-D18Chm172)/Lt (abbreviated as C18S.L10), DSS.Lewis-(D18Chm124-D18Chm126)/Lt (C18S.L13), DSS.Lewis-(D18Chm124-D18Rat61)/Lt (C18S.L14), DSS.Lewis-(D18Chm91-D18Rat27)/Lt (C18S.L15), and DSS.Lewis-(D18Rat29-D18Rat67)/Lt (C18S.L16).

Animal protocols, BP phenotyping and statistical analyses Breeding protocols, dietary treatments, implantation, postoperative care and BP measurement schedules were

essentially the same as documented previously (5). Briefly, male rats were weaned at 21 days of age, maintained on a low salt diet (0.2% NaCl, Harlan Teklad 7034, Indianapolis, IN, USA) and followed by a high salt diet (2% NaCl, Harlan Teklad 94217) starting from 35 days of age until the end of the experiment. Telemetry probes were implanted at 56 days of age (namely 3 weeks from the time of the high salt diet). BP was recorded after 10 days of post-surgery recovery. BP of DSS was pooled from 4 different measurements as they were not different. In the BP presentation, averaged readings for the duration of measurement (3 weeks) were provided for each strain. Since systolic and diastolic pressures were consistent (data not shown) with mean arterial pressures (MAP) of all the strains, only their MAPs are presented.

Repeated measures' analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett's test, which corrects for multiple comparisons and unequal sample sizes, was used to compare a parameter in MAP between 2 groups as reported previously (5). During the BP comparison, ANOVA was first applied to assess the inter-group differences. If it was significant, the Dunnett's test ensued to identify which group was different from DSS, and the level of significance. 2 x 2 ANOVA determines a QTL-QTL interactions (or lack thereof) by evaluating whether the observed effect of a congenic strain combining 2 separate QTLs is significantly different from a predicted sum of effects from each individual QTL (5).

Mutation screening in *Adrb2* and *Nedd4l* genes The entire *Adrb2* coding (16) and regulatory (19) domains were first amplified separately by the polymerase chain reaction (PCR) from genome DNAs of DSS and Lewis strains. Their nucleotides were sequenced.

Since the sequence for the rat *Nedd4l* cDNA was only predicted from the rat genome project (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/109506711?report=genbank>), the exact composition for DSS and Lewis rats had to be determined anew by sequencing. The entire coding region except for the first 18 nucleotides was amplified by PCR from cDNAs with 6 nested and overlapping primer pairs (Supplement 1). cDNAs were synthesized from kidney mRNAs of DSS and Lewis strains respectively according to Manufacturer's instructions (Invitrogen, Burlington, Ontario, Canada). The remaining 18 nucleotides from the ATG start codon plus sequences unable to be accurately determined by direct sequencing are contained within exons 1 and 2. The coding regions, exon-intron junctions for exons 1, 2 and 3 were sequenced for DSS and Lewis (Table 1). When a mutation was detected, the same nucleotide was re-sequenced after an independent PCR amplification.

Analysis of gene expressions of *Adrb2* and *Nedd4l* *Nedd4l* is known to be functional in the kidneys that can potentially impact on BP homeostasis (34). Thus its expressions in the kidneys were compared. For consistency, the same organ was used to analyze *Adrb2*.

Quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reactions (qRT-PCR) were utilized to determine and compare the renal expressions of the 2 genes. The kidneys were harvested at the end of BP measurement (i.e. 11 weeks of age and after 6 weeks on the 2% NaCl diet). Kidneys from 1 rat of DSS and Lewis respectively were homogenized together and used in triplicate for qRT-PCR. In total, kidneys from 3 rats were used and each in triplicate for each strain. Essay conditions for qRT-PCR and standard curve constructions were similar to those published previously with minor modifications (28).

Briefly, entire kidneys were homogenised in TRIzol Reagent (Invitrogen, Burlington, Ontario, Canada). Total RNA was extracted and 2 μ g was used as template for reverse transcription using M-MLV enzyme (Invitrogen) and oligo dT (Invitrogen). qPCR primers for *Nedd4L* are 5' -CTCTGCCACGGACAACACTACA- 3' and 5'-TTA TTT GCT TCC CCA GCA TC- 3'); for *Adrb2* are 5'-CGTGCCCCTGGTGGTCATGG-3 and 5'-CCCGCTCCTCCCATCCTGCT-3; and for the *Gapdh* standard are 5'ATGGGAAGCTGG TCATCAAC-3' and 5'GTGGTTCACACCCATCACAA-3'. qRT-PCR reactions were performed using a Corbett RotorGene 3000 (Corbett Life Sciences, Mississauga, Ontario, Canada) and the Qiagen HotStarTaq Master Mix Kit (Qiagen, Mississauga, Ontario, Canada) with SYBR Green chemistry. To quantitatively compare the gene expression for *Adrb2* and *Nedd4L*, triplicate Ct values from each rat were averaged and normalized to the expression of *Gapdh*, which gives rise to R. Rs from 3 rats of the same strain were then averaged to produce a mean value. The mean R from DSS and Lewis for each gene were compared. Data were analyzed by applework5.

Results

QTL placements and assessment of QTL interactions The region originally-thought to contain C18QTL3 (5) turns out to lodge 2 QTLs, C18QTL3 and C18QTL4, since the 2 congenic sub-strains delimiting them, namely C18S.L14 and C18S.L10, bear no genomic overlaps between them (Figure 1). C18S.L14 and C18S.L10 delineating the QTL-lodging intervals both autonomously and directly exhibit BP effects.

In comparison, C18QTL1 is placed in the non-overlapping segment between C18S.L15 exhibiting a BP effect and C18S.L16 lacking it. This ‘subtractive’ comparative mapping can not rule out the possibility that the congenic strain lacking a BP effect could harbor a QTL, which would require a combination with another putative QTL in the non-overlapping region carried by the strain displaying an effect. Although this imaginary combination has never been demonstrated in experimental hypertension (10), for the sake of argument, the placement of C18QTL1 is conservatively tentative. No chromosome crossovers occurred in the segment harboring C18QTL2 (5), and consequently, C18QTL2 could not be finely resolved.

The C18S.L2 congenic strain carries 2 QTLs, namely C18QTL3 caught by C18S.L14, and C18QTL4 ensnared by C18S.L10 (Figure 1). A 2 x 2 ANOVA (5) exhibits an epistatic interaction ($p < 0.001$) between C18QTL3 and C18QTL4.

Evaluation of candidate genes, *Adrb2* and *Nedd4l* C18S.L14 bears a small chromosome fragment harboring C18QTL3 (Figure 1) and still lodges *Adrb2* and *Nedd4l*. This outcome prompted us to focus on directly analyzing these 2 genes, because of our prior knowledge on their functional roles in BP regulation (4; 34) and on their associations with essential hypertension (14; 18; 30; 32; 39). Thus, relevant insights could be translated into BP homeostasis via their signaling or regulatory mechanisms, once a functional mutation was detected in either 1 of these 2 genes. No other genes present in the region encamping C18QTL3 are even remotely implicated in BP control or hypertension (Supplement 2).

Adrb2 The entire *Adrb2* coding domain along with a segment of its 3' untranslated region (3'UTR) was sequenced after PCR-amplification. Since the *Adrb2* 5'UTR that regulates its expression has been characterized to reside within 1.1 kb (11; 19; 20), 1481 base pairs (Bp) of the genome fragment 5' upstream of its ATG initiation codon have also been PCR-amplified and sequenced. DSS and Lewis carry the identical coding region as well as the known regulatory 5'UTR (GenBank accession number GQ160814 and Supplement 3).

Nedd4l As the rat coding domain of *Nedd4l* was merely predicted by computation (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/109506711?report=genbank>), we resorted to characterizing the authentic and complete *Nedd4l* sequence for DSS and Lewis.

Nedd4l coding regions From kidney cDNAs, except for the first 6 amino acids, the entire coding *Nedd4l* region including 455 bp of 3'UTR, was determined by PCR-amplifications followed by sequencing (Supplement 1). Exon #1 (36) carries the first 8 amino acids and yielded the necessary sequence (Table 1). The *Nedd4l* coding sequence of DSS differs from that of Lewis in 3 positions starting from the initiation codon of ATG, namely at 321 (T-A), at 1995 (C-T) and 2139 (G-A) (Supplement 1). These 3 nucleotide variations do not change amino acids (Supplement 4).

The predicted *Nedd4l* sequence of Brown Norway (BN) rats (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/109506711?report=genbank>) lacked 60 nucleotides between #1047-1107 in the actual sequence (Supplement 1), and can be due, probably, to a computation bias on the basis of the human *NEDD4L* cDNA (Supplement 5), since this stretch of sequence is present in the BN genome sequence

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/62750818?report=genbank&from=61249645&to=61477088>).

Both DSS and Lewis *Nedd4l* coding sequences diverge from that of BN in 3 places (Supplement 1 and Table 1), i.e. at 59 of a C-T change leading to an alteration of serine (Ser) to phenylalanine (Phe); at 774 of a C-T change without altering amino acid; and at 969 of a C-T change with no change in amino acid (Supplement 4).

Nedd4l exon-intron junctions The last nucleotide (Table 1) in Exon #1 of the DSS (or Lewis) *Nedd4l* gene corresponds to that of the human *NEDD4L* (12). This nucleotide belongs to amino acid #8 of the rat and #16 of humans (Supplement 5) and can lead to the formation of a splice variant in humans believed to contribute to essential hypertension in a population-dependent fashion (2; 12; 38). DSS and Lewis, however, bear identical sequences in Exon #1 and at the exon-intron junction (Table 1).

Exons 2 and 3 were reported to be differentially-spliced in DSS (36). To evaluate a potential genetic difference between DSS and Lewis, the exon-intron junctions for Exons #2 and #3 were determined. No nucleotide differences were found within 19 bps in the intronic regions (Table 1).

Nedd4l 5' upstream domain Although the promoter location for *Nedd4l* is not known in humans, mice or rats, based on the information on other promoters such as for *Adrb2* (11; 20), it seemed informative to determine a reasonable genomic tract 5' from the ATG initiation codon. No nucleotide differences between DSS and Lewis were detected in this region (GenBank accession number GQ160817); whereas 3 nucleotide variations were

found at -1206, -1207 and -1166 upstream of the ATG start codon between BN and DSS/Lewis (Supplement 6).

Analysis of *Adrb2* and *Nedd4l* gene expressions qPCRs were carried out to evaluate renal gene expressions for the 2 genes. No differences for either of them were found between DSS and Lewis rats (Supplement 7).

Discussion

Major findings in the current work are : (a) 2 unique QTLs, C18QTL3 and C18QTL4, were resolved that interact with each other epistatically in a chromosome segment. The C18QTL1-containing region was further refined. Each of these QTLs can affect BP independently of each other. (b) Two eminent genes, *Adrb2* and *Nedd4l*, were thoroughly analyzed as candidates for C18QTL3. They are not supported as C18QTL3, for a lack of differences in the function-based genetics or in renal expressions between DSS and Lewis genes. Thus, C18QTL3 is likely represented by a gene previously unknown for BP control. (c) A single mutation was found in *Nedd4l* that alters Ser of DSS/Lewis to Phe of BN. This finding lays a foundation for further *in vitro* and *in vivo* studies contrasting DSS to BN.

Fine congenic resolution of BP QTLs The use of congenic strains with no chromosome overlaps to one another is essential in affirmatively delimiting the fragments lodging QTLs predicted on a cause-effect relationship. From our systematic analyses, several BP QTLs on Chr 18 were defined to the distinct genome segments (Figure 1),

paving the way for their positional cloning. This resolution is in sharp contrast to the linkage result where only 1 QTL with a weak statistical support was detected (15).

C18QTL3 is conclusively delimited. The number of 71 genes dwelling in the chromosome interval, however, could not be further reduced, because no polymorphic markers were found after screening 72 microsatellites in the ambivalent region between D18Rat55 and D18Chm124 markers.

C18QTL1 and C18QTL4 (Figure 1) as well as C18QTL2 (5) are either ambiguously defined or contain too many genes to be thoroughly sequenced. A further reduction in the QTL-residing intervals is necessary. Possibly, more QTLs may emerge from fine congenic resolution of these QTLs. Evidently, if the QTL-residing interval may be restricted by a congenic strain to contain only 1 gene, the gene has to be responsible for the QTL (10).

***Adrb2* as a candidate gene for C18QTL3 and essential hypertension** The human *ADRB2* gene carries naturally-existing SNPs that cause significant changes in amino acids. Among them, Arg16Gly is thought to be important, as it affects receptor desensitization by modifying agonist-enhanced down-regulation *in vitro* (17), and is reasonably common across a wide range of populations (18). It is unknown, but critically important, if any of these amino acid conversions can impact on BP. The current work was designed to target *Adrb2* for functional analysis in BP control.

Evidently, DSS and Lewis strains contrast sharply in BP (Figure 1), but not in the *Adrb2* gene itself (Supplement 3). Consequently, the BP effect exerted by C18QTL3 can not be attributed to *Adrb2*. Baring any difference in inter-institutional progenitors of DSS, a BP variation between DSS and BN notable in a consomic strain (26) can not be due to

Adrb2, because their alleles from DSS and BN are identical also (Supplement 3). No genetic linkage to BP even appeared for *Adrb2* in other DSS-based crosses (21). Thus, DSS does not appear to be a proper animal model for testing *Adrb2* as a genetic determinant for BP.

A BP disparity was found in a Chr 18 congenic strain made from a cross of spontaneously hypertensive (SHR) and diabetic BB rats (23). It seems worthwhile comparing *Adrb2* genes in these strains. Moreover, *Adrb2* can be sequenced in a wide range of rat hypertensive and normotensive strains. If a mutation that resembles a human variation such as Arg16Gly is found in a hypertensive strain, an appropriate congenic strain can be constructed by aiming at *Adrb2*. Alternatively, mutagenesis mimicking the exact transformation found in humans such as Arg16Gly (18) can be created in the mouse and BP can be measured in the resulting animals. A caveat in this line of work is that, since the homology in *ADRB2* between humans and the mouse is only 89.5% (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene/clust.cgi?ORG=Hs&CID=591251>), 1 amino acid modification embedded in many other variations may not reveal a desired functional outcome. Creating 2 separate ‘knock-in’ lines specifically reflecting only the Arg16Gly difference may be appropriate.

***Nedd4l* as a candidate gene for C18QTL3 and essential hypertension** Comparing to *ADRB2*, *NEDD4L* is more than just a candidate gene for hypertension. Its absence can cause hypertension *in vivo* (34), indicating that it not only is associated with essential hypertension (14; 30; 32), but also can change BP. However, a functional ‘knockout’ of *NEDD4L* is not common among human hypertensives (14; 30; 32). Animal models

mirroring the naturally-arising single nucleotide mutations in human populations seem more befitting.

From our present work, no significant differences in *Nedd4l* between DSS and Lewis exist, although a Ser/Phe change is found comparing the published BN sequence with those of both DSS/Lewis (Table 1 and Supplement 4). Whether or not this mutation can incur any functional consequence deserves to be evaluated further. First, Ser, not Phe, residues are the most common targets for phosphorylation by specific kinases that can change protein conformations and functional regulations (3). Investigations *in vitro* may shed lights on the cellular impact of the 2 *Nedd4l* isoforms bearing Ser and Phe such as on Na⁺ transport and on ubiquitination of ENac (31). Second, a genetic contrast between DSS and BN for Chr 18 functionally affects BP (26), despite BN and Lewis are both normotensive and Lewis carries the same Ser amino acid as DSS in *Nedd4l* (Supplement 4). Lewis and BN may have a different genetic basis for BP determination (8). It appears worthwhile to create a congenic strain of the DSS/BN derivation specifically targeting *Nedd4l* and to examine its BP effect.

Even though no nucleotide differences between DSS and Lewis are present in the domain up to 1666 bp 5' upstream of the ATG start codon of *Nedd4l* (Supplement 6), the precise location of the exon-intron junction ahead of the ATG (Table 1) is yet to be determined. The *Nedd4l* promoter domain and 5'UTR need to be established (Supplement 6). Two nucleotide differences between DSS and Lewis are found in intron #3 ahead of exon #3 (Table 1) 19 nucleotides away. They are not likely to have much functional impact

on splicing, because the consensus motif of an exon-intron boundary normally consists of no more than 6 nucleotides (33).

Prospective Genes other than *Adrb2* and *Nedd4l* (Supplement 1) present in the interval harboring C18QTL3 are mostly those of unknown functions or with functions unrelated to BP control. This situation poses serious challenges in BP QTL gene discovery, especially when a non-conserved coding mutation similar to the Ser/Phe change in *Nedd4l* (Supplement 4) is detected in such a gene. First, a gene with no recognizable role in BP homeostasis necessitates mechanistic insights into its role in the biological process(s), biochemical pathway(s) or signaling cascade(s) steering towards it. Second, a predicted gene or a gene of mysterious function entails rudimental characterizations at the organ, cellular or molecular levels, simply to provide certain assayable modes of test.

Conclusion

A systematic fine congenic resolution yielded multiple QTLs and each of them can independently influence BP. Neither of the prominent candidate genes, *Adrb2* and *Nedd4l*, is bolstered to be C18QTL3, despite their distinguished roles in BP modulation and their highly-visible associations with essential hypertension. The discovery of C18QTL3 and other QTLs on Chr 18 appears likely to unmask novel genes and their underlying physiological mechanisms that may engender innovative diagnostic tools and therapeutic targets for essential hypertension. An exploration of additional rat hypertensive models other than DSS, or even mouse models, is desired to validate the functionality in BP regulation of the *ADRB2* mutations found in human association studies. Further genetic

and cellular inquiries into *Nedd4l* seem warranted that can clarify a potential impact of the Ser/Phe difference detected between DSS and BN (Supplement 4).

Acknowledgements

This work was supported by an operating grant from the Canadian Institutes for Health Research (CIHR) to AYD, and by a China-Canada Joint Health Research Initiative from CIHR and Natural Science Foundation of China (NSFC) to AYD and CX.

Reference List

1. **Altshuler D, Daly MJ and Lander ES.** Genetic Mapping in Human Disease. *Science* 322: 881-888, 2008.
2. **Araki N, Umemura M, Miyagi Y, Yabana M, Miki Y, Tamura K, Uchino K, Aoki R, Goshima Y, Umemura S and Ishigami T.** Expression, Transcription, and Possible Antagonistic Interaction of the Human Nedd4L Gene Variant: Implications for Essential Hypertension. *Hypertension* 51: 773-777, 2008.
3. **Barford D, Das AK and Egloff MP.** The structure and mechanism of protein phosphatases: insights into catalysis and regulation. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 27: 133-164, 1998.
4. **Brodde OE and Leineweber K.** Beta2-adrenoceptor gene polymorphisms. *Pharmacogenet Genomics* 15: 267-275, 2005.
5. **Charron S, Lambert R, Eliopoulos V, Duong C, Menard A, Roy J and Deng AY.** A loss of genome buffering capacity of Dahl salt-sensitive model to modulate blood pressure as a cause of hypertension. *Hum Mol Genet* 14: 3877-3884, 2005.

6. **Cho YS, Go MJ, Kim YJ, Heo JY, Oh JH, Ban HJ, Yoon D, Lee MH, Kim DJ, Park M, Cha SH, Kim JW, Han BG, Min H, Ahn Y, Park MS, Han HR, Jang HY, Cho EY, Lee JE, Cho NH, Shin C, Park T, Park JW, Lee JK, Cardon L, Clarke G, McCarthy MI, Lee JY, Lee JK, Oh B and Kim HL.** A large-scale genome-wide association study of Asian populations uncovers genetic factors influencing eight quantitative traits. *Nat Genet* 41: 527-534, 2009.
7. **Cowley AW, Jr.** The genetic dissection of essential hypertension. *Nat Rev Genet* 7: 829-840, 2006.
8. **Deng AY.** Genetics of polygenic hypertension from animal models to humans. *Current Hypertension Reviews* 3: 284-297, 2007.
9. **Deng AY.** Genetic basis of polygenic hypertension. *Hum Mol Genet* 16: R195-R202, 2007.
10. **Deng AY.** Positional Cloning of Quantitative Trait Loci for Blood Pressure: How Close Are We?: A Critical Perspective. *Hypertension* 49: 740-747, 2007.
11. **Drysdale CM, McGraw DW, Stack CB, Stephens JC, Judson RS, Nandabalan K, Arnold K, Ruano G and Liggett SB.** Complex promoter and coding region beta 2-

adrenergic receptor haplotypes alter receptor expression and predict in vivo responsiveness. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 10483-10488, 2000.

12. **Dunn DM, Ishigami T, Pankow J, von Niederhausern A, Alder J, Hunt SC, Leppert MF, Lalouel JM and Weiss RB.** Common variant of human NEDD4L activates a cryptic splice site to form a frameshifted transcript. *J Hum Genet* 47: 665-676, 2002.
13. **Ehret GB, Morrison AC, O'Connor AA, Grove ML, Baird L, Schwander K, Weder A, Cooper RS, Rao DC, Hunt SC, Boerwinkle E and Chakravarti A.** Replication of the Wellcome Trust genome-wide association study of essential hypertension: the Family Blood Pressure Program. *Eur J Hum Genet* 16: 1507-1511, 2008.
14. **Fava C, von Wöern F, Berglund G, Carlson J, Hedblad B, Rosberg L, Burri P, Almgren P and Melander O.** 24-h ambulatory blood pressure is linked to chromosome 18q21-22 and genetic variation of NEDD4L associates with cross-sectional and longitudinal blood pressure in Swedes. *Kidney Int* 70: 562-569, 2006.
15. **Garrett MR, Dene H, Walder R, Zhang Q, Cicila GT, Assadnia S, Deng AY and Rapp JP.** Genomic scan and congenic strains for blood pressure quantitative trait loci using Dahl salt-sensitive rats. *Genome Research* 8: 711-723, 1998.

16. **Gocayne J, Robinson DA, FitzGerald MG, Chung FZ, Kerlavage AR, Lentes KU, Lai J, Wang CD, Fraser CM and Venter JC.** Primary structure of rat cardiac beta-adrenergic and muscarinic cholinergic receptors obtained by automated DNA sequence analysis: further evidence for a multigene family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84: 8296-8300, 1987.
17. **Green SA, Turki J, Innis M and Liggett SB.** Amino-terminal polymorphisms of the human beta 2-adrenergic receptor impart distinct agonist-promoted regulatory properties. *Biochemistry* 33: 9414-9419, 1994.
18. **Hahntow IN, Koopmans RP and Michel MC.** The beta2-adrenoceptor gene and hypertension: is it the promoter or the coding region or neither? *J Hypertens* 24: 1003-1007, 2006.
19. **Jiang L and Kunos G.** Sequence of the 5' regulatory domain of the gene encoding the rat beta 2-adrenergic receptor. *Gene* 163: 331-332, 1995.
20. **Johnatty SE, Abdellatif M, Shimmin L, Clark RB and Boerwinkle E.** Beta 2 adrenergic receptor 5' haplotypes influence promoter activity. *Br J Pharmacol* 137: 1213-1216, 2002.

21. **Kato N, Hyne G, Bihoreau MT, Gauguier D, Lathrop GM and Rapp JP.** Complete genome searches for quantitative trait loci controlling blood pressure and related traits in four segregating populations derived from Dahl hypertensive rats. *Mamm Genome* 10: 259-265, 1999.
22. **Kearney PM, Whelton M, Reynolds K, Muntner P, Whelton PK and He J.** Global burden of hypertension: analysis of worldwide data. *Lancet* 365: 217-223, 2005.
23. **Kloting I, Voigt B and Kovacs P.** Metabolic features of newly established congenic diabetes-prone BB.SHR rat strains. *Life Sci* 62: 973-979, 1998.
24. **Levy D, Larson MG, Benjamin EJ, Newton-Cheh C, Wang TJ, Hwang SJ, Vasan RS and Mitchell GF.** Framingham Heart Study 100K Project: genome-wide associations for blood pressure and arterial stiffness. *BMC Med Genet* 8 Suppl 1: S3, 2007.
25. **Levy D, Ehret GB, Rice K, Verwoert GC, Launer LJ, Dehghan A, Glazer NL, Morrison AC, Johnson AD, Aspelund T, Aulchenko Y, Lumley T, Kottgen A, Vasan RS, Rivadeneira F, Eiriksdottir G, Guo X, Arking DE, Mitchell GF, Mattace-Raso FUS, Smith AV, Taylor K, Scharpf RB, Hwang SJ, Sijbrands EJG, Bis J, Harris TB, Ganesh SK, O'Donnell CJ, Hofman A, Rotter JI, Coresh J, Benjamin EJ, Uitterlinden AG, Heiss G, Fox CS, Witteman JCM, Boerwinkle E,**

- Wang TJ, Gudnason V, Larson MG, Chakravarti A, Psaty BM and van Duijn CM.** Genome-wide association study of blood pressure and hypertension. *Nat Genet* 41: 677-687, 2009.
26. **Mattson DL, Kunert MP, Kaldunski ML, Greene AS, Roman RJ, Jacob HJ and Cowley AW, Jr.** Influence of diet and genetics on hypertension and renal disease in Dahl salt-sensitive rats. *Physiol Genomics* 16: 194-203, 2004.
27. **McCarthy MI, Abecasis GR, Cardon LR, Goldstein DB, Little J, Ioannidis JP and Hirschhorn JN.** Genome-wide association studies for complex traits: consensus, uncertainty and challenges. *Nat Rev Genet* 9: 356-369, 2008.
28. **Moujahidine M, Lambert R, Dutil J, Palijan A, Sivo Z, Ariyaratnam A and Deng AY.** Combining congenic coverage with gene profiling in search of candidates for blood pressure quantitative trait loci in Dahl rats. *Hypertens Res* 27: 203-212, 2004.
29. **Newton-Cheh C, Johnson T, Gateva V, Tobin MD, Bochud M, Coin L, Najjar SS, Zhao JH, Heath SC, Eyheramendy S, Papadakis K, Voight BF, Scott LJ, Zhang F, Farrall M, Tanaka T, Wallace C, Chambers JC, Khaw KT, Nilsson P, van der Harst P, Polidoro S, Grobbee DE, Onland-Moret NC, Bots ML, Wain LV, Elliott KS, Teumer A, Luan J, Lucas G, Kuusisto J, Burton PR, Hadley D, McArdle WL, Brown M, Dominiczak A, Newhouse SJ, Samani NJ, Webster J, Zeggini E,**

Beckmann JS, Bergmann S, Lim N, Song K, Vollenweider P, Waeber G, Waterworth DM, Yuan X, Groop L, Orho-Melander M, Allione A, Di Gregorio A, Guarrera S, Panico S, Ricceri F, Romanazzi V, Sacerdote C, Vineis P, Barroso I, Sandhu MS, Luben RN, Crawford GJ, Jousilahti P, Perola M, Boehnke M, Bonnycastle LL, Collins FS, Jackson AU, Mohlke KL, Stringham HM, Valle TT, Willer CJ, Bergman RN, Morken MA, Doring A, Gieger C, Illig T, Meitinger T, Org E, Pfeufer A, Wichmann HE, Kathiresan S, Marrugat J, O'Donnell CJ, Schwartz SM, Siscovick DS, Subirana I, Freimer NB, Hartikainen AL, McCarthy MI, O'Reilly PF, Peltonen L, Pouta A, de Jong PE, Snieder H, van Gilst WH, Clarke R, Goel A, Hamsten A, Peden JF, Seedorf U, Syvanen AC, Tognoni G, Lakatta EG, Sanna S, Scheet P, Schlessinger D, Scuteri A, Dorr M, Ernst F, Felix SB, Homuth G, Lorbeer R, Reffelmann T, Rettig R, Volker U, Galan P, Gut IG, Herberg S, Lathrop GM, Zelenika D, Deloukas P, Soranzo N, Williams FM, Zhai G, Salomaa V, Laakso M, Elosua R, Forouhi NG, Volzke H, Uiterwaal CS, van der Schouw YT, Numans ME, Matullo G, Navis G, Berglund G, Bingham SA, Kooner JS, Connell JM, Bandinelli S, Ferrucci L, Watkins H, Spector TD, Tuomilehto J, Altshuler D, Strachan DP, Laan M, Meneton P, Wareham NJ, Uda M, Jarvelin MR, Mooser V, Melander O, Loos RJ, Elliott P, Abecasis GR, Caulfield M and Munroe PB. Genome-wide association study identifies eight loci associated with blood pressure. *Nat Genet* 41: 666-676, 2009.

30. **Pankow JS, Dunn DM, Hunt SC, Leppert MF, Miller MB, Rao DC, Heiss G, Oberman A, Lalouel JM and Weiss RB.** Further evidence of a quantitative trait locus on chromosome 18 influencing postural change in systolic blood pressure: the Hypertension Genetic Epidemiology Network (HyperGEN) Study. *Am J Hypertens* 18: 672-678, 2005.
31. **Raikwar NS and Thomas CP.** Nedd4-2 isoforms ubiquitinate individual epithelial sodium channel subunits and reduce surface expression and function of the epithelial sodium channel. *Am J Physiol Renal Physiol* 294: F1157-F1165, 2008.
32. **Russo CJ, Melista E, Cui J, DeStefano AL, Bakris GL, Manolis AJ, Gavras H and Baldwin CT.** Association of NEDD4L ubiquitin ligase with essential hypertension. *Hypertension* 46: 488-491, 2005.
33. **Sharp PA.** RNA splicing and genes. *JAMA* 260: 3035-3041, 1988.
34. **Shi PP, Cao XR, Sweezer EM, Kinney TS, Williams NR, Husted RF, Nair R, Weiss RM, Williamson RA, Sigmund CD, Snyder PM, Staub O, Stokes JB and Yang B.** Salt-sensitive hypertension and cardiac hypertrophy in mice deficient in the ubiquitin ligase Nedd4-2. *Am J Physiol Renal Physiol* 295: F462-F470, 2008.

35. **The Wellcome Trust Case Control Consortium.** Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature* 447: 661-678, 2007.
36. **Umemura M, Ishigami T, Tamura K, Sakai M, Miyagi Y, Nagahama K, Aoki I, Uchino K, Rohrwasser A, Lalouel JM and Umemura S.** Transcriptional diversity and expression of NEDD4L gene in distal nephron. *Biochem Biophys Res Commun* 339: 1129-1137, 2006.
37. **Wang Y, O'Connell JR, McArdle PF, Wade JB, Dorff SE, Shah SJ, Shi X, Pan L, Rampersaud E, Shen H, Kim JD, Subramanya AR, Steinle NI, Parsa A, Ober CC, Welling PA, Chakravarti A, Weder AB, Cooper RS, Mitchell BD, Shuldiner AR and Chang YP.** From the Cover: Whole-genome association study identifies STK39 as a hypertension susceptibility gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 226-231, 2009.
38. **Wen H, Lin R, Jiao Y, Wang F, Wang S, Lu D, Qian J, Jin L and Wang X.** Two Polymorphisms in NEDD4L Gene and Essential Hypertension in Chinese HansΓÇöA Population-Based Case-Control Study. *Clinical and Experimental Hypertension* 30: 87-94, 2008.

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

40. **Wu H, Tang W, Li H, Zhou X, Yang Y, Yu H, Li K, Xiao C and Deng AY.**
Functional significance of single nucleotide polymorphisms within the 5'-flanking region of beta2-adrenergic receptor gene. *J Hypertens* 24: 2474-2476, 2006.

Table 1. Nucleotide alignment of exons #1, 2 and 3 and exon-intron junctions of *Nedd4l* among DSS, Lewis and BN

Exon #1:

```

DSS                AGGGCAGGTTGACCTCAGTATCTTCCTTGTAGA 33
Lewis             AGGGCAGGTTGACCTCAGTATCTTCCTTGTAGA 33
BN                AGGGCAGGTTGACCTCAGTATCTTCCTTGTAGA 33
                  *****

DSS                TTTCAGGTCAGGTGCTCACATTCACCTAAGGGGAGGACCTGATTTCTCCAGAAAAGTCTAG 93
Lewis             TTTCAGGTCAGGTGCTCACATTCACCTAAGGGGAGGACCTGATTTCTCCAGAAAAGTCTAG 93
BN                TTTCAGGTCAGGTGCTCACATTCACCTAAGGGGAGGACCTGATTTCTCCAGAAAAGTCTAG 93
                  *****

DSS                CTTTCTCTTTATTTTCAGTTTATTTTTCATCATTTACCTATATGTGAGTGTTCCTGATTT 153
Lewis             CTTTCTCTTTATTTTCAGTTTATTTTTCATCATTTACCTATATGTGAGTGTTCCTGATTT 153
BN                CTTTCTCTTTATTTTCAGTTTATTTTTCATCATTTACCTATATGTGAGTGTTCCTGATTT 153
                  *****

DSS                TTGCTTAATTTGGGAAATGGGCCACCCAGGTAAGACCATTGCTCGGTGGGAACGCAAAAT 213
Lewis             TTGCTTAATTTGGGAAATGGGCCACCCAGGTAAGACCATTGCTCGGTGGGAACGCAAAAT 213
BN                TTGCTTAATTTGGGAAATGGGCCACCCAGGTAAGACCATTGCTCGGTGGGAACGCAAAAT 213
                  *****

DSS                ACTTGGAACCCGGGTGTGAAGTACTAGCCTCATCCTGTTTGTCTTCTCCAGACCGCATAACAGT 273
Lewis             ACTTGGAACCCGGGTGTGAAGTACTAGCCTCATCCTGTTTGTCTTCTCCAGACCGCATAACAGT 273
BN                ACTTGGAACCCGGGTGTGAAGTACTAGCCTCATCCTGTTTGTCTTCTCCAGACCGCATAACAGT 273
                  *****

DSS (Exon #1)     TTGGTCGAGGTCCTAACAAATTATCTTTGCTGGGCAGGACTCGGGATGCTGAGTCTCCC 333
Lewis             TTGGTCGAGGTCCTAACAAATTATCTTTGCTGGGCAGGACTCGGGATGCTGAGTCTCCC 333
BN                TTGGTCGAGGTCCTAACAAATTATCTTTGCTGGGCAGGACTCGGGATGCTGAGTCTCCC 333
                  *****

DSS (Exon #1)     GAGAGGAGGTTGAGCAGCTTGTCTTCTACCCCGTGGCGTGTGACCGTTAGTGCCTTGCGC 393
Lewis             GAGAGGAGGTTGAGCAGCTTGTCTTCTACCCCGTGGCGTGTGACCGTTAGTGCCTTGCGC 393
BN                GAGAGGAGGTTGAGCAGCTTGTCTTCTACCCCGTGGCGTGTGACCGTTAGTGCCTTGCGC 493
                  *****

DSS                TCGATCATAACTGTTATCCCTTCCCTCTCCCC 424
Lewis             TCGATCATAACTGTTATCCCTTCCCTCTCCCC 424
BN                TCGATCATAACTGTTATCCCTTCCCTCTCCCC 424
                  *.*****

```

Exon #2:

```

DSS (Exon #2)     ACGGGATCGGTTTTAACCTTGTGCTTTTTTCCCTCCCCTTTTCTAACAGGGAGAATCC 57
Lewis             ACGGGATCGGTTTTAACCTTGTGCTTTTTTCCCTCCCCTTTTCTAACAGGGAGAATCC 57
BN                ACGGGATCGGTTTTAACCTTGTGCTTTTTTCCCTCCCCTTTTCTAACAGGGAGAATCC 57
                  *****

DSS (Exon #2)     CGTATTCTCAGAGTAAAAGTTGTTTCTGGGATTGACCTCGCCAAAAGGCATATTTGGA 117
Lewis             CGTATTCTCAGAGTAAAAGTTGTTTCTGGGATTGACCTCGCCAAAAGGCATATTTGGA 117
BN                CGTATTCTCAGAGTAAAAGTTGTTTCTGGGATTGACCTCGCCAAAAGGCATATTTGGA 117
                  *****

DSS (Exon #2)     GCCAGGTACGTTTGCTTTTTTGTGTGTGTGTAGGGGGTGGGAGTGTCTTGGAAAAGTGAT 177
Lewis             GCCAGGTACGTTTGCTTTTTTGTGTGTGTGTAGGGGGTGGGAGTGTCTTGGAAAAGTGAT 177
BN                GCCAGGTACGTTTGCTTTTTTGTGTGTGTGTAGGGGGTGGGAGTGTCTTGGAAAAGTGAT 177
                  *****

```

```

DSS          AAGCCTTGGTGTGA 192
Lewis       AAGCCTTGGTGTGA 192
BN          AAGCCTTGGTGTGA 192
*****

```

Exon #3 :

```

DSS (Intron 3)  TTTACATTTAATCCATTTTGCTGTTTTGTTGCT 37
Lewis          TTTACATTTAATCCATTTTGCTGTTTTGTTGCT 60
BN            TTTACATCTTAATCCATTTTGCTGTTTTGTTGCT 57
*****;*****

DSS          TGTTTGTGCTAATGAAAAAAAAAAGTATAGCACCATTTAACGTGAGCCGTTTCCTTGCA 96
Lewis       TGTTTGTGCTAATGAAAAAAAAAAGTATAGCACCATTTAATGTGAGCCGTTTCCTTGCA 96
BN          TGTTTGTGCTAATGAAAAAAAAAAGTATAGCACCATTTAACGTGAGCCGTTTCCTTGCA 96
*****;*****

DSS (Exon #3) GTGACCCATACGTGAAGCTCTCGTTGTACGTAGCTGACGAGAACAGAGAACTCGCTCTGG 156
Lewis       GTGACCCATACGTGAAGCTCTCGTTGTACGTAGCTGACGAGAACAGAGAACTCGCTCTGG 156
BN          GTGACCCATACGTGAAGCTCTCGTTGTACGTAGCTGACGAGAACAGAGAACTCGCTCTGG 156
*****

DSS (Exon #3) TTCAGACTAAGACAATTAAAAAGGTAGGTCGGCCAGCTTCTATGAAATTCATGTAAGTCC 216
Lewis       TTCAGACTAAGACAATTAAAAAGGTAGGTCGGCCAGCTTCTATGAAATTCATGTAAGTCC 216
BN          TTCAGACTAAGACAATTAAAAAGGTAGGTCGGCCAGCTTCTATGAAATTCATGTAAGTCC 216
*****

DSS          CAATTTGACATTTTCGTATTTTTGCCTTGTAGCAGTTTGCCTTTTAAGGATAAGATAGCAA 276
Lewis       CAATTTGACATTTTCGTATTTTTGCCTTGTAGCAGTTTGCCTTTTAAGGATAAGATAGCAA 276
BN          CAATTTGACATTTTCGTATTTTTGCCTTGTAGCAGTTTGCCTTTTAAGGATAAGATAGCAA 276
*****

DSS          TTTTTTTTTTAGTATTTTCTCTGAAAATCATCC 309
Lewis       TTTTTTTTTTAGTATTTTCTCTGAAAATCATCC 309
BN          TTTTTTTTTTAGTATTTTCTCTGAAAATCATCC 309
*****

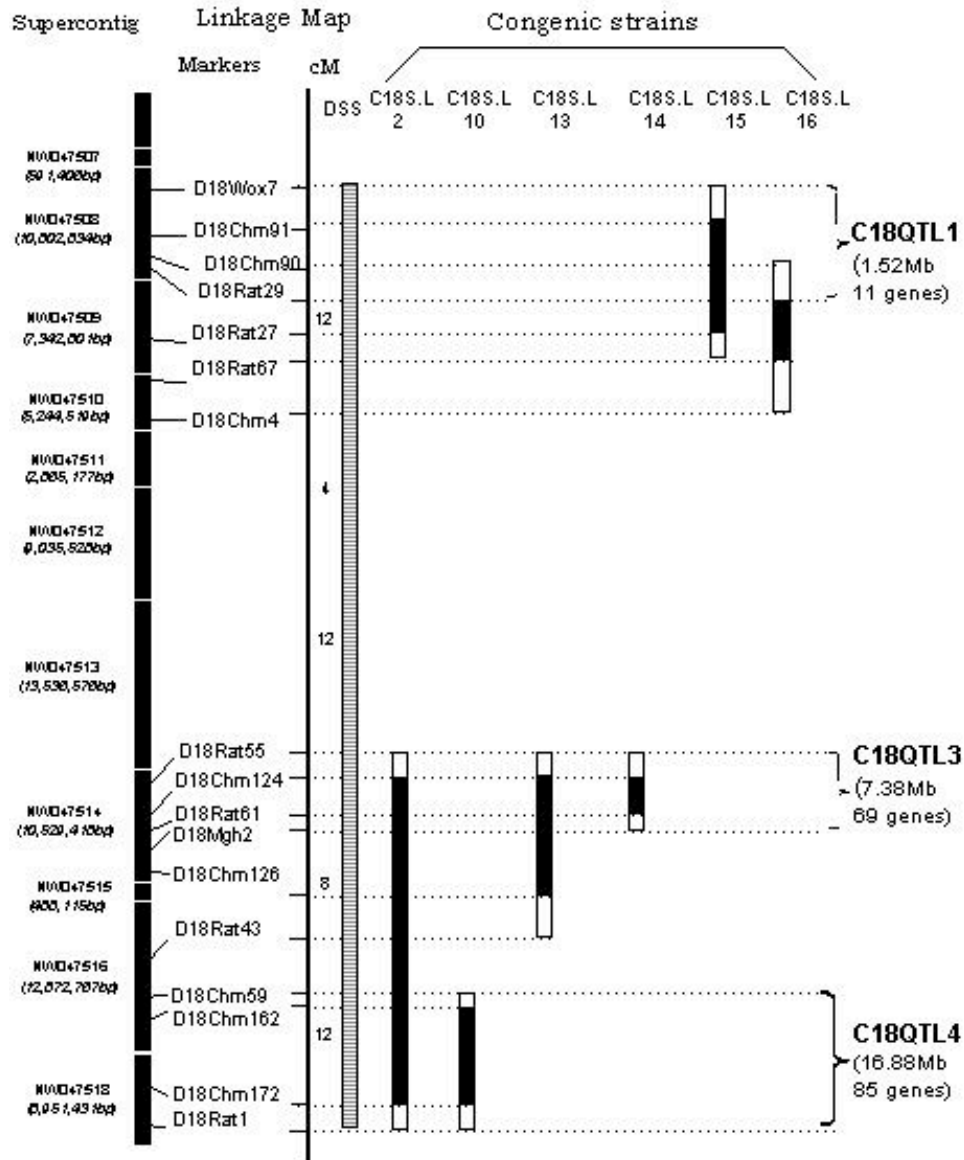
```

Footnote to Table 1: DSS, Dahl salt-sensitive rats; BN, Brown Norway rats. * denotes nucleotide identity and: indicates a difference. Exons are highlighted in bold letters. Sequences from DSS and Lewis are generated from the current work. The BN sequence is based on (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/NC_005117.2/?from=61249645&to=61477088&report=genbank). The nucleotide variation in exon #2 between DSS/Lewis (C) and BN (T) is accentuated in larger and italicized letters.

Figure 1. **Fine congenic resolution of BP QTLs on Chr 18.** The contigs and marker positions in megabases (Mb) within them are taken from (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview>). Solid bars under congenic sub-strains symbolize the Dahl salt-sensitive [1] chromosome fragments (bar with lines) that have been replaced by those of Lewis. Open bars on ends of solid bars indicate the ambiguities of crossover breakpoints between markers. *Adrb2*, α -2 adrenergic receptor gene; *Nedd4l*, the neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 4-like gene. D18Chm markers are produced from the rat genome sequence (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview>).

Mean arterial pressures (MAPs) for DSS and congenic strains are averaged for the period of measurement and are given at the bottom of the map to facilitate strain comparisons. Significant *p* values vs. DSS are emphasized in bold and italics. \pm indicates SEM. C18S.L10, C18S.L13, C18S.L14, C18S.L15 and C18S.L16 are newly-generated from this study. Their full names are listed in the method section under Constructions of new congenic sub-strains. C18S.L2 was produced previously (5). The placements of the BP QTLs are indicated to the right by brackets. Below a given QTL designation is the size of the QTL-residing interval in megabases (Mbs), and number of genes and undefined loci.

Rat Chromosome 18



MAP (mmHg)	184±4	142±2	133±3	156±3	148±5	157±8	170±8
n=	16	5	6	5	7	5	5
MAP difference DSS minus congenics (mmHg)	—	42	51	28	36	27	14
ANOVA + Dunnett <i>P</i>	—	<0.001	<0.001	0.038	<0.001	0.04	>0.29

Supplement 1. Sequence alignment of *Nedd4l* coding regions among DSS, Lewis and BN

DSS	<u>ATG</u> CTGAGTCTCCCGAGAGGAGGGGAGAATCCCGTAT (F1)	TCTCAGAGTAAAAGTTGTTTCT	60
Lewis	<u>ATG</u> CTGAGTCTCCCGAGAGGAGGGGAGAATCCCGTAT	TCTCAGAGTAAAAGTTGTTTCT	60
BN	<u>ATG</u> CTGAGTCTCCCGAGAGGAGGGGAGAATCCCGTAT	TCTCAGAGTAAAAGTTGTTTCT	60
	*****	*****	*
DSS	GGGATTGACCTCGCCAAAAAGGACATATTTGGAGCCAGTGACCCATACGTGAAGCTCTCG		120
Lewis	GGGATTGACCTCGCCAAAAAGGACATATTTGGAGCCAGTGACCCATACGTGAAGCTCTCG		120
BN	GGGATTGACCTCGCCAAAAAGGACATATTTGGAGCCAGTGACCCATACGTGAAGCTCTCG		120

DSS	TTGTACGTAGCTGACGAGAACAGAGAACTCGCTCTGGTTCAGACTAAGACAATTA AAAA <u>AG</u>		180
Lewis	TTGTACGTAGCTGACGAGAACAGAGAACTCGCTCTGGTTCAGACTAAGACAATTA AAAA <u>AG</u>		180
BN	TTGTACGTAGCTGACGAGAACAGAGAACTCGCTCTGGTTCAGACTAAGACAATTA AAAA <u>AG</u>		180

DSS	<u>ACG</u> CTGAACCCAAA (F2) GTGGAATGAAGAGTTTATTTTAGAGTAAATCCATCTAATCACAGG		240
Lewis	<u>ACG</u> CTGAACCCAAA GTGGAATGAAGAGTTTATTTTAGAGTAAATCCATCTAATCACAGG		240
BN	<u>ACG</u> CTGAACCCAAA GTGGAATGAAGAGTTTATTTTAGAGTAAATCCATCTAATCACAGG		240
	*****	*****	
DSS	CTCTTATTTGAAGTATTTGACGAGAACAGATTGACACGAGACGACTTCTGGGCCAGGTG		300
Lewis	CTCTTATTTGAAGTATTTGACGAGAACAGATTGACACGAGACGACTTCTGGGCCAGGTG		300
BN	CTCTTATTTGAAGTATTTGACGAGAACAGATTGACACGAGACGACTTCTGGGCCAGGTG		300

DSS	GACGTGCCTCTTAGTCACCTTCCGACAGAAGATCCAACCATGGAGAGACCCATACATTT		360
Lewis	GACGTGCCTCTTAGTCACCTTCCGACAGAAGATCCAACCATGGAGAGACCCATACATTT		360
BN	GACGTGCCTCTTAGTCACCTTCCGACAGAAGATCCAACCATGGAGAGACCCATACATTT		360
	*****	*****	
DSS	AAGGATTTTCTCCTGCGACCTAGAAAGTCATAAATCACGCGTCAAGGGGTTTTTGAGGTTG		420
Lewis	AAGGATTTTCTCCTGCGACCTAGAAAGTCATAAATCACGCGTCAAGGGGTTTTTGAGGTTG		420
BN	AAGGATTTTCTCCTGCGACCTAGAAAGTCATAAATCACGCGTCAAGGGGTTTTTGAGGTTG		420

DSS	AAAATGGCCTACATGCCGAAAAACGGAGGTCAGGATGAAGAAAAACGCGAGCAGAGGGAC		480
Lewis	AAAATGGCCTACATGCCGAAAAACGGAGGTCAGGATGAAGAAAAACGCGAGCAGAGGGAC		480
BN	AAAATGGCCTACATGCCGAAAAACGGAGGTCAGGATGAAGAAAAACGCGAGCAGAGGGAC		480

DSS	GACATGGAGCATGGATGGGAAGTTGTTGACTCAAACGACTCAGCTTCCC (R1)	AGCACCAGGAG	540
Lewis	GACATGGAGCATGGATGGGAAGTTGTTGACTCAAACGACTCAGCTTCCC	AGCACCAGGAG	540
BN	GACATGGAGCATGGATGGGAAGTTGTTGACTCAAACGACTCAGCTTCCC	AGCACCAGGAG	540
	*****	*****	
DSS	GAGTCCCTCCTCCTCCCTGCCACCAGGATGGGAAGAGAAAGTGGACAATTTAGGCCGA		600
Lewis	GAGTCCCTCCTCCTCCTCCCTGCCACCAGGATGGGAAGAGAAAGTGGACAATTTAGGCCGA		600
BN	GAGTCCCTCCTCCTCCTCCCTGCCACCAGGATGGGAAGAGAAAGTGGACAATTTAGGCCGA		600

DSS	ACTTACTATGTCAACCACAACAACAGGAGTACGCAGTGGCACCACCTAGCTTGATGGAT		660
Lewis	ACTTACTATGTCAACCACAACAACAGGAGTACGCAGTGGCACCACCTAGCTTGATGGAT		660
BN	ACTTACTATGTCAACCACAACAACAGGAGTACGCAGTGGCACCACCTAGCTTGATGGAT		660

DSS	GTATCGTCAGAGTCAGACAATAACATCAGGCAGATCAATCAGGAGGCCGCACACCGGCGT		720
Lewis	GTATCGTCAGAGTCAGACAATAACATCAGGCAGATCAATCAGGAGGCCGCACACCGGCGT		720
BN	GTATCGTCAGAGTCAGACAATAACATCAGGCAGATCAATCAGGAGGCCGCACACCGGCGT		720

DSS TTCCGCTCTCGGAGGCACATTAGT (F3) GAAGACTTGGAGCCTGAGGCCTCTGAAGGCGGTGGA 780
Lewis TTCCGCTCTCGGAGGCACATTAGT GAAGACTTGGAGCCTGAGGCCTCTGAAGGCGGTGGA 780
BN TTCCGCTCTCGGAGGCACATTAGT GAAGACTTGGAGCCTGAGGCCTCTGAAGGTGGTGA 780

DSS GAAGGCCCTGAGCCTTGGGAGACCATTTCAGAGGAAGTGAACATGGCGGGAGATTCTCTC 840
Lewis GAAGGCCCTGAGCCTTGGGAGACCATTTCAGAGGAAGTGAACATGGCGGGAGATTCTCTC 840
BN GAAGGCCCTGAGCCTTGGGAGACCATTTCAGAGGAAGTGAACATGGCGGGAGATTCTCTC 840

DSS AGCCTGGCTCTACC (R2) CCCACCTCCTGCCTCCCCAGTGTCAAGGACCAGCCCCAGGAGCTG 900
Lewis AGCCTGGCTCTACC CCCACCTCCTGCCTCCCCAGTGTCAAGGACCAGCCCCAGGAGCTG 900
BN AGCCTGGCTCTACC CCCACCTCCTGCCTCCCCAGTGTCAAGGACCAGCCCCAGGAGCTG 900

DSS TCGGAAGAACTGAGCAGAAGGTTGCAGATCACTCCGGACTCCAATGGGGAACAGTTCAGT 960
Lewis TCGGAAGAACTGAGCAGAAGGTTGCAGATCACTCCGGACTCCAATGGGGAACAGTTCAGT 960
BN TCGGAAGAACTGAGCAGAAGGTTGCAGATCACTCCGGACTCCAATGGGGAACAGTTCAGT 960

DSS GCTCTGATCCAGAGAGAGCCCTCGTCTAGGCTCCGGTCTGCAGTGTACCGACACGGTT 1020
Lewis GCTCTGATCCAGAGAGAGCCCTCGTCTAGGCTCCGGTCTGCAGTGTACCGACACGGTT 1020
BN GCTCTGATCCAGAGAGAGCCCTCGTCTAGGCTCCGGTCTGCAGTGTACCGACACGGTT 1020

DSS GCTGAACAAGCTCACCTTCCACCGCCAGCACCCCACTAGGCGAGCCGTTTCGTC AACT 1080
Lewis GCTGAACAAGCTCACCTTCCACCGCCAGCACCCCACTAGGCGAGCCGTTTCGTC AACT 1080
BN GCTGAACAAGCTCACCTTCCACCGCC-----ATCAGTGGCCTATGTACATACCACGCGGGCCTA 1046

DSS GTCACGGGTGGTGAGGAATCAACGCCATCAGTGGCCTATGTACATACCACGCGGGCCTA 1140
Lewis GTCACGGGTGGTGAGGAATCAACGCCATCAGTGGCCTATGTACATACCACGCGGGCCTA 1140
BN -----ATCAGTGGCCTATGTACATACCACGCGGGCCTA 1080

DSS CCTTCAGGCTGGGAAGAAAGAAAAGATGCTAAGGGACGCACATACTATGTCAATCATAAC 1200
Lewis CCTTCAGGCTGGGAAGAAAGAAAAGATGCTAAGGGACGCACATACTATGTCAATCATAAC 1200
BN CCTTCAGGCTGGGAAGAAAGAAAAGATGCTAAGGGACGCACATACTATGTCAATCATAAC 1140

DSS AATCGAACCACA AACTTGGACTCGACCAATCATGCAGCTTGCAGAAGACGGTGCCTCTGGA 1260
Lewis AATCGAACCACA AACTTGGACTCGACCAATCATGCAGCTTGCAGAAGACGGTGCCTCTGGA 1260
BN AATCGAACCACA AACTTGGACTCGACCAATCATGCAGCTTGCAGAAGACGGTGCCTCTGGA 1200

DSS TCAGCCACA A A A CAGTAACAACCACCTAGTTCGAACCCAGATCCGCCGGCCTCGTAGCCTC 1320
Lewis TCAGCCACA A A A CAGTAACAACCACCTAGTTCGAACCCAGATCCGCCGGCCTCGTAGCCTC 1320
BN TCAGCCACA A A A CAGTAACAACCACCTAGTTCGAACCCAGATCCGCCGGCCTCGTAGCCTC 1260

DSS AGCTCGCCAACAGTAACCTTATCTGCCCACTGGAGGGTGCCAAGGATTCACCCATACGC 1380
Lewis AGCTCGCCAACAGTAACCTTATCTGCCCACTGGAGGGTGCCAAGGATTCACCCATACGC 1380
BN AGCTCGCCAACAGTAACCTTATCTGCCCACTGGAGGGTGCCAAGGATTCACCCATACGC 1320

DSS CGTGCTGTGAAAGATAACCTTTTCCAATCCACAGTCCCTCAGCCATCACCTTACA (F4) ACTCC 1440
Lewis CGTGCTGTGAAAGATAACCTTTTCCAATCCACAGTCCCTCAGCCATCACCTTACA ACTCC 1440
BN CGTGCTGTGAAAGATAACCTTTTCCAATCCACAGTCCCTCAGCCATCACCTTACA ACTCC 1380

DSS CCCAAACCACAACAAAAGTCACACAGAGCTTCTGCCACCAGGCTGGGAGATGAGGATA 1500
Lewis CCCAAACCACAACAAAAGTCACACAGAGCTTCTGCCACCAGGCTGGGAGATGAGGATA 1500
BN CCCAAACCACAACAAAAGTCACACAGAGCTTCTGCCACCAGGCTGGGAGATGAGGATA 1440

DSS GCGCCAAACGGCCGACCCTTCTTCATTGACCATAACACAAAGACGACAACCTGGGAAGAT (R3) 1560
Lewis GCGCCAAACGGCCGACCCTTCTTCATTGACCATAACACAAAGACGACAACCTGGGAAGAT 1560
BN GCGCCAAACGGCCGACCCTTCTTCATTGACCATAACACAAAGACGACAACCTGGGAAGAT 1500

DSS CCACGGCTGAAATTTCCAGTACATATGCGGTCAAAAGCATCTTTAAACCCCAATGACCTG 1620
Lewis CCACGGCTGAAATTTCCAGTACATATGCGGTCAAAAGCATCTTTAAACCCCAATGACCTG 1620
BN CCACGGCTGAAATTTCCAGTACATATGCGGTCAAAAGCATCTTTAAACCCCAATGACCTG 1560

DSS GGCCCTCTTCTCTGGCTGGGAAGAAAGGATCCACCTGGACGGCCGCACATTTTACATT 1680
Lewis GGCCCTCTTCTCTGGCTGGGAAGAAAGGATCCACCTGGACGGCCGCACATTTTACATT 1680
BN GGCCCTCTTCTCTGGCTGGGAAGAAAGGATCCACCTGGACGGCCGCACATTTTACATT 1620

DSS GACCATAATAGCAAATTTACTCAGTGGGAAGATCCAAGACTACAGAATCCAGCCATAACT 1740
Lewis GACCATAATAGCAAATTTACTCAGTGGGAAGATCCAAGACTACAGAATCCAGCCATAACT 1740
BN GACCATAATAGCAAATTTACTCAGTGGGAAGATCCAAGACTACAGAATCCAGCCATAACT 1680

DSS GGTCCGGCTGTGCCGTACTCCAGAGAATTTAAGCAGAAATACGACTACTTTAGGAAGAAA 1800
Lewis GGTCCGGCTGTGCCGTACTCCAGAGAATTTAAGCAGAAATACGACTACTTTAGGAAGAAA 1800
BN GGTCCGGCTGTGCCGTACTCCAGAGAATTTAAGCAGAAATACGACTACTTTAGGAAGAAA 1740

DSS TTAAGAAACCTGCTGATATTCCAAACAGGTTTGAATGAACTCCACAGAAACAACATA 1860
Lewis TTAAGAAACCTGCTGATATTCCAAACAGGTTTGAATGAACTCCACAGAAACAACATA 1860
BN TTAAGAAACCTGCTGATATTCCAAACAGGTTTGAATGAACTCCACAGAAACAACATA 1800

DSS TTTGAAGAATCCTATCGGAGGATCATGTCTGTAAAGAGACCTGACGTCTAAAGGCTAGA 1920
Lewis TTTGAAGAATCCTATCGGAGGATCATGTCTGTAAAGAGACCTGACGTCTAAAGGCTAGA 1920
BN TTTGAAGAATCCTATCGGAGGATCATGTCTGTAAAGAGACCTGACGTCTAAAGGCTAGA 1860

DSS CTGTGGATCGAGTTTGAATCAGAGAAAGGCCCTGGACTATGGGGCGTGGCCAGAGAGTGG 1980
Lewis CTGTGGATCGAGTTTGAATCAGAGAAAGGCCCTGGACTATGGGGCGTGGCCAGAGAGTGG 1980
BN CTGTGGATCGAGTTTGAATCAGAGAAAGGCCCTGGACTATGGGGCGTGGCCAGAGAGTGG 1920

DSS TTCTTCTTACTGTCCAAGAGATGTTCAATCCCTACTATGGCCTCTTCGAGTACTCTGCC 2040
Lewis TTCTTCTTACTGTCTAAAGAGATGTTCAATCCCTACTATGGCCTCTTCGAGTACTCTGCC 2040
BN TTCTTCTTACTGTCCAAGAGATGTTCAATCCCTACTATGGCCTCTTCGAGTACTCTGCC 1980

DSS ACGGACAACCTACACACTTCAGATCAATCCCAACTCAGGCCTGTGTAACGAAGA (F5) TCACTTA 2100
Lewis ACGGACAACCTACACACTTCAGATCAATCCCAACTCAGGCCTGTGTAACGAAGA TCACTTA 2100
BN ACGGACAACCTACACACTTCAGATCAATCCCAACTCAGGCCTGTGTAACGAAGA TCACTTA 2040

DSS TCCTATTTCACTTTTCATTGGGAGAGTTGCTGGCCTGGCAGTGTTCATGGGAAACTCTTA 2160
Lewis TCCTATTTCACTTTTCATTGGGAGAGTTGCTGGCCTGGCAGTGTTCATGGGAAACTCTTA 2160
BN TCCTATTTCACTTTTCATTGGGAGAGTTGCTGGCCTGGCAGTGTTCATGGGAAACTCTTA 2100

DSS GATGGATTCTTCATTCGACCTTTCTACAAGATGATGCTGGGGAAGCAAATAA (R4) CTCTGAAT 2220
Lewis GATGGATTCTTCATTCGACCTTTCTACAAGATGATGCTGGGGAAGCAAATAA CTCTGAAT 2220
BN GATGGATTCTTCATTCGACCTTTCTACAAGATGATGCTGGGGAAGCAAATAA CTCTGAAT 2160

DSS GACATGGAGTCTGTGGACAGCGAGTACTACAACCTTTGAAGTGGATCTTGAAAACGAC 2280
Lewis GACATGGAGTCTGTGGACAGCGAGTACTACAACCTTTGAAGTGGATCTTGAAAACGAC 2280
BN GACATGGAGTCTGTGGACAGCGAGTACTACAACCTTTGAAGTGGATCTTGAAAACGAC 2220

DSS	CCCACGGA	ACTTGACCTCATGTTCTGCATAGATGAAGAGA	ACTTTGGGCAGACTTACCAA	2340
Lewis	CCCACGGA	ACTTGACCTCATGTTCTGCATAGATGAAGAGA	ACTTTGGGCAGACTTACCAA	2340
BN	CCCACGGA	ACTTGACCTCATGTTCTGCATAGATGAAGAGA	ACTTTGGGCAGACTTACCAA	2280

DSS	GTGGACCT	GAAGCCCAATGGGT	CAGAAATCATGGTAACCAATGAGAACAAGCGAGAATAT	2400
Lewis	GTGGACCT	GAAGCCCAATGGGT	CAGAAATCATGGTAACCAATGAGAACAAGCGAGAATAT	2400
BN	GTGGACCT	GAAGCCCAATGGGT	CAGAAATCATGGTAACCAATGAGAACAAGCGAGAATAT	2340

DSS	ATTGACTT	GGTCATCCAGTGGAGATTTGTGAACAGGGTCCAGAAGCAAATGAATGCCTTC		2460
Lewis	ATTGACTT	GGTCATCCAGTGGAGATTTGTGAACAGGGTCCAGAAGCAAATGAATGCCTTC		2460
BN	ATTGACTT	GGTCATCCAGTGGAGATTTGTGAACAGGGTCCAGAAGCAAATGAATGCCTTC		2400

DSS	TTGGAGGG	ATTTACAGAACTTCTTCCAATCGACTTGATTA	AAAAATTTTGGATGAAAATGAG	2520
Lewis	TTGGAGGG	ATTTACAGAACTTCTTCCAATCGACTTGATTA	AAAAATTTTGGATGAAAATGAG	2520
BN	TTGGAGGG	ATTTACAGAACTTCTTCCAATCGACTTGATTA	AAAAATTTTGGATGAAAATGAG	2460

DSS	CTGGAGTT	GCTGATGTGCGGCCCTGGT	GATGTGGACGTGAATGATTGGAGACAGCACTCC	2580
Lewis	CTGGAGTT	GCTGATGTGCGGCCCTGGT	GATGTGGACGTGAATGATTGGAGACAGCACTCC	2580
BN	CTGGAGTT	GCTGATGTGCGGCCCTGGT	GATGTGGACGTGAATGATTGGAGACAGCACTCC	2520

DSS	ATTTACA	AGAACGGCTACTGCCCAACCACCTGT	CATCCAGTGGTTCTGGAAGGCCGTG	2640
Lewis	ATTTACA	AGAACGGCTACTGCCCAACCACCTGT	CATCCAGTGGTTCTGGAAGGCCGTG	2640
BN	ATTTACA	AGAACGGCTACTGCCCAACCACCTGT	CATCCAGTGGTTCTGGAAGGCCGTG	2580

DSS	CTGCTGAT	GGATGCTGAGAA (F6)	GCGGATCCGGTTACTACAGTTTGT	CACAGGCACCTCCAGA 2700
Lewis	CTGCTGAT	GGATGCTGAGAA	GCGGATCCGGTTACTACAGTTTGT	CACAGGCACCTCCAGA 2700
BN	CTGCTGAT	GGATGCTGAGAA	GCGGATCCGGTTACTACAGTTTGT	CACAGGCACCTCCAGA 2640

DSS	GTACCCAT	GAATGGATTTGCCGA	ACTTTATGGTTCCAATGGTCCCTCAGCTGTTTACAATA	2760
Lewis	GTACCCAT	GAATGGATTTGCCGA	ACTTTATGGTTCCAATGGTCCCTCAGCTGTTTACAATA	2760
BN	GTACCCAT	GAATGGATTTGCCGA	ACTTTATGGTTCCAATGGTCCCTCAGCTGTTTACAATA	2700

DSS	GAGCAAT	GGGGTAGTCCTGAAA (R5)	AACTGCCCAGAGCTCATA	CATGCTTTAACCGCCTTGAT 2820
Lewis	GAGCAAT	GGGGTAGTCCTGAAA	AACTGCCCAGAGCTCATA	CATGCTTTAACCGCCTTGAT 2820
BN	GAGCAAT	GGGGTAGTCCTGAAA	AACTGCCCAGAGCTCATA	CATGCTTTAACCGCCTTGAT 2760

DSS	TTACCTCC	GATGAAACCTTTGAAGATCTACGGG	GAGAAGCTTCTCATGGCCGTGGAGAAT	2880
Lewis	TTACCTCC	GATGAAACCTTTGAAGATCTACGGG	GAGAAGCTTCTCATGGCCGTGGAGAAT	2880
BN	TTACCTCC	GATGAAACCTTTGAAGATCTACGGG	GAGAAGCTTCTCATGGCCGTGGAGAAT	2820

DSS	GCTCAAGG	CTTCGAAGGTGTGGAT	TAAGGA AGGCCTCGGCCTCAGGGCACCGCCCTTCCA	2940
Lewis	GCTCAAGG	CTTCGAAGGTGTGGAT	TAAGGA AGGCCTCGGCCTCAGGGCACCGCCCTTCCA	2940
BN	GCTCAAGG	CTTCGAAGGTGTGGAT	TAAGGA AGGCCTCGGCCTCAGGGCACCGCCCTTCCA	2880

DSS	GCAAGGT	CCGCGTGCAC	TTTTGCATTTGCCTAGCAGACTTTTTGCAGAGCCCGTGGCAGAA	3000
Lewis	GCAAGGT	CCGCGTGCAC	TTTTGCATTTGCCTAGCAGACTTTTTGCAGAGCCCGTGGCAGAA	3000
BN	GCAAGGT	CCGCGTGCAC	TTTTGCATTTGCCTAGCAGACTTTTTGCAGAGCCCGTGGCAGAA	2940

DSS	GCAGTTGC	TGGCTGGCTCTGGAGCCCAGCTTGT	CCTGGGCCCTGCCGAGTTCCGCCAG	3060
Lewis	GCAGTTGC	TGGCTGGCTCTGGAGCCCAGCTTGT	CCTGGGCCCTGCCGAGTTCCGCCAG	3060
BN	GCAGTTGC	TGGCTGGCTCTGGAGCCCAGCTTGT	CCTGGGCCCTGCCGAGTTCCGCCAG	3000

DSS	GGAACCCAGCCCCGCTCAAGTGCCGCCCCCTCACCGCCGATAACTCAACTGGTTGATGTG	3120
Lewis	GGAACCCAGCCCCGCTCAAGTGCCGCCCCCTCACCGCCGATAACTCAACTGGTTGATGTG	3120
BN	GGAACCCAGCCCCGCTCAAGTGCCGCCCCCTCACCGCCGATAACTCAACTGGTTGATGTG *****	3060
DSS	TACTACTGATTACAGGAGGACTTGTCTATTTATGTTGTGCCTCTGCAGGCAAAGCCCTTA	3180
Lewis	TACTACTGATTACAGGAGGACTTGTCTATTTATGTTGTGCCTCTGCAGGCAAAGCCCTTA	3180
BN	TACTACTGATTACAGGAGGACTTGTCTATTTATGTTGTGCCTCTGCAGGCAAAGCCCTTA *****	3120
DSS	ATAAATATTTTGCATACTCTCTAATGACAGTGAATGGAATTAATCACGCTCCAGGTATAG	3240
Lewis	ATAAATATTTTGCATACTCTCTAATGACAGTGAATGGAATTAATCACGCTCCAGGTATAG	3240
BN	ATAAATATTTTGCATACTCTCTAATGACAGTGAATGGAATTAATCACGCTCCAGGTATAG *****	3180
DSS	TATTACAACCTCATGTTTACTTTTTAAAAATGATTTAGACTGATTTTCAGATTTTATTCA	3300
Lewis	TATTACAACCTCATGTTTACTTTTTAAAAATGATTTAGACTGATTTTCAGATTTTATTCA	3300
BN	TATTACAACCTCATGTTTACTTTTTAAAAATGATTTAGACTGATTTTCAGATTTTATTCA *****	3240
DSS	TTACAATTAAGATGTCCTCATGTACTTGGAAAAGTGAGCATATTTTTTTTGTATTTGAAT	3360
Lewis	TTACAATTAAGATGTCCTCATGTACTTGGAAAAGTGAGCATATTTTTTTTGTATTTGAAT	3360
BN	TTACAATTAAGATGTCCTCATGTACTTGGAAAAGTGAGCATATTTTTTTTGTATTTGAAT *****	3300
DSS	TTCATATCAAGCTTAATGTTGGTGACATTTTTTTTTTATTTTTGAAGTACTTTGACACTC	3420
Lewis	TTCATATCAAGCTTAATGTTGGTGACATTTTTTTTTTATTTTTGAAGTACTTTGACACTC	3420
BN	TTCATATCAAGCTTAATGTTGGTGACATTTTTTTTTTATTTTTGAAGTACTTTGACACTC *****	3360
DSS	CC (R6)	
Lewis	CC	
BN	CC	
	**	

Footnote to Supplement 1: DSS, Dahl salt-sensitive rats; BN, Brown Norway rats. * denotes nucleotide identity. – indicates an absence of nucleotide. Six overlapping primer pairs are underlined and range from combinations of (F1)/(R1), (F2)/(R2) and until (F6)/(R6). Initiation and termination codons are marked by bold and italic letters. Sequences from DSS and Lewis are generated from the current work with GenBank accession numbers GQ160815 and GQ160816 respectively. The BN sequence is taken from (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/109506711?report=genbank>). The nucleotide variation at #59 between DSS/Lewis and BN is highlighted in bold and larger letters.

Supplement 2. Genes residing in the chromosome interval harboring C18QTL3

<i>RGD1312005_predicted</i>	similar to DD1, hypothetical protein LOC291580
<i>Chsy3</i>	chondroitin sulfate synthase 3
<i>RGD1561768_predicted</i>	similar to Rpl7a protein
<i>LOC364882</i>	similar to ribosome L13
<i>RGD1309362</i>	similar to interferon-inducible GTPase
<i>RGD1559715_predicted</i>	similar to MGC108823 protein
<i>MGC108823</i>	similar to interferon-inducible GTPase
<i>LOC502172</i>	hypothetical LOC502172
<i>RGD1305184_predicted</i>	similar to CDNA sequence BC023105
<i>MGC105567</i>	similar to cDNA sequence BC023105
<i>LOC689233</i>	similar to immunity-related GTPase family, cinema 1
<i>Nid67</i>	putative small membrane protein NID67 (role in neurogenesis)
<i>Dctn4</i>	dynactin 4
<i>Rbm22</i>	RNA binding motif protein 22
<i>LOC689274 (Myoz3)</i>	myozenin 3
<i>Synpo</i>	synaptopodin
<i>Ndst1</i>	N-deacetylase/N-sulfotransferase (heparan glucosaminyl) 1
<i>Rps14</i>	ribosomal protein S14
<i>Cd74</i>	Cd74 molecule, major histocompatibility complex, class II invariant chain
<i>Tcofl_predicted</i>	Treacher Collins Franceschetti syndrome 1, homolog
<i>RGD1310242 [92]</i>	arylsulfatase family, member I
<i>Camk2a</i>	calcium/calmodulin-dependent protein kinase II _
<i>Slc6a7</i>	solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, L-proline), member 7 Na(+)-dependent transporter

<i>LOC689355</i>	hypothetical protein LOC689355
<i>Cdx1_predicted</i>	caudal type homeo box 1
<i>Pdgfrb</i>	platelet derived growth factor receptor _ polypeptide
<i>Csf1r</i>	colony stimulating factor 1 receptor
<i>Slc26a2</i>	solute carrier family 26 (sulfate transporter), member 2
<i>Pde6a_predicted</i>	phosphodiesterase 6A, cGMP-specific, rod, alpha
<i>Pparg1b</i>	peroxisome proliferator-activated receptor gamma, coactivator 1 _
<i>RGD1560471_predicted</i>	similar to hypothetical protein 4933429F08
<i>Csnk1a1</i>	casein kinase 1, alpha 1
<i>rno-mir-145</i>	MicroRNA
<i>Il17b</i>	interleukin 17B
<i>RGD1563290_predicted</i>	prenylcysteine oxidase 1 like
<i>LOC688777 (Grpel2)</i>	GrpE-like 2, mitochondrial
<i>RGD1311580_predicted</i>	actin filament associated protein 1-like 1 (<i>Afap111</i>)
<i>RGD1565118_predicted</i>	actin binding LIM protein family, member 3, (<i>Ablim3</i>)
<i>RGD1309038 (Sh3tc2)</i>	SH3 domain and tetratricopeptide repeats 2
<i>RGD1561455</i>	similar to Ras GTPase-activating-like protein IQGAP2
<i>Adrb2</i>	beta 2 adrenergic receptor
<i>Htr4</i>	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 4
<i>Rbxo38-pred</i>	F-box protein 38
<i>Ecg2</i>	esophagus cancer-related protein 2
<i>Loc689570</i>	similar to Kazal type serine protease inhibitor 4
<i>Loc689616 (Apcdd1)</i>	adenomatosis polyposis coli down-regulated 1
<i>Napg</i>	N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein, gamma
<i>Loc688934 (Fam38b)</i>	family with sequence similarity 38, member B
<i>RGD1306866-pred</i>	similar to Hypothetical protein KIAA0233
<i>Txn11</i>	thioredoxin-like 1 mouse homolog

<i>Wdr7</i>	WD repeat domain 7
<i>RGD1565894-pred</i>	similar to ribosomal protein L31
<i>Loc502174</i>	similar to 40S ribosomal protein S7
<i>Loc502175</i>	similar to peroxiredoxin 1
<i>St8sia3</i>	ST8 alpha-N-acetyl-neuraminide alpha-2,8-sialyltransferase 3
<i>RGD1562699</i>	hypothetical protein LOC291558
<i>RGD1564677</i>	similar to transcription factor ONECUT2
<i>Fech-pred</i>	ferrochelatase
<i>Nars</i>	asparaginyl-tRNA synthetase
<i>Atp8b1-pred</i>	ATPase, Class I, type 8B, member 1
<i>Loc498874</i>	hypothetical LOC498874
<i>Nedd4l</i>	neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 4-like
<i>Loc502176</i>	hypothetical protein LOC502176
<i>rno-mir-122a</i>	MicroRNA
<i>RGD1564431 (Alpk2_predicted)</i>	alpha-kinase 2
<i>Malt1_predicted</i>	mucosa associated lymphoid tissue lymphoma translocation gene 1
<i>RGD1560815_predicted</i>	similar to acidic ribosomal phosphoprotein P1
<i>Znf532_predicted</i>	zinc finger protein 532
<i>RGD1304731_predicted</i>	similar to RIKEN cDNA 5330437I02 gene
<i>Sec113</i>	SEC11 homolog C (<i>S. cerevisiae</i>), human homolog
<i>Grp</i>	gastrin releasing peptide

69 genes + 2 microRNAs

Supplement 3. Nucleotide sequence alignment of the *Adrb2* gene among DSS, Lewis and BN

```

DSS      TACTTAAGAAATTGTTTAAAAAGAAGATCATGCAGACTGGAGAGACAGCTCAGTGGTTAA 60
LEWIS    TACTTAAGAAATTGTTTAAAAAGAAGATCATGCAGACTGGAGAGACAGCTCAGTGGTTAA 60
BN       TACTTAAGAAATTGTTTAAAAAGAAGATCATGCAGACTGGAGAGACAGCTCAGTGGTTAA 60
*****

DSS      GAGCATTGGCTGACTTCCAGAGGACCAGGGTTCGATTGCCAGCACTCACAAAGGCAGCTT 120
LEWIS    GAGCATTGGCTGACTTCCAGAGGACCAGGGTTCGATTGCCAGCACTCACAAAGGCAGCTT 120
BN       GAGCATTGGCTGACTTCCAGAGGACCAGGGTTCGATTGCCAGCACTCACAAAGGCAGCTT 120
*****

DSS      GTGTGTTGATACTATCTGTATATTCAGTCCTAGGGAATCTGATGCTCTCTTTCTCCTGAC 180
LEWIS    GTGTGTTGATACTATCTGTATATTCAGTCCTAGGGAATCTGATGCTCTCTTTCTCCTGAC 180
BN       GTGTGTTGATACTATCTGTATATTCAGTCCTAGGGAATCTGATGCTCTCTTTCTCCTGAC 180
*****

DSS      CTCCAAAACATGCACAAACGTGGTGCACAGACAAACACAGAGATAAGACTCCCATGCGCA 240
LEWIS    CTCCAAAACATGCACAAACGTGGTGCACAGACAAACACAGAGATAAGACTCCCATGCGCA 240
BN       CTCCAAAACATGCACAAACGTGGTGCACAGACAAACACAGAGATAAGACTCCCATGCGCA 240
*****

DSS      TAACATAAGTAATGTAGTTTATTTTTTTTTATTTTCAAAAAGAAAATCTTGCATTTTCG 300
LEWIS    TAACATAAGTAATGTAGTTTATTTTTTTTTATTTTCAAAAAGAAAATCTTGCATTTTCG 300
BN       TAACATAAGTAATGTAGTTTATTTTTTTTTATTTTCAAAAAGAAAATCTTGCATTTTCG 300
*****

DSS      TTTTCAATGCATCCCTGGATATCCACCATATAACAAGAAAATGATGCCACACTCCCAAG 360
LEWIS    TTTTCAATGCATCCCTGGATATCCACCATATAACAAGAAAATGATGCCACACTCCCAAG 360
BN       TTTTCAATGCATCCCTGGATATCCACCATATAACAAGAAAATGATGCCACACTCCCAAG 360
*****

DSS      AATTAAGAATAACACCCCCACCCCAACTCTCCCAAGTGCCTACACATCAATTCCTAAAG 420
LEWIS    AATTAAGAATAACACCCCCACCCCAACTCTCCCAAGTGCCTACACATCAATTCCTAAAG 420
BN       AATTAAGAATAACACCCCCACCCCAACTCTCCCAAGTGCCTACACATCAATTCCTAAAG 420
*****

DSS      AAATGCAAAGGGCGAAGTTACTGCCTTGGTGCGGTTGCCCTGCATGTTCTCAAGGAGGGAG 480
LEWIS    AAATGCAAAGGGCGAAGTTACTGCCTTGGTGCGGTTGCCCTGCATGTTCTCAAGGAGGGAG 480
BN       AAATGCAAAGGGCGAAGTTACTGCCTTGGTGCGGTTGCCCTGCATGTTCTCAAGGAGGGAG 480
*****

DSS      GACGCCAAAAAATATTTTTACCAAGTGTGCTTAGAAACTCTGTAGCTGTTGGAGTCCAC 540
LEWIS    GACGCCAAAAAATATTTTTACCAAGTGTGCTTAGAAACTCTGTAGCTGTTGGAGTCCAC 540
BN       GACGCCAAAAAATATTTTTACCAAGTGTGCTTAGAAACTCTGTAGCTGTTGGAGTCCAC 540
*****

DSS      CTCCTGTGTTCTTGCCAAATAACTGAAAGGGAATACACTGGGTGTCTGCGAATGGGGTGT 600
LEWIS    CTCCTGTGTTCTTGCCAAATAACTGAAAGGGAATACACTGGGTGTCTGCGAATGGGGTGT 600
BN       CTCCTGTGTTCTTGCCAAATAACTGAAAGGGAATACACTGGGTGTCTGCGAATGGGGTGT 600
*****

DSS      CATTATGAGTGCTAGAGGAGGGTAGTACCTGGATGTGAACACCGGTGTCTAAGTGATCC 660
LEWIS    CATTATGAGTGCTAGAGGAGGGTAGTACCTGGATGTGAACACCGGTGTCTAAGTGATCC 660
BN       CATTATGAGTGCTAGAGGAGGGTAGTACCTGGATGTGAACACCGGTGTCTAAGTGATCC 660
*****

DSS      GCACTCCATGCTCCACCGGAGCCCTTGTGTGTGTTTCTTTTCAGCTTGCTTCTGGGTGTT 720
LEWIS    GCACTCCATGCTCCACCGGAGCCCTTGTGTGTGTTTCTTTTCAGCTTGCTTCTGGGTGTT 720
BN       GCACTCCATGCTCCACCGGAGCCCTTGTGTGTGTTTCTTTTCAGCTTGCTTCTGGGTGTT 720
*****

```


DSS CCTGAGTTTGTATAGCCACCTCTCTGTGTTGGACCAGGAGACAGCTGTCGTCTCCAGC 780
LEWIS CCTGAGTTTGTATAGCCACCTCTCTGTGTTGGACCAGGAGACAGCTGTCGTCTCCAGC 780
BN CCTGAGTTTGTATAGCCACCTCTCTGTGTTGGACCAGGAGACAGCTGTCGTCTCCAGC 780

DSS ATGAGCGGGCGCGGGTGTGTCTCGGTGTCTGTGGCTGTGGTTCGGCATAAGTCTGAGCAC 840
LEWIS ATGAGCGGGCGCGGGTGTGTCTCGGTGTCTGTGGCTGTGGTTCGGCATAAGTCTGAGCAC 840
BN ATGAGCGGGCGCGGGTGTGTCTCGGTGTCTGTGGCTGTGGTTCGGCATAAGTCTGAGCAC 840

DSS GTCCCAGTCAGCAGGGTGCCTTGTGCCTGTGTGCGTGTCCGGGTGAGCTTGTCTTT 900
LEWIS GTCCCAGTCAGCAGGGTGCCTTGTGCCTGTGTGCGTGTCCGGGTGAGCTTGTCTTT 900
BN GTCCCAGTCAGCAGGGTGCCTTGTGCCTGTGTGCGTGTCCGGGTGAGCTTGTCTTT 900

DSS CTGTTCCATAAAGAAAATGCACCCACTGCCACTGGCGTCCAGAGACCTTCCAACCCGCAC 960
LEWIS CTGTTCCATAAAGAAAATGCACCCACTGCCACTGGCGTCCAGAGACCTTCCAACCCGCAC 960
BN CTGTTCCATAAAGAAAATGCACCCACTGCCACTGGCGTCCAGAGACCTTCCAACCCGCAC 960

DSS AGGTGACCTACATGAACAGGTAGCACTTCCAGACAGCGCCTGGGTGGTTGGCGGGTCGCA 1020
LEWIS AGGTGACCTACATGAACAGGTAGCACTTCCAGACAGCGCCTGGGTGGTTGGCGGGTCGCA 1020
BN AGGTGACCTACATGAACAGGTAGCACTTCCAGACAGCGCCTGGGTGGTTGGCGGGTCGCA 1020

DSS CAGCAGTCCCAGATTTCTCTCTCGGGAGCCCCAGCTAGGGTAGCTGGAAGGGAGTGGTGG 1080
LEWIS CAGCAGTCCCAGATTTCTCTCTCGGGAGCCCCAGCTAGGGTAGCTGGAAGGGAGTGGTGG 1080
BN CAGCAGTCCCAGATTTCTCTCTCGGGAGCCCCAGCTAGGGTAGCTGGAAGGGAGTGGTGG 1080

DSS CCTGGCCTCCGGGGAGCAGCTTGGGCCCGCCCGGGCCAACCCAGGAGGAGGCGGGCTA 1140
LEWIS CCTGGCCTCCGGGGAGCAGCTTGGGCCCGCCCGGGCCAACCCAGGAGGAGGCGGGCTA 1140
BN CCTGGCCTCCGGGGAGCAGCTTGGGCCCGCCCGGGCCAACCCAGGAGGAGGCGGGCTA 1140

DSS GGCAAGGAGGGTTGGCCCTTAGTGCCTCGCCCTCCGGGCATGCGACGGTGCATTGGCT 1200
LEWIS GGCAAGGAGGGTTGGCCCTTAGTGCCTCGCCCTCCGGGCATGCGACGGTGCATTGGCT 1200
BN GGCAAGGAGGGTTGGCCCTTAGTGCCTCGCCCTCCGGGCATGCGACGGTGCATTGGCT 1200

DSS CAAAGTTGCTGCACGTCACTGGGCAAGTCCCCTAAAGTCTAGTGACATAACGGGCAGGG 1260
LEWIS CAAAGTTGCTGCACGTCACTGGGCAAGTCCCCTAAAGTCTAGTGACATAACGGGCAGGG 1260
BN CAAAGTTGCTGCACGTCACTGGGCAAGTCCCCTAAAGTCTAGTGACATAACGGGCAGGG 1260

DSS TGCAGTGAAGGCTGCTTCTCCCGCCTCAGGCTGCAGCTGGCAGGCATCGCGAGCCCGG 1320
LEWIS TGCAGTGAAGGCTGCTTCTCCCGCCTCAGGCTGCAGCTGGCAGGCATCGCGAGCCCGG 1320
BN TGCAGTGAAGGCTGCTTCTCCCGCCTCAGGCTGCAGCTGGCAGGCATCGCGAGCCCGG 1320

DSS AGCAGCCACGAGCTCAGTGTGCAGGACGCGCCCCAGCACAGCCACCTACGGTCTCTGAA 1380
LEWIS AGCAGCCACGAGCTCAGTGTGCAGGACGCGCCCCAGCACAGCCACCTACGGTCTCTGAA 1380
BN AGCAGCCACGAGCTCAGTGTGCAGGACGCGCCCCAGCACAGCCACCTACGGTCTCTGAA 1380

DSS TGAAGCTTCCAGGAGTCCGCCCCGGACGGCTGCGCCCCATCGGAGGTGCACCCGCTGAG 1440
LEWIS TGAAGCTTCCAGGAGTCCGCCCCGGACGGCTGCGCCCCATCGGAGGTGCACCCGCTGAG 1440
BN TGAAGCTTCCAGGAGTCCGCCCCGGACGGCTGCGCCCCATCGGAGGTGCACCCGCTGAG 1440

DSS AGCGTCTGGGCACTGAAAGCCGGTGCCTCACCTGCCGGCCATGGAGCCACACGGGAATG 1500
LEWIS AGCGTCTGGGCACTGAAAGCCGGTGCCTCACCTGCCGGCCATGGAGCCACACGGGAATG 1500
BN AGCGTCTGGGCACTGAAAGCCGGTGCCTCACCTGCCGGCCATGGAGCCACACGGGAATG 1500

DSS ACAGCGACTTCTTGCTGGCACCCAATGGAAGCCGAGCGCCAGGCCACGACATCACTCAGG 1560
LEWIS ACAGCGACTTCTTGCTGGCACCCAATGGAAGCCGAGCGCCAGGCCACGACATCACTCAGG 1560
BN ACAGCGACTTCTTGCTGGCACCCAATGGAAGCCGAGCGCCAGGCCACGACATCACTCAGG 1560

DSS AACGGGACGAAGCGTGGGTGGTGGGCATGGCCATCCTCATGTCGGTTATCGTCTGGCCA 1620
LEWIS AACGGGACGAAGCGTGGGTGGTGGGCATGGCCATCCTCATGTCGGTTATCGTCTGGCCA 1620
BN AACGGGACGAAGCGTGGGTGGTGGGCATGGCCATCCTCATGTCGGTTATCGTCTGGCCA 1620

DSS TCGTGTTTGGCAACGTGCTGGTTCATCACAGCCATTGCCAAGTTCGAGCGACTACAAACCG 1680
LEWIS TCGTGTTTGGCAACGTGCTGGTTCATCACAGCCATTGCCAAGTTCGAGCGACTACAAACCG 1680
BN TCGTGTTTGGCAACGTGCTGGTTCATCACAGCCATTGCCAAGTTCGAGCGACTACAAACCG 1680

DSS TCACCAACTACTTCATAACCTCCTTGGCGTGTGCTGATCTAGTCATGGGCCTAGCGGTGG 1740
LEWIS TCACCAACTACTTCATAACCTCCTTGGCGTGTGCTGATCTAGTCATGGGCCTAGCGGTGG 1740
BN TCACCAACTACTTCATAACCTCCTTGGCGTGTGCTGATCTAGTCATGGGCCTAGCGGTGG 1740

DSS TGCCTTTTGGGGCCAGTCATATCCTTATGAAAATGTGGAATTTTGGCAATTTCTGGTGCG 1800
LEWIS TGCCTTTTGGGGCCAGTCATATCCTTATGAAAATGTGGAATTTTGGCAATTTCTGGTGCG 1800
BN TGCCTTTTGGGGCCAGTCATATCCTTATGAAAATGTGGAATTTTGGCAATTTCTGGTGCG 1800

DSS AGTTCGGACTTCCATTGATGTGTTGTGCGTACAGCCAGCATCGAGACCCTGTGCGTGA 1860
LEWIS AGTTCGGACTTCCATTGATGTGTTGTGCGTACAGCCAGCATCGAGACCCTGTGCGTGA 1860
BN AGTTCGGACTTCCATTGATGTGTTGTGCGTACAGCCAGCATCGAGACCCTGTGCGTGA 1860

DSS TTGCAGTGGATCGCTATGTTGCTATCACATCGCCCTTCAAGTACCAGAGCCTGCTGACCA 1920
LEWIS TTGCAGTGGATCGCTATGTTGCTATCACATCGCCCTTCAAGTACCAGAGCCTGCTGACCA 1920
BN TTGCAGTGGATCGCTATGTTGCTATCACATCGCCCTTCAAGTACCAGAGCCTGCTGACCA 1920

DSS AGAATAAGGCCCGAGTGGTCATCCTAATGGTGTGGATTGTGTGGGCCTTACCTCCTTCT 1980
LEWIS AGAATAAGGCCCGAGTGGTCATCCTAATGGTGTGGATTGTGTGGGCCTTACCTCCTTCT 1980
BN AGAATAAGGCCCGAGTGGTCATCCTAATGGTGTGGATTGTGTGGGCCTTACCTCCTTCT 1980

DSS TGCCTATCCAGATGCACTGGTACCGTGCCACCCACAAGCAAGCCATCGACTGTTATGCCA 2040
LEWIS TGCCTATCCAGATGCACTGGTACCGTGCCACCCACAAGCAAGCCATCGACTGTTATGCCA 2040
BN TGCCTATCCAGATGCACTGGTACCGTGCCACCCACAAGCAAGCCATCGACTGTTATGCCA 2040

DSS AGGAGACTTGCTGTGACTTCTTACGAACCAGGCCTATGCTATCGCTTCCTCTATCGTAT 2100
LEWIS AGGAGACTTGCTGTGACTTCTTACGAACCAGGCCTATGCTATCGCTTCCTCTATCGTAT 2100
BN AGGAGACTTGCTGTGACTTCTTACGAACCAGGCCTATGCTATCGCTTCCTCTATCGTAT 2100

DSS CTTTCTACGTGCCCTGGTGGTCATGGTCTTTGTCTATTCCAGGGTCTTCCAGGTGGCCA 2160
LEWIS CTTTCTACGTGCCCTGGTGGTCATGGTCTTTGTCTATTCCAGGGTCTTCCAGGTGGCCA 2160
BN CTTTCTACGTGCCCTGGTGGTCATGGTCTTTGTCTATTCCAGGGTCTTCCAGGTGGCCA 2160

DSS AAAGGCAGCTGCAGAAGATAGACAAAATCCGAGGGCAGATTTTCATGCCAAAACCTCAGCC 2220
LEWIS AAAGGCAGCTGCAGAAGATAGACAAAATCCGAGGGCAGATTTTCATGCCAAAACCTCAGCC 2220
BN AAAGGCAGCTGCAGAAGATAGACAAAATCCGAGGGCAGATTTTCATGCCAAAACCTCAGCC 2220

DSS AGGTGGAGCAGGATGGGAGGAGCGGGCAGGACTCCGAAGTCTCCAAGTTCTGCTTGA 2280
LEWIS AGGTGGAGCAGGATGGGAGGAGCGGGCAGGACTCCGAAGTCTCCAAGTTCTGCTTGA 2280
BN AGGTGGAGCAGGATGGGAGGAGCGGGCAGGACTCCGAAGTCTCCAAGTTCTGCTTGA 2280

DSS AAGAGCACAAAGCCCTCAAGACTTTAGGCATCATCATGGGCACCTTCACCCTCTGCTGGC 2340
LEWIS AAGAGCACAAAGCCCTCAAGACTTTAGGCATCATCATGGGCACCTTCACCCTCTGCTGGC 2340
BN AAGAGCACAAAGCCCTCAAGACTTTAGGCATCATCATGGGCACCTTCACCCTCTGCTGGC 2340

DSS TGCCTTCTTCATTGTCAATATGTCCACGTCATCCGGGCCAACCTCATCCCTAAGGAAG 2400
LEWIS TGCCTTCTTCATTGTCAATATGTCCACGTCATCCGGGCCAACCTCATCCCTAAGGAAG 2400
BN TGCCTTCTTCATTGTCAATATGTCCACGTCATCCGGGCCAACCTCATCCCTAAGGAAG 2400

DSS TTTACATCCTCCTTAACTGGTTGGGCTATGTCAACTCTGCCTTCAATCCTTATCTACT 2460
LEWIS TTTACATCCTCCTTAACTGGTTGGGCTATGTCAACTCTGCCTTCAATCCTTATCTACT 2460
BN TTTACATCCTCCTTAACTGGTTGGGCTATGTCAACTCTGCCTTCAATCCTTATCTACT 2460

DSS GTCGGAGTCCAGATTTTCAGGATTGCCTTCCAGGAGCTTCTGTGCCTTCGCCGGTCTTCTT 2520
LEWIS GTCGGAGTCCAGATTTTCAGGATTGCCTTCCAGGAGCTTCTGTGCCTTCGCCGGTCTTCTT 2520
BN GTCGGAGTCCAGATTTTCAGGATTGCCTTCCAGGAGCTTCTGTGCCTTCGCCGGTCTTCTT 2520

DSS CGAAAACCTATGGGAACGGCTACTCTAGCAACAGCAACGGTAGGACAGACTACACAGGGG 2580
LEWIS CGAAAACCTATGGGAACGGCTACTCTAGCAACAGCAACGGTAGGACAGACTACACAGGGG 2580
BN CGAAAACCTATGGGAACGGCTACTCTAGCAACAGCAACGGTAGGACAGACTACACAGGGG 2580

DSS AGCAGAGCGCATATCAGCTGGGGCAGGAGAAAGAAAATGAACTGCTTTGTGAGGAAGCCC 2640
LEWIS AGCAGAGCGCATATCAGCTGGGGCAGGAGAAAGAAAATGAACTGCTTTGTGAGGAAGCCC 2640
BN AGCAGAGCGCATATCAGCTGGGGCAGGAGAAAGAAAATGAACTGCTTTGTGAGGAAGCCC 2640

DSS CTGGCATGGAAGGCTTTGTGAAGTGTCAAGGTACTGTGCCTAGCCTTAGCATTGACTCTC 2700
LEWIS CTGGCATGGAAGGCTTTGTGAAGTGTCAAGGTACTGTGCCTAGCCTTAGCATTGACTCTC 2700
BN CTGGCATGGAAGGCTTTGTGAAGTGTCAAGGTACTGTGCCTAGCCTTAGCATTGACTCTC 2700

DSS AAGGGAGGAAGTGTAAACACAAACGACTCGCCACTG**TAGT**GTAGGCTTTCTACTCTTTAAG 2760
LEWIS AAGGGAGGAAGTGTAAACACAAACGACTCGCCACTG**TAGT**GTAGGCTTTCTACTCTTTAAG 2760
BN AAGGGAGGAAGTGTAAACACAAACGACTCGCCACTG**TAGT**GTAGGCTTTCTACTCTTTAAG 2760

DSS ACGGCCCTCCCTGACAGGACACTAACCAGACTATTTTACTTGAGTGTAAATAACTTTAGA 2820
LEWIS ACGGCCCTCCCTGACAGGACACTAACCAGACTATTTTACTTGAGTGTAAATAACTTTAGA 2820
BN ACGGCCCTCCCTGACAGGACACTAACCAGACTATTTTACTTGAGTGTAAATAACTTTAGA 2820

DSS ATAAAATGTATAGAGATTTTGCAGAAGGGGCACATCCTTCTGCCTTTTTTATTTTATTT 2880
LEWIS ATAAAATGTATAGAGATTTTGCAGAAGGGGCACATCCTTCTGCCTTTTTTATTTTATTT 2880
BN ATAAAATGTATAGAGATTTTGCAGAAGGGGCACATCCTTCTGCCTTTTTTATTTTATTT 2880

DSS TTTTAAGCTGCAAGTGAGAGAGAGAGGGGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAAAGAGAG 2940
LEWIS TTTTAAGCTGCAAGTGAGAGAGAGAGGGGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAAAGAGAG 2940
BN TTTTAAGCTGCAAGTGAGAGAGAGAGGGGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAAAGAGAG 2940

DSS AGAGAGAGACTGTATTTTCAGTGCTTAATGTTTTCCTTGTACAGTTCAGTTCCTCTTTGCA 3000
LEWIS AGAGAGAGACTGTATTTTCAGTGCTTAATGTTTTCCTTGTACAGTTCAGTTCCTCTTTGCA 3000
BN AGAGAGAGACTGTATTTTCAGTGCTTAATGTTTTCCTTGTACAGTTCAGTTCCTCTTTGCA 3000

DSS TGGAACTTAAAAGTTTCTGTCTGAAGTGTGTTGGTCTGTCTGTTTGGATGGTGTTC 3060
LEWIS TGGAACTTAAAAGTTTCTGTCTGAAGTGTGTTGGTCTGTCTGTTTGGATGGTGTTC 3060
BN TGGAACTTAAAAGTTTCTGTCTGAAGTGTGTTGGTCTGTCTGTTTGGATGGTGTTC 3060

```

DSS          TGTATCTACCTCACTGGTCAAGTATTAAGGATAATATATATATATATATTGCTGCTGGAAAT 3120
LEWIS       TGTATCTACCTCACTGGTCAAGTATTAAGGATAATATATATATATATATTGCTGCTGGAAAT 3120
BN          TGTATCTACCTCACTGGTCAAGTATTAAGGATAATATATATATATATATTGCTGCTGGAAAT 3120
*****

DSS          TCATATGTAAAGGAGAGAGTTTTCTTCCTGTACCCTTGGACTTGAATATCCTGTGTCTT 3180
LEWIS       TCATATGTAAAGGAGAGAGTTTTCTTCCTGTACCCTTGGACTTGAATATCCTGTGTCTT 3180
BN          TCATATGTAAAGGAGAGAGTTTTCTTCCTGTACCCTTGGACTTGAATATCCTGTGTCTT 3180
*****

DSS          GGACCTTTCTGCTGTGAATGTGGACTCTCTCTCACTCCACTTATTCGCTCAAATGGAGTG 3240
LEWIS       GGACCTTTCTGCTGTGAATGTGGACTCTCTCTCACTCCACTTATTCGCTCAAATGGAGTG 3240
BN          GGACCTTTCTGCTGTGAATGTGGACTCTCTCTCACTCCACTTATTCGCTCAAATGGAGTG 3240
*****

DSS          TTGTAGGCAGGGATTTGAGGGACAACATCAGTTGTTTTTCTGAGCAAAGTCTAAAGTTTA 3300
LEWIS       TTGTAGGCAGGGATTTGAGGGACAACATCAGTTGTTTTTCTGAGCAAAGTCTAAAGTTTA 3300
BN          TTGTAGGCAGGGATTTGAGGGACAACATCAGTTGTTTTTCTGAGCAAAGTCTAAAGTTTA 3300
*****

DSS          CAGTAAATAAATGTTTTGACCATGA 3325
LEWIS       CAGTAAATAAATGTTTTGACCATGA 3325
BN          CAGTAAATAAATGTTTTGACCATGA 3325
*****

```

Footnote to supplement 3: DSS, Dahl salt-sensitive rats; BN, Brown Norway rats. * denotes nucleotide identity. Initiation and termination codons are marked by bold and italic letters.

Sequences for DSS and Lewis are deposited to GenBank (#GQ160814). The BN sequence is based on

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/62750818?report=genbank&from=58174958
&to=58177000&strand=true](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/62750818?report=genbank&from=58174958&to=58177000&strand=true).

Supplement 4. Amino acid alignment of Nedd4l among DSS, Lewis and BN

```

DSS      MSSEPPRRGESRILRVKVVSGIDLAKKIDIFGASDPYVKLSLYVADENRELALVQTKTIKK 60
Lewis   MSSEPPRRGESRILRVKVVSGIDLAKKIDIFGASDPYVKLSLYVADENRELALVQTKTIKK 60
BN      MSSEPPRRGESRILRVKVVFGIDLAKKIDIFGASDPYVKLSLYVADENRELALVQTKTIKK 60
*****

DSS      TLNPKWNEEFYFRVNPSNHRLLEFVFDENRLTRDDFLGQVDVPLSHLPTEDPTMERPYTF 120
Lewis   TLNPKWNEEFYFRVNPSNHRLLEFVFDENRLTRDDFLGQVDVPLSHLPTEDPTMERPYTF 120
BN      TLNPKWNEEFYFRVNPSNHRLLEFVFDENRLTRDDFLGQVDVPLSHLPTEDPTMERPYTF 120
*****

DSS      KDFLLRPRSHKSRVKGFRLRLKMA YMPKNGGQDEENSEQRDDMEHGWEVVDNSDSASQHQE 180
Lewis   KDFLLRPRSHKSRVKGFRLRLKMA YMPKNGGQDEENSEQRDDMEHGWEVVDNSDSASQHQE 180
BN      KDFLLRPRSHKSRVKGFRLRLKMA YMPKNGGQDEENSEQRDDMEHGWEVVDNSDSASQHQE 180
*****

DSS      ELPPPLPPGWEEKVDNLGRTYVYVNHNNRSTQWHRPSLMDVSSSESDNNIRQINQEA AHR 240
Lewis   ELPPPLPPGWEEKVDNLGRTYVYVNHNNRSTQWHRPSLMDVSSSESDNNIRQINQEA AHR 240
BN      ELPPPLPPGWEEKVDNLGRTYVYVNHNNRSTQWHRPSLMDVSSSESDNNIRQINQEA AHR 240
*****

DSS      FRSRRHISEDLEPEASEGGGEGPEPWETISEEVNMAGDSLALPPPPASPVSR TSPQEL 300
Lewis   FRSRRHISEDLEPEASEGGGEGPEPWETISEEVNMAGDSLALPPPPASPVSR TSPQEL 300
BN      FRSRRHISEDLEPEASEGGGEGPEPWETISEEVNMAGDSLALPPPPASPVSR TSPQEL 300
*****

DSS      SEELSRRLQITPDSNGEQFSALIQREPSSRLRSCSVTDTVAEQAHLPPPSTPTRRARSST 360
Lewis   SEELSRRLQITPDSNGEQFSALIQREPSSRLRSCSVTDTVAEQAHLPPPSTPTRRARSST 360
BN      SEELSRRLQITPDSNGEQFSALIQREPSSRLRSCSVTDTVAEQAHLPPP----- 349
*****

DSS      VTGGEESTPSVAYVHTTPGLPSGWEERKDAKGRTYVYVNHNNRSTTWTWRPIMQLAEDGASG 420
Lewis   VTGGEESTPSVAYVHTTPGLPSGWEERKDAKGRTYVYVNHNNRSTTWTWRPIMQLAEDGASG 420
BN      -----SVAYVHTTPGLPSGWEERKDAKGRTYVYVNHNNRSTTWTWRPIMQLAEDGASG 400
*****

DSS      SATNSNNHLVEPQIRPRSLSSPTVTL S APLEGAKDSPIRRAVKDTLSNPQSPQSPYNS 480
Lewis   SATNSNNHLVEPQIRPRSLSSPTVTL S APLEGAKDSPIRRAVKDTLSNPQSPQSPYNS 480
BN      SATNSNNHLVEPQIRPRSLSSPTVTL S APLEGAKDSPIRRAVKDTLSNPQSPQSPYNS 460
*****

DSS      PKPQHKVTQSFLPPGWEMRIAPNGRPFFIDHNTKTTWEDPRLKFFVHMRSKASLNPNDL 540
Lewis   PKPQHKVTQSFLPPGWEMRIAPNGRPFFIDHNTKTTWEDPRLKFFVHMRSKASLNPNDL 540
BN      PKPQHKVTQSFLPPGWEMRIAPNGRPFFIDHNTKTTWEDPRLKFFVHMRSKASLNPNDL 520
*****

DSS      GPLPPGWEERIHLDGRTFYIDHNSKITQWEDPRLQNPAITGPAVPYSREFKQKYDYFRKK 600
Lewis   GPLPPGWEERIHLDGRTFYIDHNSKITQWEDPRLQNPAITGPAVPYSREFKQKYDYFRKK 600
BN      GPLPPGWEERIHLDGRTFYIDHNSKITQWEDPRLQNPAITGPAVPYSREFKQKYDYFRKK 580
*****

DSS      LKKPADI PNR FEMKLRNNI FEESYRRIMSVKRPDVLKARLWIEFESEKGLDYGGVAREW 660
Lewis   LKKPADI PNR FEMKLRNNI FEESYRRIMSVKRPDVLKARLWIEFESEKGLDYGGVAREW 660
BN      LKKPADI PNR FEMKLRNNI FEESYRRIMSVKRPDVLKARLWIEFESEKGLDYGGVAREW 640
*****

DSS      FFLSKEMFNPHYGLFEYSATDNYTLQINPNSGLCNEHDHLSYFTFIGRVAGLAVFHGKLL 720
Lewis   FFLSKEMFNPHYGLFEYSATDNYTLQINPNSGLCNEHDHLSYFTFIGRVAGLAVFHGKLL 720
BN      FFLSKEMFNPHYGLFEYSATDNYTLQINPNSGLCNEHDHLSYFTFIGRVAGLAVFHGKLL 700
*****

```

```

DSS      DGGFFIRPFYKMLGKQITLNDMESVDSEYYNSLKWILENDPTELDLMFCIDEENFGQTYQ 780
Lewis    DGGFFIRPFYKMLGKQITLNDMESVDSEYYNSLKWILENDPTELDLMFCIDEENFGQTYQ 780
BN       DGGFFIRPFYKMLGKQITLNDMESVDSEYYNSLKWILENDPTELDLMFCIDEENFGQTYQ 760
          *****

DSS      VDLKPNGSEIMVTNENKREYIDLVIQWRFVNRVQKQMNAFLEGFTELLPIDLIKIFDENE 840
Lewis    VDLKPNGSEIMVTNENKREYIDLVIQWRFVNRVQKQMNAFLEGFTELLPIDLIKIFDENE 840
BN       VDLKPNGSEIMVTNENKREYIDLVIQWRFVNRVQKQMNAFLEGFTELLPIDLIKIFDENE 820
          *****

DSS      LELLMCGLGDVDVNDWRQHSIYKNGYCPNHPVIQWFWKAVLLMDAEKRIRLLQFVTGTSR 900
Lewis    LELLMCGLGDVDVNDWRQHSIYKNGYCPNHPVIQWFWKAVLLMDAEKRIRLLQFVTGTSR 900
BN       LELLMCGLGDVDVNDWRQHSIYKNGYCPNHPVIQWFWKAVLLMDAEKRIRLLQFVTGTSR 880
          *****

DSS      VPMNGFAELYGSNGPQLFTIEQWGSPEKLPRAHTCFNRDLPPYETFEDLREKLLMAVEN 960
Lewis    VPMNGFAELYGSNGPQLFTIEQWGSPEKLPRAHTCFNRDLPPYETFEDLREKLLMAVEN 960
BN       VPMNGFAELYGSNGPQLFTIEQWGSPEKLPRAHTCFNRDLPPYETFEDLREKLLMAVEN 940
          *****

DSS      AQQFEGVD 968
Lewis    AQQFEGVD 968
BN       AQQFEGVD 948
          *****

```

Footnote to supplement 4: DSS, Dahl salt-sensitive rats; BN, Brown Norway rats. *

denotes amino acid identity. The BN sequence is based on

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/XM_574161.2?report=genbank. The amino acid change is indicated in bold letters.

Supplement 5. Amino acid alignment of NEDD4L among DSS, mouse and human

```

DSS      -----MSESPERRGESRILRVKVVSGIDLAKKIDIFGASDPYVKLSLYVADENRELAL 52
Mouse    -----
Human    MATGLGEPVYGLSEDEGESRILRVKVVSGIDLAKKIDIFGASDPYVKLSLYVADENRELAL 60
          *****

DSS      VQTKTIKKTILNPKWNEEFYFRVNPNSHRLLEFEVFDENRLTRDDFLGQVDVPLSHLPTEDP 112
Mouse    -----
Human    VQTKTIKKTILNPKWNEEFYFRVNPNSHRLLEFEVFDENRLTRDDFLGQVDVPLSHLPTEDP 120
          *****

DSS      TMERP YTFKDFLLRPRSHKSRVKGFRLRLK MAYMPKNGGQDEENSEQRDDMEHGWEVVD SN 172
Mouse    -MERPYTFKDFLLRPRSHKSRVKGFRLRLKMGYMPKNGGQDEENSEQRDDMEHGWEVVD SN 59
Human    TMERP YTFKDFLLRPRSHKSRVKGFRLRLK MAYMPKNGGQDEENSEQRDDMEHGWEVVD SN 180
          *****

DSS      DSASQHQEELPPPPPLPPGWEEKVDNLGRTYVYVNHNNRSTQWHRPSLMDVSSSDNNIRQI 232
Mouse    DSASQHQEELPPPPPLPPGWEEKVDNLGRTYVYVNHNNRSTQWHRPSLMDVSSSDNNIRQI 119
Human    DSASQHQEELPPPPPLPPGWEEKVDNLGRTYVYVNHNNRSTQWHRPSLMDVSSSDNNIRQI 240
          *****

DSS      NQEAARRFRSRRHISEDLEPEASEGGGEGPEPWETISEEVNMAGDSLALPPPASP V 292
Mouse    NQEAARRFRSRRHISEDLEPEASEGGGEGPEPWETISEEMNMAGDSLALPPPASP V 179
Human    NQEAARRFRSRRHISEDLEPEASEGGG-DVPEPWETISEEVNIAGDSLALPPPASP G 299
          *****

DSS      SRTSPQELSEELSRRLQITPDSNGEQFSALIQRFPSSRLRSCSVTDTVAEQAHLPPPSTP 352
Mouse    SRTSPQELSEELSRRLQITPDSNGEQFSALIQRFPSSRLRSCSVTDTVAEQAHLPPPSTP 239
Human    SRTSPQELSEELSRRLQITPDSNGEQFSALIQRFPSSRLRSCSVTDAVAEQGHLPPP-- 356
          *****

DSS      TRRARSSTVTGGEESTPSVAYVHTTPGLPSGWEERKDAKGRTYVYVNHNNRRTTWTWPIMQ 412
Mouse    TGRARSSTVTGGEESTPSVAYVHTTPGLPSGWEERKDAKGRTYVYVNHNNRRTTWTWPIMQ 299
Human    -----SVAYVHTTPGLPSGWEERKDAKGRTYVYVNHNNRRTTWTWPIMQ 399
          *****

DSS      LAEDGASGSATNSNNHLVEPQIRRPRLSLSPTVTL SAPLEGAKDSPIRRAVKDTLSNPQS 472
Mouse    LAEDGASGSATNSNNHLVEPQIRRPRLSLSPTVTL SAPLEGAKDSPIRRAVKDTLSNPQS 359
Human    LAEDGASGSATNSNNHLIEPQIRRPRLSLSPTVTL SAPLEGAKDSPVRAVKDTLSNPQS 459
          *****

DSS      PQPSPYNSPKPQHKVTQSFLPPGWEMRIAPNGRPFFIDHNTKTTT WEDPRLKFPVHMRSK 532
Mouse    PQPSPYNSPKPQHKVTQSFLPPGWEMRIAPNGRPFFIDHNTKTTT WEDPRLKFPVHMRSK 419
Human    PQPSPYNSPKPQHKVTQSFLPPGWEMRIAPNGRPFFIDHNTKTTT WEDPRLKFPVHMRSK 519
          *****

DSS      ASLNPNDLGLPLPPGWEERIHLDGRTFYIDHNSKITQWEDPRLQNP AITGPAVPYSREFKQ 592
Mouse    ASLNPNDLGLPLPPGWEERIHLDGRTFYIDHNSKITQWEDPRLQNP AITGPAVPYSREFKQ 479
Human    TSLNPNDLGLPLPPGWEERIHLDGRTFYIDHNSKITQWEDPRLQNP AITGPAVPYSREFKQ 579
          *****

DSS      KYDYFRKKLKKPADI PNRFEMKLRNNI FEESYRRIMSVKRPDVLKARLWIEFESEKGLD 652
Mouse    KYDYFRKKLKKPADI PNRFEMKLRNNI FEESYRRIMSVKRPDVLKARLWIEFESEKGLD 539
Human    KYDYFRKKLKKPADI PNRFEMKLRNNI FEESYRRIMSVKRPDVLKARLWIEFESEKGLD 639
          *****

DSS      YGGVAREWFFLLSKEMFNPHYGLFEYSATDNYTLQINPNSGLCNE DHLSYFTFIGRVAGL 712
Mouse    YGGVAREWFFLLSKEMFNPHYGLFEYSATDNYTLQINPNSGLCNE DHLSYFTFIGRVAGL 599
Human    YGGVAREWFFLLSKEMFNPHYGLFEYSATDNYTLQINPNSGLCNE DHLSYFTFIGRVAGL 699
          *****

```

```

DSS      AVFHGKLLDGGFFIRPFYKMLGKQITLNDMESVDSEYYNSLKWILENDPTELDLMFCIDE 772
Mouse    AVFHGKLLDGGFFIRPFYKMLGKQITLNDMESVDSEYYNSLKWILENDPTELDLMFCIDE 659
Human    AVFHGKLLDGGFFIRPFYKMLGKQITLNDMESVDSEYYNSLKWILENDPTELDLMFCIDE 759
*****

DSS      ENFGQTYQVDLKPNGSEIMVTNENKREYIDLVIQWRFVNRVQKQMNAFLEGFTELLPIDL 832
Mouse    ENFGQTYQVDLKPNGSEIMVTNETKREYIDLVIQWRFVDRVQKQMNAFLEGFTELLPIDL 719
Human    ENFGQTYQVDLKPNGSEIMVTNENKREYIDLVIQWRFVNRVQKQMNAFLEGFTELLPIDL 819
*****

DSS      IKIFDENELELLMCGLDVDVNDWRQHSIYKNGYCPNHPVIQWFWKAVLLMDAEKRIRLL 892
Mouse    IKIFDENELELLMCGLDVDVNDWRQHSIYKNGYCPNHPVIQWFWKAVLLMDAEKRIRLL 779
Human    IKIFDENELELLMCGLDVDVNDWRQHSIYKNGYCPNHPVIQWFWKAVLLMDAEKRIRLL 879
*****

DSS      QFVTGTSRVPMNGFAELYGSNGPQLFTIEQWGSPEKLPRAHTCFNRDLPPYETFEDLRE 952
Mouse    QFVTGTSRVPMNGFAELYGSNGPQLFTIEQWGSPEKLPRAHTCFNRDLPPYETFEDLRE 839
Human    QFVTGTSRVPMNGFAELYGSNGPQLFTIEQWGSPEKLPRAHTCFNRDLPPYETFEDLRE 939
*****

DSS      KLLMAVENAQGFEGVD 968
Mouse    KLLMAVENAQGFEGVD 855
Human    KLLMAVENAQGFEGVD 955
*****

```

Footnote to supplement 5: DSS, Dahl salt-sensitive rat. * denotes amino acid identity. : and . indicate amino acid dissimilarity. – designates an absence of an amino acid. Exon #1 encodes the first 8 amino acids for the rat (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC_005117.2/?from=61249645&to=61477088&report=genbank) and the first 16 amino acid for the human (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC_000018.8/?from=53862778&to=54216369&report=genbank) respectively. The mouse amino acids are taken from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/167466242>.

Supplement 6. Sequence comparisons of the putative 5' promoter region of Nedd4l among DSS, Lewis and BN

```

DSS      GAGATCCTATCCTTTAGGACTGAGTGAGCAAAGTCTCTCACTCTCTACACATTAT 55
Lewis   GAGATCCTATCCTTTAGGACTGAGTGAGCAAAGTCTCTCACTCTCTACACATTAT 55
BN      GAGATCCTATCCTTTAGGACTGAGTGAGCAAAGTCTCTCACTCTCTACACATTAT 55
        *****

DSS      CTAGCTGTGAGACTCATGTTAACTCCCATCTGTTATAAGAAAGGTCTGTGATAAAGGTTG 115
Lewis   CTAGCTGTGAGACTCATGTTAACTCCCATCTGTTATAAGAAAGGTCTGTGATAAAGGTTG 115
BN      CTAGCTGTGAGACTCATGTTAACTCCCATCTGTTATAAGAAAGGTCTGTGATAAAGGTTG 115
        *****

DSS      GTCAAACAAGCTCTGCTTGAAACTCTGGGTTTCAGACTCAAGGCAGTCACATCAGAGGGGC 175
Lewis   GTCAAACAAGCTCTGCTTGAAACTCTGGGTTTCAGACTCAAGGCAGTCACATCAGAGGGGC 175
BN      GTCAAACAAGCTCTGCTTGAAACTCTGGGTTTCAGACTCAAGGCAGTCACATCAGAGGGGC 175
        *****

DSS      AGTGGTAGGGGTGGGTGGTAGGTAAGCAAGGCAGGGCCAGGGTGCCGTGTGGTCCCTTGTC 235
Lewis   AGTGGTAGGGGTGGGTGGTAGGTAAGCAAGGCAGGGCCAGGGTGCCGTGTGGTCCCTTGTC 235
BN      AGTGGTAGGGGTGGGTGGTAGGTAAGCAAGGCAGGGCCAGGGTGCCGTGTGGTCCCTTGTC 235
        *****

DSS      CCAGGACTCAGTGGTTGGTTAGCTGACTTTGGGAATCCTTACTTCAAGGTCTGGTTGGAA 295
Lewis   CCAGGACTCAGTGGTTGGTTAGCTGACTTTGGGAATCCTTACTTCAAGGTCTGGTTGGAA 295
BN      CCAGGACTCAGTGGTTGGTTAGCTGACTTTGGGAATCCTTACTTCAAGGTCTGGTTGGAA 295
        *****

DSS      TTCAAACGCAAGCAGTCATTATCCATCTTTATATGTAAGTACACATGTGTGTGCAGGT 355
Lewis   TTCAAACGCAAGCAGTCATTATCCATCTTTATATGTAAGTACACATGTGTGTGCAGGT 355
BN      TTCAAACGCAAGCAGTCATTATCCATCTTTATATGTAAGTACACATGTGTGTGCAGGT 355
        *****

DSS      ACATGTGTGGAGGGCCGAGCTCCATGCAGGGTCTCTTCTTCAATAACTTTGAACCTTATC 415
Lewis   ACATGTGTGGAGGGCCGAGCTCCATGCAGGGTCTCTTCTTCAATAACTTTGAACCTTATC 415
BN      ACATGTGTGGAGGGCCGAGCTCCATGCAGGGTCTCTTCTTCAATAACTTTGAACCTTATC 415
        *****

DSS      TTTGAGACTGGGTCTCTCACTGAATGGGTTTGACTAGGATCCCCAGGAACCATCTGATC 475
Lewis   TTTGAGACTGGGTCTCTCACTGAATGGGTTTGACTAGGATCCCCAGGAACCATCTGATC 475
BN      TTTGAGACTGGGTCTCTCACTGAATGGGTTTGACTAGGATCCCCAGGAACCATCTGATC 475
        *****

DSS      TCCCCTTCAACATCACTAGGATGGCAGGCACTTGTACCCAGAGGGTTTGCTTCATTTTG 535
Lewis   TCCCCTTCAACATCACTAGGATGGCAGGCACTTGTACCCAGAGGGTTTGCTTCATTTTG 535
BN      TCCCCTTCAACATCACTAGGATGGCTGGCACTTGTACCCAGAGGGTTTGCTTCATTTTG 535
        *****

DSS      TTTTACATATGTGTTGGATACTAGGGATCCCAACTCAGGTTTTCCTGTTTACCTGAACCA 595
Lewis   TTTTACATATGTGTTGGATACTAGGGATCCCAACTCAGGTTTTCCTGTTTACCTGAACCA 595
BN      TTTTACATATGTGTTGGATACTAGGGATCCCAACTCAGGTTTTCCTGTTTACCTGAACCA 595
        *****

DSS      TCTCTCCAGTCCCTTTATACCTATTATAACGATATTATACCATTATATGATAATTACATCA 655
Lewis   TCTCTCCAGTCCCTTTATACCTATTATAACGATATTATACCATTATATGATAATTACATCA 655
BN      TCTCTCCAGTCCCTTTATACCTATTATAACGATATTATACCATTATATGATAATTACATCA 655
        *****

```

DSS TATTGCTACGATATAGCCTATTATACCATTAGAATGATAAATATTGTAAGTTCATTGTTGT 715
Lewis TATTGCTACGATATAGCCTATTATACCATTAGAATGATAAATATTGTAAGTTCATTGTTGT 715
BN TATTGCTACGATATAGCCTATTATACCATTAGAATGATAAATATTGTAAGTTCATTGTTGT 715

DSS AGAGGCTTTTAGATTTTCTCAGATGAAAATGAGTCTTGACCTCCAACCTCAAGATACC 775
Lewis AGAGGCTTTTAGATTTTCTCAGATGAAAATGAGTCTTGACCTCCAACCTCAAGATACC 775
BN AGAGGCTTTTAGATTTTCTCAGATGAAAATGAGTCTTGACCTCCAACCTCAAGATACC 775

DSS TTTTATACTTATCTATGACTTAAAAGATCTTTCAGTGTGTGTATGTGTATGCATGTAT 835
Lewis TTTTATACTTATCTATGACTTAAAAGATCTTTCAGTGTGTGTATGTGTATGCATGTAT 835
BN TTTTATACTTATCTATGACTTAAAAGATCTTTCAGTGTGTGTATGTGTATGCATGTAT 835

DSS GTGAGTGCATGTATGTGTGAGTGTACGTGTGCATGTGTGTATATGCAGAAAAAGGAGT 895
Lewis GTGAGTGCATGTATGTGTGAGTGTACGTGTGCATGTGTGTATATGCAGAAAAAGGAGT 895
BN GTGAGTGCATGTATGTGTGAGTGTACGTGTGCATGTGTGTATATGCAGAAAAAGGAGT 895

DSS GTATGTGTATTTGTATATGAGGGGGAACATGCATATGTGTACCACACATAGTACACATGT 955
Lewis GTATGTGTATTTGTATATGAGGGGGAACATGCATATGTGTACCACACATAGTACACATGT 955
BN GTATGTGTATTTGTATATGAGGGGGAACATGCATATGTGTACCACACATAGTACACATGT 955

DSS GAAGATCAGAGAACAGCCTTTGAAAGTGGCTTTGAAAACACCGCATGCACGTGCTAGTTC 1015
Lewis GAAGATCAGAGAACAGCCTTTGAAAGTGGCTTTGAAAACACCGCATGCACGTGCTAGTTC 1015
BN GAAGATCAGAGAACAGCCTTTGAAAGTGGCTTTGAAAACACCGCATGCACGTGCTAGTTC 1015

DSS TTCTGGAGCTCCTGGGATTCTGTGTCCACCTTCCATGCTTCGTAGGAGCACTGTGGTTAC 1075
Lewis TTCTGGAGCTCCTGGGATTCTGTGTCCACCTTCCATGCTTCGTAGGAGCACTGTGGTTAC 1075
BN TTCTGGAGCTCCTGGGATTCTGTGTCCACCTTCCATGCTTCGTAGGAGCACTGTGGTTAC 1075

DSS AGACTCCGTGCCTGGGCTCCGAGGGTCTGAACTGAGGTCCCTCGCATTTGATATGTGTGGC 1135
Lewis AGACTCCGTGCCTGGGCTCCGAGGGTCTGAACTGAGGTCCCTCGCATTTGATATGTGTGGC 1135
BN AGACTCCGTGCCTGGGCTCCGAGGGTCTGAACTGAGGTCCCTCGCATTTGATATGTGTGGC 1135

DSS AAGCGTGCTCACTGTGCTTTCTCCCATCCTCCTAAGATTGCTTTTTTTAGGACAGAT 1195
Lewis AAGCGTGCTCACTGTGCTTTCTCCCATCCTCCTAAGATTGCTTTTTTTAGGACAGAT 1195
BN AAGCGTGCTCACTGTGCTTTCTCCCATCCTCCTAAGATTGCTTTTTTTAGGACAGAT 1195

DSS TCATAAATGAGATTCTGTTGAGTAGATCATATGAATGACATTTTAGGGGATTTAGAGACA 1255
Lewis TCATAAATGAGATTCTGTTGAGTAGATCATATGAATGACATTTTAGGGGATTTAGAGACA 1255
BN TCATAAATGAGATTCTGTTGAGTAGATCATATGAATGACATTTTAGGGGATTTAGAGACA 1255

DSS CTAATCCTTTTAGCAAGCGTCTGCTGGGCTGTGACTTCCTGTATTATGAGGGCTCATGGG 1315
Lewis CTAATCCTTTTAGCAAGCGTCTGCTGGGCTGTGACTTCCTGTATTATGAGGGCTCATGGG 1315
BN CTAATCCTTTTAGCAAGCGTCTGCTGGGCTGTGACTTCCTGTATTATGAGGGCTCATGGG 1315

DSS AGGTGCTCCCAGAAGCAGGGAAAGGCCGGCTGCAGGGCAGGTTGACCTCAGTATCTTCCT 1375
Lewis AGGTGCTCCCAGAAGCAGGGAAAGGCCGGCTGCAGGGCAGGTTGACCTCAGTATCTTCCT 1375
BN AGGTGCTCCCAGAAGCAGGGAAAGGCCGGCTGCAGGGCAGGTTGACCTCAGTATCTTCCT 1375

DSS TGTAGATTTAGGTCAGGTGCTCACATTCACCTAAGGGGAGGACCTGATTTCTCCAGAAAA 1435
Lewis TGTAGATTTAGGTCAGGTGCTCACATTCACCTAAGGGGAGGACCTGATTTCTCCAGAAAA 1435
BN TGTAGATTTAGGTCAGGTGCTCACATTCACCTAAGGGGAGGACCTGATTTCTCCAGAAAA 1435

```

DSS      GTCTAGCTTTCTCTTTATTTTCAGTTTATTTTTCATCATTTACCTATATGTGAGTGTTGCC 1495
Lewis    GTCTAGCTTTCTCTTTATTTTCAGTTTATTTTTCATCATTTACCTATATGTGAGTGTTGCC 1495
BN       GTCTAGCTTTCTCTTTATTTTCAGTTTATTTTTCATCATTTACCTATATGTGAGTGTTGCC 1495
*****

DSS      TGATTTTGGCTTAATTTGGGAAATGGGCCACCCAGGTAAGACCATTTCGCTCGGTGGGAAC 1555
Lewis    TGATTTTGGCTTAATTTGGGAAATGGGCCACCCAGGTAAGACCATTTCGCTCGGTGGGAAC 1555
BN       TGATTTTGGCTTAATTTGGGAAATGGGCCACCCAGGTAAGACCATTTCGCTCGGTGGGAAC 1555
*****

DSS      GCAAATACTTGGAAACCCGGGTGTGAACTAGCCTCATCCTGTTTGCTTCTCCAGACCGCAT 1615
Lewis    GCAAATACTTGGAAACCCGGGTGTGAACTAGCCTCATCCTGTTTGCTTCTCCAGACCGCAT 1615
BN       GCAAATACTTGGAAACCCGGGTGTGAACTAGCCTCATCCTGTTTGCTTCTCCAGACCGCAT 1615
*****

DSS      AACAGTTTGGTCGAGGTCCTAACAAATTATCTTTGCTGGGCAGGACTCGGGATGTCTGAG 1675
Lewis    AACAGTTTGGTCGAGGTCCTAACAAATTATCTTTGCTGGGCAGGACTCGGGATGTCTGAG 1675
BN       AACAGTTTGGTCGAGGTCCTAACAAATTATCTTTGCTGGGCAGGACTCGGGATGTCTGAG 1675
*****

```

Footnote to supplement 6: DSS, Dahl salt-sensitive rats; BN, Brown Norway rats. *

denotes nucleotide identity and : indicates a difference. The ATG start codon is highlighted in bold letters. Sequences from DSS and Lewis are generated from the current work with the GenBank accession number GQ160817. The BN sequence is based on (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC_005117.2/?from=61249645&to=61477088&report=genbank).

Supplement 7. Comparison of renal gene expressions of *Adrb2* and *Nedd4l* by qRT-PCR

Genes	Mean R	Ratio of mean R Lewis/ mean R DSS	<i>p</i>
<i>Adrb2</i>	0.005 ± 0.001 (Lewis)/ 0.009 ± 0.006 [1]	0.568	0.37
<i>Nedd4l</i>	0.009 ± 0.001 (Lewis)/ 0.012 ± 0.004 [1]	0.752	0.60

Footnote to Supplement 7: R represents the ratio of the expression of the gene target relative to that of the *Gapdh* reference. R is the average value of triplicates from 1 rat. Mean R is the average value of R from 3 rats of the same strain. DSS, Dahl salt-sensitive rats. ± refers to SEM. *P*, *t*-test.

Discussion

9. Les QTL du chromosome 18 chez le rat

Des études récentes au sein de notre laboratoire ont démontré l'existence chez le rat de non un, comme il avait été montré auparavant par analyse de liaison [67], mais de trois QTL au niveau du chromosome 18 grâce à l'approche d'identification de QTL par construction de lignées congéniques [73]. On remarque ainsi que cette approche est un outil plus puissant dans l'étude de maladies complexes dont l'hypertension fait partie.

9.1 Cartographie fine des C18QTL1, C18QTL3 et C18QTL4:

Au cours de la réalisation de ce projet de recherche, la région dans la quelle le C18QTL1 avait été défini chez les souches C18S.L4, C18S.L5, C18S.L7 et C18S.L8 [73] a été réduite grâce à la construction de deux nouvelles sous-souches; C18S.L15 et C18S.L16. En effet, la nouvelle cartographie du C18QTL1 résulte de son positionnement dans le segment délimité par la région où il n'y a pas de chevauchement entre les souches C18S.L15 et C18S.L18. Ceci est dû au fait que la première de ces souches montre une différence significative de PA par rapport à DSS, tandis que chez la deuxième cette différence de PA n'est pas détectée. Cependant, cette cartographie du C18QTL1 est provisoire étant donné que pour pouvoir délimiter ce QTL, il faudrait créer une souche ne contenant que cette région et dont la PA serait significativement différente de celle de DSS.

La région qu'on pensait contenir le C18QTL3[73] contient en fait deux QTL distincts : le nouveau C18QTL3 et C18QTL4. Ces deux QTL ont été déterminés par la construction des nouvelles sous-souches congéniques C18S.L14 et C18S.L10, respectivement. La comparaison des mesures de PA entre ces souches par rapport à celles de la souche DSS démontrent que chacune de ces lignées contient un QTL ayant un effet indépendant et direct sur la PA.

Il est à noter qu'il existe une interaction épistatique entre C18QTL3 et C18QTL4. En effet, l'action indépendante de chacun de ces QTL sur la PA des souches C18S.L14 et

C18S.L10, respectivement, est très similaire à l'action combinée des deux QTL présents chez C18S.L2 (*cf.* Figure 1 de la publication scientifique, section 8, p.65)

Le C18QTL4 s'étale sur une région de presque 17 Mb et contient 85 gènes. Séquencer et analyser un nombre aussi grand de gènes se révèle être difficile et il faudra donc essayer de réduire cette région afin d'identifier le ou les gène(s) responsables de la différence du phénotype observé.

Bien que la région C18QTL3 contienne presque 70 gènes, on trouve deux gènes, *Adrb2* et *Nedd4l*, qui pourraient être de bons candidats étant donné leur fonction physiologique et leur association avec l'hypertension. Ainsi, notre étude s'est concentrée sur l'analyse de ces deux gènes.

10. Analyse des gènes candidats du C18QTL3

10.1 Le gène *Adrb2* :

Comme il en a été discuté, les récepteurs β -adrénergiques jouent un rôle majeur dans la régulation de la PA. Ainsi, la présence du gène *Adrb2* au niveau du C18QTL3 en fait un très bon candidat. Chez, l'humain, des études de population on démontré l'association de ce gène avec l'hypertension surtout marquée par la présence de SNP qui causent des différences en acides aminés au niveau de la protéine [8, 74, 78, 79, 93-96]. Parmi ces substitutions on trouve Arg16Gly qui affecte la désensibilisation du récepteur. Cependant, on ne sait pas si ces polymorphismes ont un effet direct sur la PA. Ainsi, nous avons décidé de séquencer ce gène chez les deux souches contrastantes DSS et Lewis en vue de chercher des mutations qui pourraient expliquer la différence au niveau du phénotype observé.

Le séquençage de ce gène ne montre aucune différence au niveau de sa région codante ni au niveau de sa région promotrice, établie à 1.1 Kb en amont du codon d'initiation [97, 98], entre les souches DSS et Lewis. Des analyses d'expression par *qRT-PCR* au niveau des reins on donc été effectuées. Cependant, aucune différence de niveau d'expression du gène entre les souches contrastantes n'a été détectée. Ainsi, on conclue que *Adrb2* n'est pas le gène responsable du QTL.

Il est à noter que le niveau d'expression de *Adrb2* a été étudié uniquement dans les reins. Il faudrait donc l'analyser au niveau d'autres organes, tels le cœur et le cerveau par exemple, pour pouvoir conclure que ce n'est pas une différence dans le niveau d'expression de ce gène qui est responsable de la différence de PA observée.

Plus encore, il faudrait séquencer le gène *Adrb2* dans d'autres souches afin de chercher s'il existe des différences qui, comme Arg16Gly, pourraient l'associer avec l'hypertension.

10.2 Le gène *Nedd4l* :

Comme il a déjà été dit, le gène *Nedd4l* est associé à l'hypertension essentielle car il régule la réabsorption de sodium par les reins en contrôlant les ENaC. De plus, il a été montré que son absence cause l'hypertension [99-101].

Nedd4l fait partie de la famille des *Nedd4* qui sont des ubiquitines ligases de type E3 contenant un domaine C2 responsable de leur ciblage à la membrane, plusieurs domaines WW (motifs tryptophane) responsables de leur liaison aux motifs PY des ENaC et un domaine ubiquitine ligase HECT.

L'association de *Nedd4l* aux ENaC induit l'ubiquitination des canaux et leur dégradation subséquente au niveau des lysosomes. Cependant, il a été montré que des mutations au niveau des motifs PY de ENaC empêchent la liaison de *Nedd4l* et entraînent l'hypertension. Il est donc possible de penser que des mutations au niveau du/des domaine/domaines WW de *Nedd4l* puissent être à la base du développement de la maladie [86, 87, 102].

Des études de population chez l'humain ont permis de déceler différents polymorphismes au niveau de *Nedd4l* qui font de ce gène un candidat pour l'hypertension. Parmi ces substitutions on retrouve G/A au niveau de l'exon 1 du gène dont l'allèle A introduit un site d'épissage alternatif qui donne une protéine dont le domaine C2 est altéré. Les individus possédant l'allèle G démontrent une pression artérielle supérieure à celle des individus possédant l'allèle A [90].

La régulation de l'action de *Nedd4l* sur le ENaC (figure 6) se fait par l'intermédiaire, entre autres, de la phosphorylation de cette protéine. Les kinases responsables sont notamment la PKA activée par la vasopressine et la protéine SGK1. En effet, l'activation de SGK1 par intermédiaire de l'aldostérone joue un rôle crucial sur la régulation des ENaC; SGK1 active les canaux sodium en les phosphorylant tandis que la phosphorylation de *Nedd4l* par cette même kinase inactive son action régulatrice [103-105].

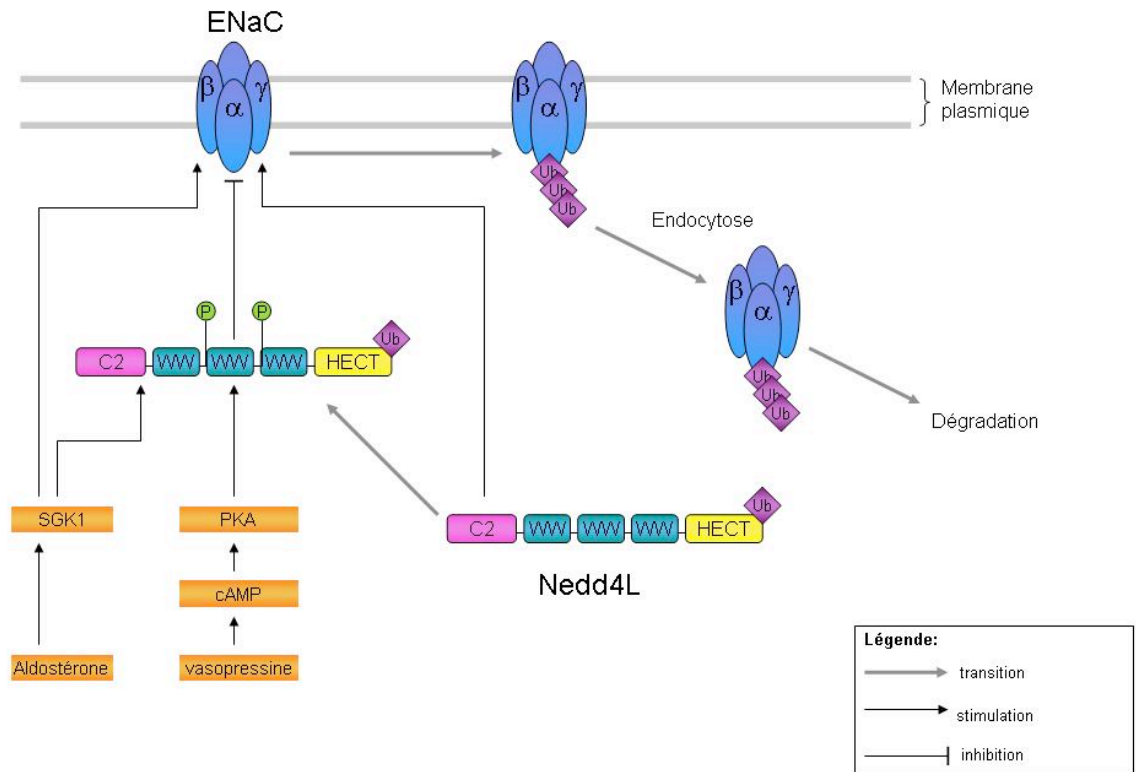


Figure 6. Régulation de ENaC par Nedd4L. SGK1 active ENaC. La phosphorylation de Nedd4l par SGK1 et PKA empêche la liaison de ce dernier à ENaC et donc son ubiquitination. L'ubiquitination de ENaC par Nedd4l entraîne son endocytose et sa dégradation. Figure adaptée de Rotin [86].

Ainsi, le séquençage du gène *Nedd4l* chez les souches DSS et Lewis nous permettrait de voir s'il existe des différences qui pourraient, par les modifications qu'elles causeraient sur la protéine, altérer des sites essentiels à la régulation des ENaC et donc de la PA.

Le séquençage de ce gène montre la présence de trois mutations silencieuses au niveau de la séquence codante : T321A, C1995T et G2139A. Il existe aussi des différences de deux nucléotides au niveau de l'intron 3 entre DSS et Lewis, qui ne seraient pourtant

pas susceptibles d'influencer l'épissage du ARNm puisqu'elles ne sont pas au niveau du motif de jonction exon/intron [106].

Ainsi, aucune différence significative entre les séquences de *Nedd4l* chez DSS et Lewis n'est détectée. Ceci est valable tant pour la région codante du gène que pour sa région promotrice. En effet, étant donné que la séquence de *Nedd4l* trouvée dans la littérature sur laquelle on s'est basés pour concevoir les amorces a été dérivée par informatique et que la région promotrice de ce gène n'est pas encore répertoriée, nous avons séquencé une section de 1666 pb en amont du premier nucléotide de l'exon 1.

Par ailleurs, des études antérieures ont montré une différence de PA entre les souches DSS et BN associée au chromosome 18 [107] et il s'avère qu'une mutation au niveau de la séquence codante du gène *Nedd4l* entre ces deux souches entraîne un changement en acide aminé. Il s'agit de la substitution Ser20Phe qui pourrait, chez la souche DSS se traduire par la perte d'un site de phosphorylation de Nedd4l pouvant influencer la régulation des ENaC, et donc la réabsorption du sodium, par cette protéine. Il conviendrait donc de créer une souche congénique DSS/BN pour effectuer des analyses physiologiques plus approfondies et étudier ainsi l'effet de cette mutation sur la PA.

Les résultats de séquençage sur le cDNA du rein chez le rat de *Nedd4l* montrent qu'il existe un exon long de 60 pb (nucléotides 1047 à 1107 dans la séquence réelle) dont la séquence du cDNA de BN dérivée par informatique ne tenait pas compte.

Il est aussi à noter que les analyses de *q*RT-PCR ne montrent aucune différence dans le niveau d'expression de ce gène entre les deux souches au niveau du rein.

Par conséquent, le bilan des résultats discutés ci-dessus nous mène à exclure *Nedd4l* comme gène responsable du QTL.

10.3 Perspectives :

Bien que le bilan des résultats obtenus nous mène à conclure que les gènes étudiés ne sont pas responsables de la variation de PA observée chez les deux souches, il faut noter que leur exclusion peut ne pas être définitive. En effet, le niveau d'expression des protéines encodées par ces deux gènes n'a pas été analysé. Il faut garder en tête que le niveau d'expression du gène n'est pas toujours représentatif du niveau d'expression de la protéine puisqu'il faut prendre en compte la régulation traductionnelle des ARNm et post-traductionnelle des protéines. Une étude plus approfondie serait nécessaire dans ce cas, comme par exemple des analyses de *Western blot*.

Si les analyses protéiques ne révèlent pas de différences qui pourraient expliquer la variation du phénotype entre DSS et Lewis, il faudra, tout d'abord, réduire l'intervalle de la région QTL pour ensuite analyser les gènes contenus dans cette nouvelle région et finalement séquencer les gènes qu'elle contient.

Il est intéressant de noter que la majorité des gènes contenus dans la région C18QTL3 ont une fonction inconnue ou n'ont pas de lien connu avec la régulation de la PA et qu'il serait très intéressant de trouver des différences qui les associeraient avec l'hypertension. Ceci permettrait de découvrir de nouvelles cibles pour le traitement de cette maladie.

Cependant, parmi les soixante sept gènes présents dans C18QTL3 (excluant *Nedd4l* et *Adrb2*), il y en a un qui est particulièrement intéressant. Il s'agit du gène *Arsi* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/114145558?report=genbank>) qui fait partie de la famille des arylsulfatases I. Le gène *ARSG*, appartenant à cette même famille, a été récemment associé avec l'hypertension chez l'humain [108].

Les arylsulfatases sont des enzymes qui catalysent l'hydrolyse des liens ester-sulfate de nombreux substrats dont les stéroïdes et sont impliquées dans le métabolisme des catécholamines. Des défauts dans ces enzymes causent notamment des désordres de

stockage au niveau des lysosomes [109-111]. Plus encore, il a été stipulé qu'une altération de l'équilibre, assuré par les sulfatases, de sulfoconjugaison-déconjugaison des catécholamines pourrait être associée à l'hypertension essentielle [112].

Ainsi, l'analyse du gène *Arsi* semble prometteuse et devrait être entamée le plus tôt possible.

Conclusion

La réalisation de ce projet a permis de réduire les intervalles contenant les anciens C18QTL 1 et C18QTL3 chez le rat. Ainsi, il a été déterminé qu'en réalité, il existe deux QTL distinct dans la région C18QTL3 déterminée dans l'étude de 2005. Il s'agit des C18QTL3 et C18QTL4 qui contiennent 69 et 85 gènes respectivement.

L'analyse des gènes *Adrb2* et *Nedd4l*, associés à l'hypertension chez l'humain dans des études de population, ne montre pas de différences significatives entre les souches DSS et Lewis qui puissent mener à conclure qu'ils sont responsables de la variation du phénotype entre les deux lignées. Cependant, des analyses plus poussées doivent être faites pour pouvoir exclure ces gènes. De même, la création d'une souche congénique DSS/BN serait souhaitable en vue d'étudier l'effet physiologique de la mutation Ser20Phe au niveau de la protéine encodée par *Nedd4l*.

Aussi, il serait intéressant d'étudier le gène *Arsi*, contenu dans la C18QTL3 dont la fonction peut être en lien avec le développement de l'hypertension.

Plus encore, il est nécessaire de créer des sous-souches congéniques en vue de raffiner la cartographie des QTL du chromosome 18 et de réduire ainsi le nombre de gènes à analyser.

La découverte de nouveaux gènes qui contribuent à la régulation de la pression artérielle et l'étude de leur fonction permettront de mieux comprendre l'étiologie de l'hypertension et mèneront à la découverte de nouvelles cibles thérapeutiques et de diagnostique de cette maladie.

Bibliographie

1. Wang, Y., et al., *Current views on the function of the lymphatic vasculature in health and disease*. Genes Dev, 2010. **24**(19):2115-26.
2. Lifton, R.P., A.G. Gharavi, and D.S. Geller, *Molecular mechanisms of human hypertension*. Cell, 2001. **104**(4): 545-56.
3. Boron, W.F. and E.L. Boulpaep, *Medical physiology : a cellular and molecular approach*. Updated ed. 2005, Philadelphia, Pa.: Elsevier Saunders. xiii, 1319
4. Quinn, R.R., et al., *The 2010 Canadian Hypertension Education Program recommendations for the management of hypertension: part I - blood pressure measurement, diagnosis and assessment of risk*. Can J Cardiol. **26**(5): 241-8.
5. Campese, V.M., *Neurogenic factors and hypertension in chronic renal failure*. J Nephrol, 1997. **10**(4): 184-7.
6. Szczepanska-Sadowska, E., *Neuropeptides in neurogenic disorders of the cardiovascular control*. J Physiol Pharmacol, 2006. **57 Suppl 11**: 31-53.
7. Sladek, C.D. and Z. Song, *Regulation of vasopressin release by co-released neurotransmitters: mechanisms of purinergic and adrenergic synergism*. Prog Brain Res, 2008. **170**: 93-107.
8. Estanol, B., et al., *Neural control of the peripheral circulation and blood pressure*. Arch Cardiol Mex, 2009. **79 Suppl 2**: 109-16.
9. Berg, T., et al., *Role of beta1-3-adrenoceptors in blood pressure control at rest and during tyramine-induced norepinephrine release in spontaneously hypertensive rats*. Hypertension, 2010. **55**(5): 1224-30.
10. Wallin, B.G. and N. Charkoudian, *Sympathetic neural control of integrated cardiovascular function: insights from measurement of human sympathetic nerve activity*. Muscle Nerve, 2007. **36**(5): 595-614.
11. Zanutto, B.S., et al., *Neural set point for the control of arterial pressure: role of the nucleus tractus solitarius*. Biomed Eng Online, 2010 **9**: 4-17.
12. Haberland, G.L., *The role of kininogenases, kinin formation and kininogenase inhibition in post traumatic shock and related conditions*. Klin Wochenschr, 1978. **56**(7): 325-31.

13. Jiang, S., et al., *Effects of protein coding polymorphisms in the kallikrein 1 gene on baseline blood pressure and antihypertensive response to irbesartan in Chinese hypertensive patients.* J Hum Hypertens., 2010. **1**:1-7
14. Brands, M.W. and J.P. Granger, *Control of renal function and blood pressure by angiotensin II: implications for diabetic glomerular injury.* Miner Electrolyte Metab, 1998. **24**(6): 371-80.
15. Dietze, G.J. and E.J. Henriksen, *Angiotensin-converting enzyme in skeletal muscle: sentinel of blood pressure control and glucose homeostasis.* J Renin Angiotensin Aldosterone Syst, 2008. **9**(2): 75-88.
16. Touyz, R.M., *Molecular and cellular mechanisms regulating vascular function and structure--implications in the pathogenesis of hypertension.* Can J Cardiol, 2000. **16**(9): 1137-46.
17. Kaschina, E. and T. Unger, *Angiotensin AT1/AT2 receptors: regulation, signalling and function.* Blood Press, 2003. **12**(2): 70-88.
18. Good, D.W., *Nongenomic actions of aldosterone on the renal tubule.* Hypertension, 2007. **49**(4): 728-39.
19. Wang, X., et al., *The regulation of proximal tubular salt transport in hypertension: an update.* Curr Opin Nephrol Hypertens, 2009. **18**(5): 412-20.
20. Rapp, J.P., *A paradigm for identification of primary genetic causes of hypertension in rats.* Hypertension, 1983. **5**(2 Pt 2): I198-203.
21. Tanira, M.O. and K.A. Al Balushi, *Genetic variations related to hypertension: a review.* J Hum Hypertens, 2005. **19**(1): 7-19.
22. Hamet, P., et al., *Hypertension: genes and environment.* J Hypertens, 1998. **16**(4): 397-418.
23. Luft, F.C., *Molecular genetics of human hypertension.* J Hypertens, 1998. **16**(12 Pt 2): 1871-8.
24. San-Cristobal, P., et al., *WNK kinases, renal ion transport and hypertension.* Am J Nephrol, 2008. **28**(5): 860-70.
25. Luft, F.C., *Mendelian forms of human hypertension and mechanisms of disease.* Clin Med Res, 2003. **1**(4): 291-300.

26. Harrison, M., K. Maresso, and U. Broeckel, *Genetic determinants of hypertension: an update*. *Curr Hypertens Rep*, 2008. **10**(6): 488-95.
27. Rossier, B.C. and L. Schild, *Epithelial sodium channel: mendelian versus essential hypertension*. *Hypertension*, 2008. **52**(4): 595-600.
28. Bertog, M., et al., *Aldosterone responsiveness of the epithelial sodium channel (ENaC) in colon is increased in a mouse model for Liddle's syndrome*. *J Physiol*, 2008. **586**(2): 459-75.
29. Biron, P., J.G. Mongeau, and D. Bertrand, *Familial aggregation of blood pressure in 558 adopted children*. *Can Med Assoc J*, 1976. **115**(8): 773-4.
30. Spiro, A., 3rd, et al., *Personality and the incidence of hypertension among older men: longitudinal findings from the Normative Aging Study*. *Health Psychol*, 1995. **14**(6): 563-9.
31. Mongeau, J.G., P. Biron, and C.F. Sing, *The influence of genetics and household environment upon the variability of normal blood pressure: the Montreal Adoption Survey*. *Clin Exp Hypertens A*, 1986. **8**(4-5): 653-60.
32. Hamet, P., *Environmental stress and genes of hypertension*. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 1995. **22**(12): 394-8.
33. Burt, V.L., et al., *Trends in the prevalence, awareness, treatment, and control of hypertension in the adult US population. Data from the health examination surveys, 1960 to 1991*. *Hypertension*, 1995. **26**(1): 60-9.
34. Hou, R., et al., *The circadian rhythm of blood pressure and the effect of salt intake in salt-sensitive subjects*. *Chin Med J (Engl)*, 2000. **113**(1): 22-6.
35. Fujita, T., *Mineralocorticoid receptors, salt-sensitive hypertension, and metabolic syndrome*. *Hypertension*, 2010. **55**(4): 813-8.
36. Wamala, J.F., et al., *Prevalence factors associated with hypertension in Rukungiri district, Uganda--a community-based study*. *Afr Health Sci*, 2009. **9**(3): 153-60.
37. Viridis, A., et al., *Cigarette Smoking and Hypertension*. *Curr Pharm Des*, 2010. **16**(23): 2518-25.
38. Rapp, J.P., *Genetic analysis of inherited hypertension in the rat*. *Physiol Rev*, 2000. **80**(1): 135-72.

39. McBride, M.W., et al., *Functional genomics in rodent models of hypertension*. J Physiol, 2004. **554**(Pt 1): 56-63.
40. Cowley, A.W., Jr., *The genetic dissection of essential hypertension*. Nat Rev Genet, 2006. **7**(11): 829-40.
41. Stark, O. and V. Kren, *Five congenic resistant lines of rats differing at the Rt H-1 locus*. Transplantation, 1969. **8**(2): 200-3.
42. Smirk, F.H. and W.H. Hall, *Inherited hypertension in rats*. Nature, 1958. **182**(4637): 727-8.
43. Dahl, L.K., M. Heine, and L. Tassinari, *Effects of chronic excess salt ingestion. Evidence that genetic factors play an important role in susceptibility to experimental hypertension*. J Exp Med, 1962. **115**: 1173-90.
44. Dahl, L.K., M. Heine, and L. Tassinari, *Role of genetic factors in susceptibility to experimental hypertension due to chronic excess salt ingestion*. Nature, 1962. **194**: 480-2.
45. Okamoto, K. and K. Aoki, *Development of a strain of spontaneously hypertensive rats*. Jpn Circ J, 1963. **27**: 282-93.
46. Yamori, Y., et al., *Proceedings: Developmental course of hypertension in the SHR-substrains susceptible to hypertensive cerebrovascular lesions*. Jpn Heart J, 1974. **15**(2): 209-10.
47. Ben-Ishay, D., R. Saliternik, and A. Welner, *Separation of two strains of rats with inbred dissimilar sensitivity to Doca-salt hypertension*. Experientia, 1972. **28**(11): 1321-2.
48. Dupont, J., et al., *Selection of three strains of rats with spontaneously different levels of blood pressure*. Biomedicine, 1973. **19**(1): 36-41.
49. Bianchi, G., U. Fox, and E. Imbasciati, *The development of a new strain of spontaneously hypertensive rats*. Life Sci, 1974. **14**(2): 339-47.
50. Kuijpers, M.H. and E. Gruys, *Spontaneous hypertension and hypertensive renal disease in the fawn-hooded rat*. Br J Exp Pathol, 1984. **65**(2): 181-90.
51. Heller, J., et al., *The Prague Hypertensive Rat: a new model of genetic hypertension*. Clin Exp Hypertens, 1993. **15**(5): 807-18.

52. Belledonne, M., J.M. Preuss, and H.G. Preuss, *Acid excretion in young and adult Wistar Kyoto and spontaneously hypertensive rats*. *Experientia*, 1979. **35**(12): 1594-5.
53. Deng, A.Y., *In search of hypertension genes in Dahl salt-sensitive rats*. *J Hypertens*, 1998. **16**(12 Pt 1): 1707-17.
54. Mark, A.L., et al., *Cardiac sensory receptors in Dahl salt-resistant and salt-sensitive rats*. *Circulation*, 1987. **75**(1 Pt 2): 137-40.
55. Deng, A.Y., *Genetic basis of polygenic hypertension*. *Hum Mol Genet*, 2007. **16 Spec No. 2**: 195-202.
56. Altshuler, D., M.J. Daly, and E.S. Lander, *Genetic mapping in human disease*. *Science*, 2008. **322**(5903): 881-8.
57. Duong, C., et al., *Individual QTLs controlling quantitative variation in blood pressure inherited in a Mendelian mode*. *Heredity*, 2007. **98**(3): 165-71.
58. Charron, S., et al., *Epistasis, not numbers, regulates functions of clustered Dahl rat quantitative trait loci applicable to human hypertension*. *Hypertension*, 2005. **46**(6): 1300-8.
59. Deng, A.Y., *Positional cloning of quantitative trait Loci for blood pressure: how close are we?: a critical perspective*. *Hypertension*, 2007. **49**(4): 740-7.
60. Deng, A.Y., et al., *Linkage mapping of rat chromosome markers generated from chromosome-sorted DNA*. *Mamm Genome*, 1998. **9**(1): 38-43.
61. Lander, E.S. and N.J. Schork, *Genetic dissection of complex traits*. *Science*, 1994. **265**(5181): 2037-48.
62. Levy, D., et al., *Genome-wide association study of blood pressure and hypertension*. *Nat Genet*, 2009. **41**(6): 677-87.
63. Weber, J.L. and P.E. May, *Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction*. *Am J Hum Genet*, 1989. **44**(3): 388-96.
64. Botstein, D. and N. Risch, *Discovering genotypes underlying human phenotypes: past successes for mendelian disease, future approaches for complex disease*. *Nat Genet*, 2003. **33 Suppl**: 228-37.

65. Deng, A.Y. and J.P. Rapp, *Mapping of selective rat chromosome regions using mouse microsatellite markers*. Folia Biol (Praha), 1997. **43**(5): 183-93.
66. Nabika, T., Y. Kobayashi, and Y. Yamori, *Congenic rats for hypertension: how useful are they for the hunting of hypertension genes?* Clin Exp Pharmacol Physiol, 2000. **27**(4): 251-6.
67. Garrett, M.R., et al., *Genome scan and congenic strains for blood pressure QTL using Dahl salt-sensitive rats*. Genome Res, 1998. **8**(7): 711-23.
68. Rapp, J.P. and A.Y. Deng, *Detection and positional cloning of blood pressure quantitative trait loci: is it possible? Identifying the genes for genetic hypertension*. Hypertension, 1995. **25**(6): 1121-8.
69. Deng, A.Y., J. Dutil, and Z. Sivo, *Utilization of marker-assisted congenics to map two blood pressure quantitative trait loci in Dahl rats*. Mamm Genome, 2001. **12**(8): 612-6.
70. Sivo, Z., et al., *Accelerated congenics for mapping two blood pressure quantitative trait loci on chromosome 10 of Dahl rats*. J Hypertens, 2002. **20**(1): 45-53.
71. Chauvet, C., et al., *Submegabase resolution of epistatically interacting quantitative trait loci for blood pressure applicable for essential hypertension*. J Hypertens, 2008. **26**(5): 893-901.
72. Kato, N., et al., *Complete genome searches for quantitative trait loci controlling blood pressure and related traits in four segregating populations derived from Dahl hypertensive rats*. Mamm Genome, 1999. **10**(3): 259-65.
73. Charron, S., et al., *A loss of genome buffering capacity of Dahl salt-sensitive model to modulate blood pressure as a cause of hypertension*. Hum Mol Genet, 2005. **14**(24): 3877-84.
74. Hesse, C. and J.H. Eisenach, *Genetic variation in the beta(2)-adrenergic receptor: impact on intermediate cardiovascular phenotypes*. Curr Pharmacogenomics Person Med, 2008. **6**(3): 160-170.
75. Russo, C.J., et al., *Association of NEDD4L ubiquitin ligase with essential hypertension*. Hypertension, 2005. **46**(3): 488-91.
76. Goulet, C.C., et al., *Inhibition of the epithelial Na⁺ channel by interaction of Nedd4 with a PY motif deleted in Liddle's syndrome*. J Biol Chem, 1998. **273**(45): 30012-7.

77. Warnock, D.G., *Liddle syndrome: genetics and mechanisms of Na⁺ channel defects*. Am J Med Sci, 2001. **322**(6): 302-7.
78. Green, S.A., et al., *Influence of beta 2-adrenergic receptor genotypes on signal transduction in human airway smooth muscle cells*. Am J Respir Cell Mol Biol, 1995. **13**(1): 25-33.
79. Green, S.A., et al., *Amino-terminal polymorphisms of the human beta 2-adrenergic receptor impart distinct agonist-promoted regulatory properties*. Biochemistry, 1994. **33**(32): 9414-9.
80. Araki, N., et al., *Expression, transcription, and possible antagonistic interaction of the human Nedd4L gene variant: implications for essential hypertension*. Hypertension, 2008. **51**(3): 773-7.
81. Hahntow, I.N., R.P. Koopmans, and M.C. Michel, *The beta2-adrenoceptor gene and hypertension: is it the promoter or the coding region or neither?* J Hypertens, 2006. **24**(6): 1003-7.
82. Kaszuba, K., et al., *Molecular Dynamics Simulations Reveal Fundamental Role of Water As Factor Determining Affinity of Binding of beta-Blocker Nebivolol to beta(2)-Adrenergic Receptor*. J Phys Chem B, 2010. **114**(25):8374-86.
83. Taylor, M.R., *Pharmacogenetics of the human beta-adrenergic receptors*. Pharmacogenomics J, 2007. **7**(1): 29-37.
84. De Caterina, A.R. and A.M. Leone, *Why beta-blockers should not be used as first choice in uncomplicated hypertension*. Am J Cardiol, 2010. **105**(10): 1433-8.
85. Hesse, C., et al., *Beta-2 adrenoceptor gene variation and systemic vasodilatation during ganglionic blockade*. J Physiol, 2010. **588**(Pt 14):2669-78.
86. Rotin, D., *Role of the UPS in Liddle syndrome*. BMC Biochem, 2008. **9 Suppl 1**: S5.
87. Schild, L., *The epithelial sodium channel and the control of sodium balance*. Biochim Biophys Acta, 2010. **1802**(12):1159-65.
88. Hummler, E., *Epithelial sodium channel and its implication in the control of blood pressure*. Kidney Blood Press Res, 1998. **21**(2-4): 253-5.

89. Burton, T.J., et al., *Expression of the epithelial Na(+) channel and other components of an aldosterone response pathway in human adrenocortical cells*. Eur J Pharmacol, 2009. **613**(1-3): 176-81.
90. Manunta, P., et al., *Physiological interaction between alpha-adducin and WNK1-NEDD4L pathways on sodium-related blood pressure regulation*. Hypertension, 2008. **52**(2): 366-72.
91. Ariyarajah, A., et al., *Dissecting quantitative trait loci into opposite blood pressure effects on Dahl rat chromosome 8 by congenic strains*. J Hypertens, 2004. **22**(8): 1495-502.
92. McCarthy, M.I., et al. *Genome-wide association studies for complex traits: consensus, uncertainty and challenges*. Nat Rev Genet, 2008. **9**: 356-369.
93. Brodde, O.E., *Beta-1 and beta-2 adrenoceptor polymorphisms: functional importance, impact on cardiovascular diseases and drug responses*. Pharmacol Ther, 2008. **117**(1): 1-29.
94. Floras, J.S., *Sympathetic nervous system activation in human heart failure: clinical implications of an updated model*. J Am Coll Cardiol, 2009. **54**(5): 375-85.
95. Rodrigues, S.F., et al., *Matrix metalloproteinases cleave the beta2-adrenergic receptor in spontaneously hypertensive rats*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2010. **299**(1): 25-35.
96. Suonsyrja, T., et al., *Common genetic variation of beta1- and beta2-adrenergic receptor and response to four classes of antihypertensive treatment*. Pharmacogenet Genomics, 2010. **20**(5): 342-5.
97. Drysdale, C.M., et al., *Complex promoter and coding region beta 2-adrenergic receptor haplotypes alter receptor expression and predict in vivo responsiveness*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(19): 10483-8.
98. Jiang, L. and G. Kunos, *Sequence of the 5' regulatory domain of the gene encoding the rat beta 2-adrenergic receptor*. Gene, 1995. **163**(2): 331-2.
99. Pankow, J.S., et al., *Further evidence of a quantitative trait locus on chromosome 18 influencing postural change in systolic blood pressure: the Hypertension Genetic Epidemiology Network (HyperGEN) Study*. Am J Hypertens, 2005. **18**(5 Pt 1): 672-8.

100. Shi, P.P., et al., *Salt-sensitive hypertension and cardiac hypertrophy in mice deficient in the ubiquitin ligase Nedd4-2*. Am J Physiol Renal Physiol, 2008. **295**(2): 462-70.
101. Fava, C., et al., *24-h ambulatory blood pressure is linked to chromosome 18q21-22 and genetic variation of NEDD4L associates with cross-sectional and longitudinal blood pressure in Swedes*. Kidney Int, 2006. **70**(3): 562-9.
102. Rotin, D. and L. Schild, *ENaC and its regulatory proteins as drug targets for blood pressure control*. Curr Drug Targets, 2008. **9**(8): 709-16.
103. Hamm, L.L., Z. Feng, and K.S. Hering-Smith, *Regulation of sodium transport by ENaC in the kidney*. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2010. **19**(1): 98-105.
104. Shi, H., et al., *Interactions of beta and gamma ENaC with Nedd4 can be facilitated by an ERK-mediated phosphorylation*. J Biol Chem, 2002. **277**(16): 13539-47.
105. de Seigneux, S., et al., *NF-kappaB inhibits sodium transport via down-regulation of SGK1 in renal collecting duct principal cells*. J Biol Chem, 2008. **283**(37): 25671-81.
106. Sharp, P.A., *RNA splicing and genes*. JAMA, 1988. **260**(20): 3035-41.
107. Mattson, D.L., et al., *Influence of diet and genetics on hypertension and renal disease in Dahl salt-sensitive rats*. Physiol Genomics, 2004. **16**(2): 194-203.
108. Hong, K.W., et al., *Genetic variations in ATP2B1, CSK, ARSG and CSMD1 loci are related to blood pressure and/or hypertension in two Korean cohorts*. J Hum Hypertens, 2010. **24**(6): 367-72.
109. Ferrante, P., et al., *Molecular and biochemical characterisation of a novel sulphatase gene: Arylsulfatase G (ARSG)*. Eur J Hum Genet, 2002. **10**(12): 813-8.
110. Frese, M.A., S. Schulz, and T. Dierks, *Arylsulfatase G, a novel lysosomal sulfatase*. J Biol Chem, 2008. **283**(17): 11388-95.
111. Parenti, G., G. Meroni, and A. Ballabio, *The sulfatase gene family*. Curr Opin Genet Dev, 1997. **7**(3): 386-91.
112. Kuchel, O., *Clinical implications of genetic and acquired defects in catecholamine synthesis and metabolism*. Clin Invest Med, 1994. **17**(4): 354-73.

