

고장성 자극에 대한 신장의 적응기전 - TonEBP Transcriptional Activator의 기능

서울대학교 의과대학 내과학교실

나 기 영

TonEBP는 NFAT나 NF κ B와 마찬가지로 Rel family에 속하는 전사조절인자(transcriptional activator)이지만 아미노산 서열이나 구조상으로 이들과 구별되며 5개의 transactivation 도메인을 통하여 더 정교하게 target 유전자의 전사를 조절한다. 포유류 신장에서 TonEBP는 compatible osmolyte 축적에 관여하는 유전자를 자극하여 세포내 이온 농도를 떨어뜨림으로써 hypertonicity의 유해한 자극으로부터 세포를 보호한다. TonEBP 활성화는 단백 발현 증가, 인산화, transactivation, 세포내 위치 이동 등을 통하여 조절된다. TonEBP는 신장 이외에도 뇌, 심장, 간, T 임파구 등 여러 장기에 널리 분포하고 있고 면역반응, 당뇨, 암 등에도 관여하리라는 증거들이 제시되고 있다. RNA 간섭과 같은 기술을 이용하여 TonEBP의 loss-of-function을 연구하면 향후 더 다양한 생물학적 기능을 밝힐 수 있을 것이다.

우리 몸의 다른 부위와 달리 신장은 고농도의 삼투압에 노출되어 있다. 피질 부위는 혈액과 등장성이지만 수질로 갈수록 삼투압이 높아져 유두부의 삼투압이 가장 높다. 간질액과 접한 신세관 세포의 기저외측막은 수분이 자유로이 통과하기 때문에 세포 내부는 간질과 삼투 평형을 이루고 있다. 수분 섭취를 제한하여 약간 탈수된 백서의 신장에서 직접 용질의 농도를 측정해 보면 유두부 간질액에서 NaCl은 1,000 mOsm, 요소는 1,500 mOsm에 달한다¹⁾. 이러한 높은 삼투압은 수분 재흡수와 요농축의 원동력으로 작용하여 신장이 우리 몸의 수분과 혈압조절에 기여하게 한다.

그러나 고삼투압 자체는 신수질 세포에 상당한 스트레스를 부과하게 된다. 따라서 신장이 정상적으로 그 기능을 수행하기 위해서는 고삼투압의 유해한 자극에 적절히 적응할 수 있어야만 한다. 전사조절인자(transcriptional activator)인 tonicity-responsive enhancer binding protein (TonEBP)은 이러한 유해한 자극으로부터 수질 세포를 보호하는 데 중추적인 역할을 하고 있다.

1. 세포에 유해한 고장성 자극

요소와 NaCl이 신수질의 주된 용질이지만 신장 세포에 대한 이들의 효과는 서로 다르다. 요소는 세포막을 자

유로이 통과하나 NaCl은 세포막을 통과하지 못하므로 NaCl만이 유효삼투압, 즉 tonicity를 형성하기 때문이다. 세포가 고농도의 NaCl 용액 즉, 고장성 용액에 노출되면 수초내에 크기가 줄어들고 세포내 이온 농도가 증가하게 된다. 이 후 수시간에 걸쳐 세포내에 organic osmolyte 또는 compatible osmolyte 라고 불리는 유기용질이 축적되어 증가된 세포내의 이온 농도를 낮추어 준다²⁾. 그러면 세포내 이온 농도 상승이 왜 세포에 유해할까? 그 이유는 이온 농도가 상승하면 여러 효소의 활성이 감소하여 결국 세포내 단백질의 기능 이상이 초래되기 때문일 것으로 현재까지 알려져 있으나 세포 사망을 초래하는 표적 단백질에 대해서는 구체적으로 알려진 바가 없다³⁾.

최근 고장성 자극이 방사선 조사나 항암제 투여처럼 이중나선 DNA 절단(double-stranded DNA break)을 일으킨다는 연구결과가 보고되었다⁴⁾. 이중나선 DNA 절단이 일어나면 ATM (ataxia telangiectasia mutated), ATR (ataxia telangiectasia and Rad3-related kinase), DNA-PK (DNA-dependent protein kinase) 등과 같은 protein kinase가 활성화되고 p53의 induction과 phosphorylation, GADD45, GADD153의 induction이 일어나게 된다⁵⁻⁷⁾(Fig. 1). 그리고 활성화된 p53는 cell cycle arrest를 일으켜 세포사멸(apoptosis)을 방지한다. 고장성 자극의 정도에 따라서 세포의 반응이 달라지는데, 600 mOsm 이상의 고장성 자극에 노출되면 세포가 사망하지만 600 mOsm 이하에서는 p53 활성화 효과가 우세하여

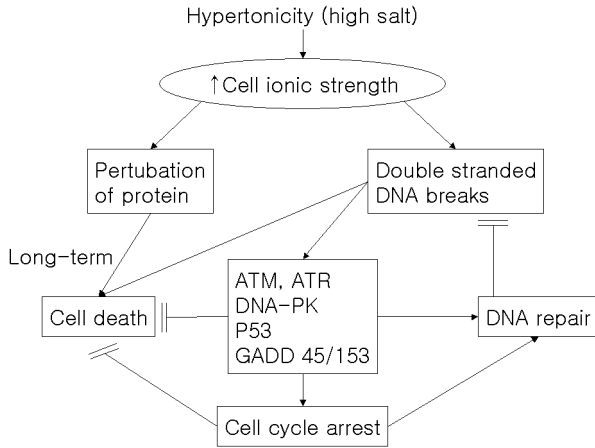


Fig. 1. Nature of stress induced by hypertonicity. Exposure to hypertonic environment results in an immediate rise in the cellular ionic strength, which perturbs protein function and causes double-stranded DNA breaks. Arrows represent activating events, and perpendicular ends represents inhibitory events.

세포사멸은 억제되고 cell cycle arrest가 일어나서 DNA 복구기전이 작동하게 된다. 즉, 삼투압을 서서히 올리면 이러한 적응기전이 작동하여 신수질에서 관찰되는 높은 삼투압에서도 세포는 살아갈 수 있게 되는 것이다.

2. 고장성 자극에 대한 TonEBP의 세포 보호기능

신수질의 세포는 compatible osmolyte를 축적함으로써 고장성 자극에 적응해 나간다⁸⁾. 신장에 있는 compatible osmolyte는 inositol, betaine, taurine, sorbitol, glycerophosphorylcholine 등이다. 대부분의 생리적인 상황에서 간질액의 tonicity는 변화가 심하지만 이러한 compatible osmolyte가 존재하기 때문에 신수질 세포내 이온 농도는 거의 등장성으로 일정하게 유지될 수 있다⁹⁾. 세포내에 compatible osmolyte가 축적되면 고장성 자극하에서도 caspase 활성이 낮아지고 세포사멸이 방지된다¹⁰⁾. 그러나 고장성 자극하에서도 세포내에 inositol이 축적되지 못하면 세포사망이 일어나고 급성 신부전에 빠지게 된다^{11, 12)}. 또한 aldose reductase 유전자만 특이하게 없앤 쥐에서는 세포내에 sorbitol이 축적되지 못하기 때문에 요농축에 장애가 초래된다¹³⁾. 이상의 결과에서 신수질이 정상적인 기능을 발휘하기 위해서는 세포내에 compatible osmolyte가 제대로 축적되어야 한다는 사실을 알 수 있다. 그런데 세포내의 compatible osmolyte 축적에 바로 TonEBP가 중추적인 역할을 하고 있다(Fig. 2). TonEBP는 신수질의 고장성 자극에 의해 활성화되어 여러 유전자들을 전사시

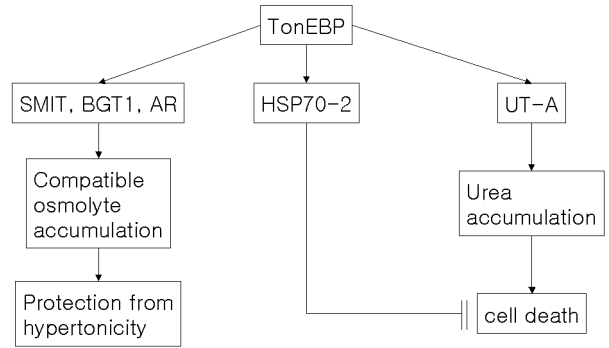


Fig. 2. Network of genes and their function regulated by TonEBP in the renal medulla.

킨다. Sodium/myo-inositol cotransporter (SMIT), sodium/chloride/betaine cotransporter (BGT1), aldose reductase (AR) 등이 여기에 속하는 유전자들이다¹⁴⁻¹⁶⁾. 이들 유전자들의 5' 쪽에는 TonE (tonicity-responsive enhancer)라는 부위가 여러 개 존재하는데 이 부위에 TonEBP가 결합하게 되면 이들 유전자의 전사가 시작된다. SMIT은 소듐 이온 2개와 inositol 1개를 이동시키고 BGT1은 소듐 이온 3개, 염소 이온 2개와 함께 betaine 1개를 이동시킨다^{17, 18)}. 즉, 세포막의 소듐과 염소의 전기화학적 농도차를 이용하여 SMIT과 BGT1은 inositol과 betaine을 세포내로 이동시키게 된다. 그리고 AR은 포도당을 sorbitol로 환원시킨다⁸⁾. 이렇게 일단 세포내로 들어오거나 합성된 compatible osmolyte는 세포막을 통과하지 못하므로 세포 밖으로 빠져나가지 않고 상승된 세포내 이온 농도를 대신할 삼투물질로 작용하게 된다.

3. 신수질의 분화에 있어서 TonEBP의 역할

Vasopressin의 조절을 받는 요소 수송체(urea transporter, UT-A)는 신수질내에 많은 양이 존재하면서 요소의 축적에 중요한 역할을 한다¹⁹⁾. UT-A 유전자는 4개의 isoform을 만드는데 이 중 UT-A1, UT-A3, UT-A4는 TonEBP에 의해 조절되는 promotor를 가지고 있다²⁰⁾. 즉, UT-A 유전자는 고장성 자극으로부터 세포를 보호하는데 관여하지 않으나 TonEBP의 조절을 받고 있는 셈이다. Heat shock protein 70은 신피질에 비해 신수질 부위에 많이 분포하고 있는데^{21, 22)} 이 중에 HSP70-2라는 유전자는 TonEBP의 조절을 받으면서 고농도의 요소로부터 세포를 보호하는 기능이 있다^{23, 24)}. 결국 TonEBP가 신수질에서 고농도의 요소로부터 세포를 보호하는데 매

우 중요한 역할을 하고 있는 셈이다(Fig. 2). 신수질의 고삼투압이 제대로 유지되지 못하는 유전자 knockout 동물 모델이 몇 가지 존재하는데^{25, 26)}, 특히 aquaporin-1 유전자 결손 쥐에서 내수질 삼투압은 혈장과 큰 차이가 없을 정도로 매우 낮다^{27, 28)}. 정상적으로 내수질에 다량 분포되어 있어야 할 UT-A와 aquaporin-4 유전자가 이 쥐에서는 현저히 감소되어 있는 반면, 주로 피질에 다량 분포하는 aquaporin-3와 ENaC- γ (Epithelial Sodium Channel- γ) 유전자는 정상 쥐와 큰 차이를 보이지 않았다²⁷⁾. 이 결과는 고장성 자극이 신수질에서 신장 세포들의 분화를 유도하는 일종의 신호가 되고 있음을 의미하며, TonEBP가 내수질에서 고장성 자극에 따른 신장 세포의 분화에 매우 중요한 역할을 하는 물질임을 암시한다.

4. TonEBP의 구조와 도메인에 따른 기능

사람 TonEBP 유전자는 130 kb에 걸친 16개의 exon으로 구성되어 있으며 아미노산은 약 1,500개에 달한다²⁹⁾. DNA 결합 도메인(Rel-homology domain이라고도 부름)의 homology에 따라 분류할 때 TonEBP는 NFAT와 NF κ B와 마찬가지로 Rel family라는 전사조절인자에 속한다. TonEBP의 DNA 결합 도메인은 NF κ B의 DNA 결합 도메인과는 아미노산 서열이 상이하지만 NFAT (nuclear factor of activated T-cell) family의 DNA 결합 도메인과는 43%의 아미노산 동일성을 나타낸다. 그러나 DNA 결합 도메인 외에 regulatory 도메인은 NFAT과 아미노산 서열이 다르기 때문에 NFAT에 작용하는 cyclosporin A나 FK506 같은 calcineurin 억제제는 TonEBP에 아무런 영향을 미치지 않는다^{30, 31)}. 최근 밝혀진 TonEBP DNA결합 도메인의 결정구조(crystal structure)³²⁾에 의하면 TonEBP는 NF κ B처럼 dimer를 형성하지만, 오히려 아미노산 서열이 비슷한 NFAT은 이들과 달리 dimer를 형성하지 않고 monomer로 DNA에 결합한다. 즉, 아미노산 서열은 NFAT과 비슷하지만 구조상으로는 NF κ B와 비슷한 물질인 것이다. 그러므로 진화론적 분류상으로 TonEBP는 NF κ B와 NFAT의 중간단계의 물질에 해당된다고 생각된다.

TonEBP에서 DNA 결합 도메인 외에 유전자 전사에 관여하는 transactivation 도메인은 크게 5개로 나눌 수 있다. 각각 독립적으로 전사를 자극하는 activation 도메인이 3개 존재하고 activation 도메인의 활성도를 증강시

킬 수 있는 modulation 도메인이 2개 존재한다. 이 5개의 도메인은 여러 조합으로 상승작용을 일으키면서 hypertonicity에 반응하기 때문에 TonEBP는 NF κ B나 NFAT보다 훨씬 더 정교하게 유전자 전사를 조절한다³³⁾.

5. 자극에 따른 TonEBP의 조절

고장성 자극에 대한 TonEBP의 조절 기전은 MDCK (Madin-Darby canine kidney) 세포를 사용하여 많은 연구가 이루어졌고 그 결과 TonEBP는 phosphorylation, transactivation, nuclear translocation, induction 등의 다른 기전을 통하여 조절되는 것으로 밝혀졌다^{34, 35)}. 세포 핵 추출물에서 TonEBP의 EMSA (electrophoretic mobility shift assay)를 시행해 보면 핵에서 TonEBP의 DNA 결합력이 증가할수록 시간적인 상관관계를 가지면서 SMIT과 BGT1 유전자 전사도 증가하였고 in vivo footprinting analysis에서도 TonEBP 활성도가 증가하면 BGT1과 SMIT 유전자의 TonE 부위의 결합력도 비례하여 증가하였다. 즉, TonEBP가 핵에서 DNA에 결합하는 단계가 해당 유전자들의 전사에서 가장 중요한 단계이다. TonEBP 단백질은 등장성에서도 인산화되어 있지만 고장성으로 옮기면 30분내에 인산화의 정도가 증가한다³⁵⁾. 인산화되는 아미노산은 주로 serine과 tyrosine기이며 인산화되는 시기와 TonEBP가 핵내로 이동하는 시기 사이에는 시간적인 연관성을 보인다. 또 proteasome 억제제를 처리하면 TonEBP가 핵내로 이동하는 것을 방해하기 때문에 고장성 자극이 와도 AR이나 SMIT mRNA의 양이 증가하지 않는다³⁶⁾. 이 사실에서 분해가 되어야만 TonEBP를 핵내로 이동시킬 수 있는 어떤 물질이 세포질내에 존재하리라고 추측되고 있다.

그리고 고장성 자극 뿐 아니라 저장성 자극에 대해서도 TonEBP는 조절을 받는다. 등장성 배지에 있던 MDCK 세포를 저장성 배지로 옮기면 TonEBP 단백질의 양은 줄어들고 TonEBP가 핵에서 세포질로 이동하여 단백질양과 세포내의 위치가 고장성 자극을 받을 때와는 반대 방향으로 조절된다. 또한 저장성 자극에 의한 TonEBP의 감소는 TonEBP의 target 유전자인 SMIT, BGT1, AR, HSP70 등의 mRNA 양을 감소시킨다. 즉, TonEBP는 달라지는 tonicity에 따라 단백질양, 세포내 위치, 전사 활성화 등이 양쪽 방향으로 조절됨을 알 수 있다³⁶⁾(Fig. 3).

여태까지 시행한 연구들은 배양된 세포에서 tonicity에

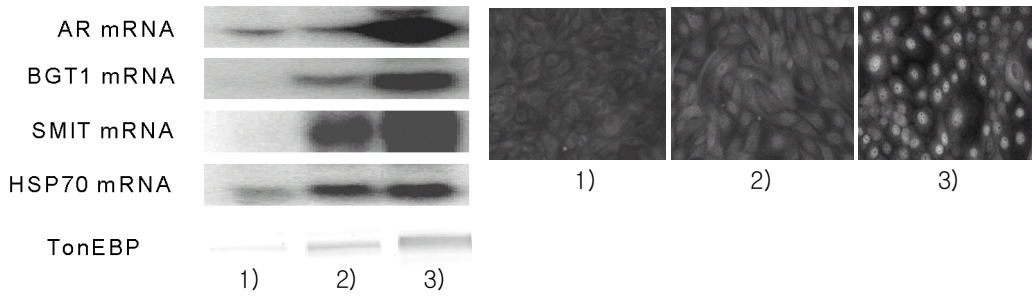


Fig. 3. Bi-directional TonEBP response to changes in ambient tonicity. TonEBP abundance and cellular distribution in MDCK cells cultured in 1) hypotonic, 2) isotonic, 3) hypertonic medium. mRNA abundances of TonEBP target genes are also shown.

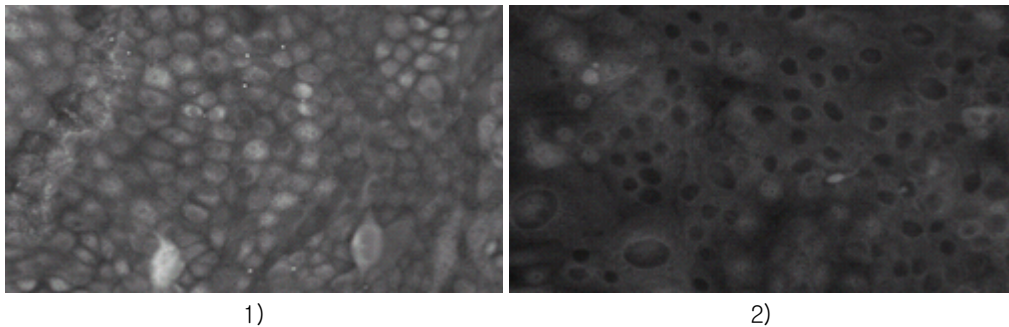


Fig. 4. Long-term regulation of TonEBP in 1) isotonic, 2) hypertonic (440 mM NaCl+600 mM urea+5 mM betaine) conditions. Betaine and urea cause cytoplasmic shift of TonEBP.

급격한 변화를 준 후에 관찰한 결과들이었다. 그러나 생체내의 신수질에서는 세포 실험에서처럼 급격하게 tonicity가 변화하지 않고 장기간에 걸쳐 서서히 변화하기 때문에 세포 용적이 변하지 않는다. 신수질내의 높은 삼투압과 조직내 세포의 밀집성 그리고 신장자체에서 합성된 compatible osmolyte인 betaine의 존재 등을 고려하여 동물의 신장을 모방할 수 있는 세포배양 모델이 개발되었다. MDCK 세포를 단일층으로 밀집시켜(confluent) 키운 후 5세대가 지날 때까지 장기간에 걸쳐 240 mM의 고농도 NaCl에 적응시킨 후, 하루에 NaCl 50 mM, 요소 100 mM씩 서서히 상승시켜 최종적으로 신수질과 비슷한 농도인 NaCl 440 mM, 요소 600 mM 배지에 배양시키고 5mM의 betaine을 첨가한 후 TonEBP 항체로 세포를 염색하였다(Fig. 4). 염색 결과 betaine과 요소는 고장성 자극에 대한 TonEBP의 반응을 둔화시켜 TonEBP를 세포질로 이동시키는 효과가 있음을 알 수 있다.

6. 신장에서 TonEBP의 조절

백서의 태생기 신장에서는 TonEBP의 발현이 다른 장기에 비하여 약하고 주로 세포질에 위치해 있다³⁷⁾. 그러

나 출생 후 요농축능이 발달함에 따라 TonEBP의 발현이 점차 증가하고 점차 세포질에서 핵으로 위치하게 된다. 결국 성장이 완료된 백서에서는 TonEBP가 신장의 내수질과 외수질의 내측부위에 가장 높게 발현된다³⁸⁾. 백서에게 다량의 수분을 섭취시키거나 혹은 수분 섭취를 제한시켜 요삼투압을 변화시켜 보면 신장에서 TonEBP의 target 유전자들의 발현에 변화가 생긴다. 수분 이뇨시에는 SMIT, AR, UT-A 등의 발현이 감소하고 항이뇨시에는 발현이 증가한다^{19, 39, 40)}. 그러나 이 경우에 TonEBP 단백질과 mRNA 양에는 변화가 없다³⁸⁾. MDCK 세포 실험 결과에 의하면 TonEBP 단백질 증가는 450 mOsm/L에서 최고치에 도달하고 그 이상 tonicity를 증가시켜도 더 이상 단백질이 증가하지 않는다³⁶⁾. 다량의 수분을 섭취하여 수분이뇨가 일어나는 경우에도 신세관 간질의 tonicity는 450 mOsm/L을 넘기 때문에 백서의 신장에서 TonEBP 단백질은 변화하지 않는 것이다. 그러나 TonEBP 항체로 백서의 신장을 염색해 보면 세포내에서 TonEBP의 위치는 이뇨상태에 따라 변화한다. 외수질의 descending thin limb과 내수질 thin limb의 시작부위의 신세관에서 TonEBP는 수분 이뇨시에는 세포질에 위치

하다가 항이뇨시에는 주로 핵으로 이동하게 된다(Fig. 5). 그러나 중간 및 말단 내수질의 신세관에서는 이뇨 상태와 무관하게 TonEBP는 항상 핵내에 위치하고 있다. TonEBP의 이러한 세포내 분포의 변화는 SMIT mRNA의 발현의 변화와 정확하게 일치한다. 즉, 중간 및 말단 내수질에서는 이뇨 상태와 무관하게 SMIT 발현이 최대로 증가되어 있고 나머지 신세관에서는 수분 이뇨시 발현 감소, 항이뇨시 발현 증가를 보인다³⁸⁾. 이러한 사실은 생체의 신장에서 TonEBP가 SMIT 유전자의 전사를 조절한다는 직접적인 증거이다.

7. RNA 간섭을 이용한 TonEBP의 기능 연구

스트레스나 바이러스 감염에 대한 숙주의 방어기전의 일종으로 double-stranded RNA (dsRNA)가 포유류의 세포내로 들어오면 세포내의 모든 mRNA가 분해되고 단백질 합성이 중단된다. 그러나 30 base pair 미만의 small interfering RNA (siRNA) duplex는 다른 mRNA에는 영향을 미치지 않고 특정 염기서열에만 특이적으로 작용하여 표적 유전자의 mRNA만 분해할 수 있다⁴¹⁾. 이러한

현상을 RNA 간섭(RNA interference)이라고 부르는데 이 기술은 관심이 있는 유전자의 기능을 밝히는 데 매우 유용하게 활용할 수 있다. TonEBP의 생물학적인 기능을 연구하기 위하여 2개의 siRNA duplex를 합성한 후 RNA 간섭을 이용하여 세포내에서 TonEBP의 발현을 90% 정도 감소시켰다. TonEBP 발현이 감소된 세포에서는 SMIT, AR, HSP70의 mRNA 발현도 의미있게 감소하였다⁴²⁾(Fig. 6). 그간 TonEBP만 제한적으로 발현시키지 못하는 세포주(cell line)나 또는 TonEBP에만 특이적으로 작용하는 억제제가 개발되지 못하였기 때문에 세포내에서 TonEBP의 기능을 연구하는 데 제한이 많았다. 그러나 RNA 간섭을 이용한 연구결과로 TonEBP가 SMIT, AR, HSP70 유전자를 전사한다는 직접적인 증거를 제시할 수 있게 되었다.

8. 신장 이외의 기관에서 TonEBP의 기능

TonEBP는 배아 줄기세포 때부터 나타나기 시작하여 발생 중인 배아의 눈, 뇌, 척수, 심장, 간 등에 널리 발현되고 성장이 완료된 후에도 동일한 발현 양상을 보인다²⁹⁾.

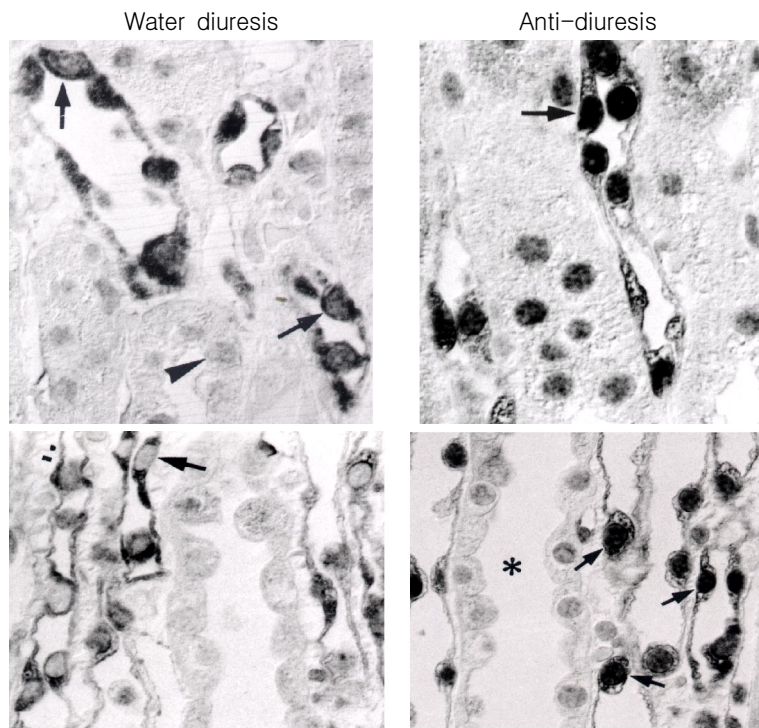


Fig. 5. TonEBP distribution in rat kidneys during water diuresis and anti-diuresis. Descending thin limbs from the inner stripe of the outer medulla (upper panel) and thin limb from the initial part of the inner medulla (lower panel) are shown.

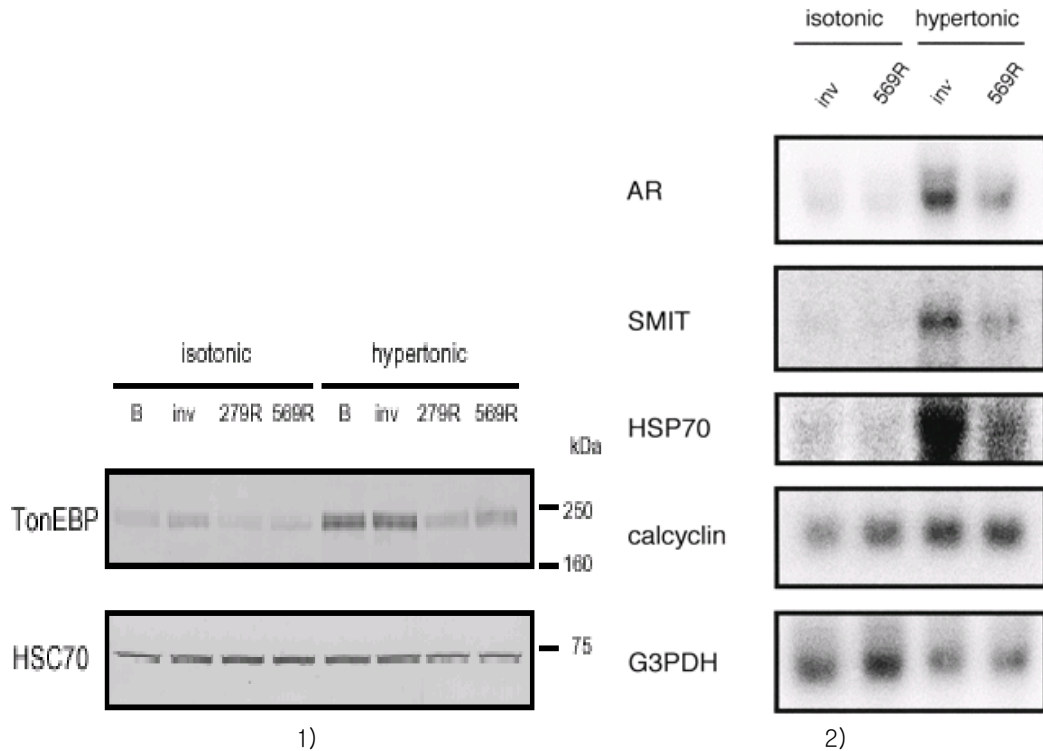


Fig. 6. Silencing of TonEBP. HeLa cells were transfected with buffer (B), control siRNA (inv), or 400 nM of TonEBP-siRNA duplex (279R, 569R) and were treated with isotonic or hypertonic medium. 1) Immunoblots were probed for TonEBP and HSC70. 2) Northern analysis were performed to detect mRNA for AR, SMIT, HSP70, calcyclin and G3PDH.

뇌 발달과정에 SMIT이 다량으로 발현되므로 TonEBP가 SMIT의 발현에 중요한 역할을 할 것으로 예상하고 있다⁴³⁾. 실제로 Western 분석을 해보면 뇌나 흉선의 TonEBP 양이 신장의 TonEBP의 양보다 훨씬 많음을 알 수 있다⁴⁴⁾. 수용체가 활성화되어 자극을 받은 T 임파구에서 TonEBP의 발현이 현저히 증가하기 때문에 TonEBP를 NFAT5 (nuclear factor of activated T-cells) 또는 NFATL1 (NFAT-related protein)라고도 부른다⁴⁴⁾. 실제 TonEBP는 lymphotoxin- β , TNF- α , IL-8과 같이 염증 반응에 관여하는 여러 cytokine의 전사도 직접 자극한다⁴⁵⁾. 그리고 TonEBP의 target 유전자 중 하나인 AR이 당뇨병성 신증이 있는 환자의 신장내 사구체에 발현된다는 사실도 최근에 보고되었다⁴⁶⁾. 또한 TonEBP가 $\alpha_6\beta_4$ integrin에 의해 유도되어 암침습(carcinoma invasion)에도 관여하다는 보고도 나오고 있다⁴⁷⁾. 이상과 같이 TonEBP가 면역반응과 당뇨, 암 등의 질환에도 관여하고 있음을 알 수 있다.

전 망

신장은 고도로 분화된 다양한 종류의 세포들로 이루어진 기관으로서 그 생리학적 병리학적인 연구를 수행함에 있어 다른 기관과 달리 상당한 어려움이 있고 해부학적으로도 접근상 어려움이 많아 동물실험이 용이하지 않다. 향후 TonEBP의 조절 행태를 모방할 수 있는 세포배양 모델이 개발되면 고장성 자극에 대해 신장 세포가 어떻게 적응하며 그 신호전달 기전은 어떻게 이루어지는지를 연구할 수 있을 것으로 기대된다. 또한 이 모델은 허혈성 신질환 등 다른 질병 모델의 기전을 연구하는 데 이용될 수도 있다.

TonEBP가 신장 이외의 여러 조직에 널리 분포한다는 사실로부터 과연 이들 조직에서 TonEBP는 어떠한 유전자들의 전사를 조절하는지에 관한 의문점이 발생한다. 만약 이러한 유전자들을 밝혀낼 수 있다면 생체내에서 TonEBP의 생물학적인 기능을 밝히는 데 새로운 방향을 제시해 줄 수 있을 것이다. 앞에서 기술한 RNA 간섭을 이용하여 영구세포주(permanent cell line)를 개발하거나

충분한 양의 siRNA duplex를 원하는 동물 조직에 전달할 수 있는 방법을 발견한다면 TonEBP의 loss-of-function 연구에 큰 도움이 될 것이다.

참 고 문 헌

- 1) Beck F-X, Dörge A, Rick R, Thurau K: Intra- and extracellular element concentrations of rat renal papilla in antidiuresis. *Kidney Int* **25**:397-403, 1984
- 2) Sone M, Albrecht GJ, Dörge A, Thurau K, Beck FX: Osmotic adaptation of renal medullary cells during transition from chronic diuresis to antidiuresis. *Am J Physiol* **264**:F722-729, 1993
- 3) Yancey PH, Clark ME, Hand SC, Bowlus RD, Somero GN: Living with water stress: Evolution of osmolyte systems. *Science* **217**:1214-1222, 1982
- 4) Kültz D, Chakravarty D: Hyperosmolality in the forms of elevated NaCl but not urea causes DNA damage in murine kidney cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**:1999-2004, 2001
- 5) Dimitrieva N, Kültz D, Michea L, Ferraris J, Burg MB: Protection of renal inner medullary epithelial cells from apoptosis by hypertonic stress-induced p53 activation. *J Biol Chem* **275**:18243-18247, 2000
- 6) Dimitrieva N, Michea L, Burg MB: p53 protects renal inner medullary cells from hypertonic stress by restricting DNA replication. *Am J Physiol* **281**:F522-530, 2001
- 7) Kültz D, Madhany S, and Burg MB: Hyperosmolality causes growth arrest of murine kidney cells: Induction of GADD45 and GADD153 by osmosensing via stress-activated protein kinase 2. *J Biol Chem* **273**:13645-13651, 1998
- 8) Garcia-Perez A, Burg MB: Renal medullary organic osmolytes. *Physiol Rev* **71**:1081-1115, 1991
- 9) Beck F-X, Burger-Kentischer A, Müller E: Cellular response to osmotic stress in the renal medulla. *Pfugers Arch Eur J Physiol* **436**:814-827, 1998
- 10) Horio A, Ito A, Matsuoka Y, Moriyama T, Orita Y, Takenaka M, Imai E: Apoptosis induced by hypertonicity in MDCK cells: protective effect of betaine. *Nephrol Dial Transplant* **16**:483-490, 2001
- 11) Kitamura H, Yamauchi A, Nakanish T, Takamitsu Y, Akagi A, Moriyama T, Horio M, Imai E: Effect of inhibition of myo-inositol transport on MDCK cells under hypertonic environment. *Am J Physiol* **272**:F267-272, 1997
- 12) Kitamura H, Yamauchi A, Sugiura T, Matsuoka Y, Horio M, Tohyama M, Shimada S, Imai E, Hori M: Inhibition of myo-inositol transport causes acute renal failure with selective medullary injury in the rat. *Kidney Int* **53**:146-153, 1998
- 13) Ho HTB, Chung SK, Law JWS, Ko BCB, Tam SCF, Brooks HL, Knepper MA, Chung SSM: Aldose reductase-deficient mice develop nephrogenic diabetes insipidus. *Mol Cell Biol* **20**:5840-5846, 2000
- 14) Rim JS, Atta MG, Dahl SC, Berry GT, Handler JS, Kwon HM: Transcription of the sodium/myo-inositol cotransporter gene is regulated by multiple tonicity-responsive enhancer spread over 50 kilobase pairs in the 5'-flanking region. *J Biol Chem* **273**:20615-20621, 1998
- 15) Miyakawa H, Rim JS, Handler JS, Kwon HM: Identification of the second tonicity-responsive enhancer of the betaine transporter (BGT1) gene. *Biochem Biophys Acta* **1446**:359-364, 1999
- 16) Ko BCB, Ruepp B, Bohren KM, Gabbay KH, Chung SSM: Identification and characterization of multiple osmotic response sequences in the human aldose reductase gene. *J Biol Chem* **272**:16431-16437, 1997
- 17) Hager K, Hazama A, Kwon HM, Loo DDF, Handler JS, Wright EM: Kinetics and specificity of the renal Na/myo-inositol cotransporter expressed in *Xenopus* oocytes. *Memb Biol* **143**:103-113, 1995
- 18) Matskevitch I, Wagner CA, Stegen C, Börger S, Noll B, Risler T, Kwon HM, Handler JS, Waldegger S, Busch AE, Lang F: Functional characterization of BGT1 expressed in *Xenopus* oocytes. *J Biol Chem* **274**:16709-16716, 1999
- 19) Bagnasco SM, Peng T, Nakayama Y, Sands JM: Differential expression of individual UT-A urea transporter isoforms in rat kidney. *J Am Soc Nephrol* **11**:1980-1986, 2000
- 20) Nakayama Y, Peng T, Sands JM, Bagnasco SM: The TonE/TonEBP pathway mediates tonicity-responsive regulation of UT-A urea transporter expression. *J Biol Chem* **275**:38275-38280, 2000
- 21) Müller E, Neuhofer W, Ohno A, Rucker S, Thurau K, Beck FX: Heat shock protein HSP25, HSP60, HSP72, HSP73, in isotonic cortex and hypertonic medulla of rat kidney. *Pfugers Arch Eur J Physiol* **431**:608-617, 1996
- 22) Müller E, Neuhofer W, Burger-Kentischer A, Ohno A, Thurau K, Beck FX: Effects of long-term changes in medullary osmolality on heat shock protein HSP25, HSP60, HSP72, and HSP73. *Pfugers Arch Eur J Physiol* **435**:705-712, 1998
- 23) Woo SK, Lee SD, Na KY, Park WK, Kwon HM: TonEBP/NFAT5 stimulates transcription of HSP70 in response to hypertonicity. *Mol Cell Biol* **22**:5753-5760, 2002
- 24) Michea L, Ferguson DR, Peters EM, Andrews PM, Kirby MR, Burg MB: Cell cycle delay and apoptosis are induced by high salt and urea in renal medullary cells. *Am J Physiol Renal Physiol* **278**:F209-F218, 2000
- 25) Akizuki N, Uchida S, Sasaki S, and Marumo F: Impaired solute accumulation in inner medulla of *Clnk1*^{-/-} mice kidney. *Am J Physiol Renal Physiol*

- siol* **280**:F79-F87, 2001
- 26) Rao S, Verkman AS: Analysis of organ physiology in transgenic mice. *Am J Physiol Cell Physiol* **279**:C1-C18, 2000
- 27) Brooks HL, Chou C-L, Verkman AS, Knepper MA: Corticolization of inner medullary collecting duct in mice with ablation of the countercurrent multiplier process due to deletion of the aquaporin-1 gene. (abstract) *FASEB J* **15**:A851, 2001
- 28) Ma T, Yang B, Gillespie A, Carlson EJ, Epstein CJ, Verkman AS: Severely impaired urinary concentrating ability in transgenic mice lacking aquaporin-1 water channels. *J Biol Chem* **273**:4296-4299, 1998
- 29) Maouyo D, Kim JY, Lee SD, Wu Y, Woo SK, Kwon HM: Mouse TonEBP-NFAT5: expression in early development and alternative splicing. *Am J Physiol Renal Physiol* **282**:F802-F809, 2002
- 30) Miyakawa H, Woo SK, Dahl SC, Handler JS, Kwon HM: Tonicity-responsive enhancer binding protein, a Rel-like protein that stimulates transcription in response to hypertonicity. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**:2538-2542, 1999
- 31) Lopez-Rodriguez C, Aramburu J, Rakeman AS, Rao A: NFAT5, a constitutive nuclear NFAT protein that does not cooperate with Fos and Jun. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**:7214-7219, 1999
- 32) Stroud JC, Lopez-Rodriguez C, Rao A, Chen L: Structure of a TonEBP-DNA complex reveals DNA encircled by a transcription factor. *Nature Struct Biol* **9**:90-94, 2002
- 33) Lee SD, Colla E, Sheen MR, Na KY, Kwon HM: Multiple domains of TonEBP cooperate to stimulate transcription in response to hypertonicity. *J Biol Chem* **278**:47571-47577, 2003
- 34) Miyakawa H, Woo SK, Chen CP, Dahl SC, Handler JS, Kwon HM: Cis- and trans-acting factors regulating transcription of the BGT1 gene in response to hypertonicity. *Am J Physiol* **274**:F753-F761, 1998
- 35) Dahl SC, Handler JS, Kwon HM: Hypertonicity-induced phosphorylation and nuclear localization of the transcription factor TonEBP. *Am J Physiol Cell Physiol* **261**:C248-C253, 2001
- 36) Woo SK, Maouyo D, Handler JS, Kwon HM: Nuclear redistribution of tonicity-responsive enhancer binding protein requires proteasome activity. *Am J Physiol Cell Physiol* **278**:C248-C253, 2001
- 37) Han KH, Woo SK, Kwon HM, Kim YH, Cha JH, Kim J: Expression of TonEBP in developing rat kidney. (abstract) *J Am Soc Nephrol* **10**:53A, 1999
- 38) Cha JH, Woo SK, Han KH, Kim YH, Handler JS, Kim J, Kwon HM: Hydration status affects nuclear distribution of transcription factor TonEBP in rat kidney. *J Am Soc Nephrol* **12**:2221-2230, 2001
- 39) Yamauchi A, Nakanishi T, Takamitsu Y, Sugita M, Imai E, Noguchi T, Fujiwara Y, Kamada T, Ueda M: *In vivo* osmoregulation of Na⁺/myo-inositol cotransporter mRNA in rat kidney medulla. *J Am Soc Nephrol* **5**:62-67, 1994
- 40) Martial S, Price SR, Sands JM: Regulation of aldose reductase, sorbitol dehydrogenase, and taurine cotransporter mRNA in rat medulla. *J Am Soc Nephrol* **7**:283-289, 1995
- 41) Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T: Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* **411**:494-498, 2001
- 42) Na KY, Woo SK, Lee SD, Kwon HM: Silencing of TonEBP/NFAT5 transcriptional activator by RNA interference. *J Am Soc Nephrol* **14**:283-288, 2003
- 43) Guo W, Shimada S, Tajiri H, Yamashita T, Okada S, and Tohyama M: Developmental regulation of Na⁺/myo-inositol cotransporter gene expression. *Mol Brain Res* **51**:91-96, 1997
- 44) Trama J, Lu Q, Hawley RG, Ho SN: The NFAT-related NFATL1 (TonEBP/NFAT5) is induced upon T cell activation in a calcineurin-dependent manner. *J Immunol* **165**:4884-4894, 2000
- 45) Lopez-Rodriguez C, Aramburu J, Jin L, Rakeman AS, Michino M, Rao A: Bridging the NFAT and NF- κ B families: NFAT5 dimerization regulates cytokine gene transcription in response to osmotic stress. *Immunity* **15**:47-58, 2001
- 46) Kasajima H, Yamagishi SI, Sugai S, Yagihashi N, Yagihashi S: Enhanced in situ expression of aldose reductase in peripheral nerve and renal glomeruli in diabetic patients. *Virchows Arch* **439**:46-54, 2001
- 47) Jauliac S, Lopez-Rodriguez C, Shaw LM, Brown LF, Rao A, Toker A: The role of NFAT transcription factors in integrin-mediated carcinoma invasion. *Nature Cell Biol* **4**:540-544, 2002