



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

이학석사 학위논문

생쥐의 시상하부에서 전사조절인자  
TonEBP에 의한 AVP 발현 조절에 관한 연구

Transcription factor TonEBP regulates arginine  
vasopressin gene expression in the mouse  
hypothalamus

울 산 대 학 교 대 학 원  
생 명 과 학 과  
엄 혜 진

생쥐의 시상하부에서 전사조절인자  
TonEBP에 의한 AVP 발현 조절에 관한 연구

지도교수 이 병 주

이 논문을 이학석사학위 논문으로 제출함

2018년 2월

울 산 대 학 교 대 학 원  
생 명 과 학 과  
엄 혜 진

엄혜진의 이학석사학위 논문을 인준함

심 사 위 원 장                      박정우 (인)

심 사 위 원                          이병주 (인)

심 사 위 원                          정춘수 (인)

울 산 대 학 교 대 학 원

2018년 2월

# 목록

국문요약	1
I. 서론	2
II. 실험재료 및 방법	5
1. Cell culture	5
2. NaCl treatment	5
3. TonEBP overexpression	5
4. TonEBP siRNA	5
5. Animals	5
6. RNA isolation and cDNA synthesis	6
7. Real-time quantitative PCR analysis	6
8. Immunohistochemistry	6
9. Chromatin immunoprecipitation (ChIP)	7
III. 결과	8
1. In vitro에서 NaCl 처리에 따른 고장성 환경에서 TonEBP와 AVP의 발현	8
2. In vivo에서 탈수그룹과 같은 고장성 환경에서 TonEBP와 AVP의 발현	8
3. 탈수와 같은 고장성 환경에서 TonEBP와 AVP promoter의 직접적인 binding 확인	8
4. PVN과 SON에서 고장성 환경에서의 TonEBP와 AVP의 colocalization	9
5. STZ에 의해 유도된 당뇨 모델에서 TonEBP와 AVP의 발현	9
IV. Legend to figure	10
Table 1.	10
Table 2.	11
Figure 1.	12
Figure 2.	13
Figure 3.	14
Figure 4.	15
Figure 5.	16
V. 고찰	17

VI. 참고문헌	19
영문요약(Abstract)	23

## 국문요약

고장성 환경은 대부분의 기관의 세포들에게 스트레스를 일으킨다. 고장성 환경에서 체액의 volume이나 osmolality를 정확하게 조절하는 것은 생존의 기본 요소이다. 이것은 뇌의 hypothalamic-neurohypophyseal system (HNS)이라고 불리는 중앙 센터와 신장의 여과 시스템의 상호작용을 포함한다. HNS는 paraventricular nuclei (PVN)와 supraoptic nuclei (SON)에서 neuropeptide hormone인 arginine vasopressin (AVP)을 합성하고 분비함으로써 osmotic stress를 조절한다. 이러한 AVP는 신장으로 분비되어 물의 재흡수를 촉진시키는 역할을 한다. 그러나 아직까지 hyperosmolality에 의해 유도되는 AVP의 발현을 조절하는 전사조절인자와 그 기작은 명확히 밝혀지지 않았다. 또한 세포는 고장성 환경에서 살아남기 위하여 sorbitol, betain, myo-inositol과 같은 compatible osmolyte를 축적한다. 이러한 compatible osmolyte들은 각각 aldose reductase (AR), betaine transporter (BGT1), sodium/myo-inositol cotransporter (SMIT)에 의해서 만들어진다. Tonicity-responsive enhancer binding protein (TonEBP)는 cell의 항상성을 조절하는 필수적인 전사조절인자로서 hypertonicity-induced osmotic stress에 반응하여 AR, BGT1, SMIT와 같은 osmoprotective gene의 발현을 조절한다. TonEBP는 여러 조직에서 발현되지만 주로 뇌의 시상하부에서 발현된다고 알려져 있다. 특히 AVP가 합성되는 PVN과 SON에서 hyperosmotic 자극에 반응하여 TonEBP의 발현이 증가한다. 따라서 이 연구에서는 고장성 환경에서 AVP의 조절에 TonEBP가 어떠한 역할을 할 것인가에 대해 규명하고자 한다. 또한 TonEBP는 hyperosmotic 자극에 대해서 뿐만 아니라 diabetic retinopathy에서 hyperglycemia 상태를 조절하기 위하여 증가되고 AR을 증가시킨다. 이러한 당뇨와 같은 hyperglycemia 상태가 지속되면 당뇨병성 고혈당 삼투압 증후군 (Hyperosmolar hyperglycemic syndrom)이 생기는데 이 증후군은 극심한 탈수를 야기한다. 따라서 이 연구에서는 당뇨에 의한 극심한 탈수상태에서도 TonEBP와 AVP의 관계를 확인하고자 한다. 먼저 TonEBP와 AVP의 관계를 in vitro와 in vivo에서 확인하였다. SH-SY5Y 세포에서 NaCl을 처리한 고장성 모델과 쥐의 수분 섭취를 제한한 탈수 모델에서 TonEBP와 AVP의 mRNA 양이 증가되었다. 탈수로 인한 고장성 환경에서 면역조직화학법으로 TonEBP와 AVP의 colocalization이 증가되었다. 또한 Chromatin immunoprecipitation assay를 통해 TonEBP가 AVP promoter에 직접 결합하여 AVP를 조절하는 것을 확인하였다. streptozotocin에 의해 유도된 당뇨모델에서도 TonEBP와 AVP가 증가 되었다. 이러한 결과들은 쥐의 시상하부에서 탈수나 당에 의한 osmolality 증가와 같은 고장성 환경에 반응하여 TonEBP가 AVP의 발현 조절을 할 것이라 시사한다.

# I. 서론

시상하부(hypothalamus)는 시상 아래에 있는 특정 핵과 관련된 섬유의 집합체이다. 이것은 많은 중요한 항상성 기능에 대한 통합의 중심이고 자율신경계와 내분비계 사이를 중요하게 연결시키는 역할을 한다. 그 예로 시상하부는 체온조절, 섭식조절, 혈당조절, 갈증, 소변조절, 밤 낮 주기 조절과 같은 항상성을 조절하고, 뇌하수체 전엽과 후엽의 호르몬의 분비를 조절 한다.

그중에서 체내 수분의 균형을 유지시키는 능력은 생명체에 꼭 필요한 기본 요건이다[1]. 이것은 뇌의 hypothalamic-neurohypophyseal system (HNS) 이라고 불리는 중앙 센터와 신장의 여과 시스템의 상호작용을 포함한다[2]. HNS는 arginine vasopressin (AVP) 이라는 항이뇨 호르몬의 원천이다. AVP는 paraventricular nuclei (PVN)와 supraoptic nuclei (SON)의 커다란 magnocellular neurons(MCNs)과 PVN의 median eminence (ME)로 projection되어있는 parvocellular neurosecretory cell에서 합성이 되고, axon을 따라서 뇌하수체 후엽으로 이동한다[3].

AVP를 분비하는 magnocellular neuron은 neuron 자체가 osmoreceptor이다. 이 뉴런은 osmoreceptor의 기능을 하지만 blood-brain barrier (BBB)내에 위치하고 있어 작은 osmolality의 변화에는 빠르게 반응하지 못한다. 뇌의 osmoreceptor가 위치한 제 3뇌실의 세포벽 쪽에 있는 organum vasculosum of the lamina terminalis (OVLT)라고 불리는 뇌실주위기관은 BBB가 약하기 때문에 osmolality에 강하게 반응하고 직접적으로 MCNs에 흥분자극을 제공함으로써 AVP를 분비시킨다[2,4]. 분비된 AVP는 혈류를 통하여 신장에 도달하여 집합관의 물의 재흡수를 촉진시킴으로써 osmolality를 조절한다[5].

신장에는 AVP receptor중 G-protein coupled V2R이 가장 풍부하여 V2R-AVP-mediated signaling이 주를 이룬다. AVP는 V2R에 binding하여 adenylate cyclases (AC)를 활성화 시키고 intracellular second messenger인 cAMP를 증가시킨다. cAMP가 증가되어 protein kinase A (PKA)와 같은 cAMP-dependent한 protein kinase가 활성화 되면 aquaporin2(AQP2) channel이 활성화 되어 집합관의 principal cell에 위치하고 channel을 통해 물을 재흡수 시킨다[6,7].

하지만 PVN과 SON의 MCN에서 삼투자극에 대한 AVP의 발현을 조절하는 주된 전사조절 mechanism은 아직 확인되지 않았다. 최근 전사조절인자인 CREB3L1이 AVP 발현에 관련 있다고 보고되었지만 CREB3L1이 AVP 발현에 있어 주된 전사조절인자는 아니라고 확인되었다[8].

고장성 환경과 같이 osmolality가 변화하였을 때 우리 몸에서는 항상성을 유지하기 위해 또 다른 변화가 생기는데, sorbitol, betaine, myo-inositol, taurine,



glycerophosphocholine과 같은 uncharged small organic osmolyte를 만들어 세포내 전해질을 대체함으로써 osmolality를 조절 하는 osmoadaptive response가 일어난다. 이러한 osmolyte는 세포내 분자들에 대해서 구조와 기능을 변화시키지 않고 높은 수준으로 축적 될 수 있기 때문에 osmoadaptation에 있어서 중요한 역할을 한다. 특별한 효소와 transporter들이 이러한 osmolyte를 축적시키는데 sorbitol은 aldose reductase (AR), glycerophosphocholine는 neuropathy target esterase (NET)에 의해 합성이 되고 반면에 betaine, myo-inositol, taurine은 각각 betaine transporter (BGT1), sodium/myo-inositol cotransporter (SMIT), sodium/chloride-dependent taurine transporter (TAUT)에 의해 세포내로 uptake 된다. osmoprotective gene로 잘 알려져 있는 이러한 효소와 transporter들의 전사는 hyertonicity 자극에 의해서 조절되는데 이러한 유전자의 조절영역에 위치하는 tonicity-responsive enhancer (TonE)라고 알려져 있는 multiple enhancer에 tonicity-responsive enhancer binding protein (TonEBP)가 결합하면서 조절된다 [9,10].

TonEBP는 Rel family 속하는 전사조절인자이다. TonEBP는 처음 그 기능이 알려진 신장에서 뿐만 아니라 폐, 태반, 간 등 거의 모든 기관에서 발현이 되고 또한 뇌에서도 발현이 된다[11]. 뇌의 전 지역에 걸쳐 발현이 되지만 특히 시상하부의 신경핵인 PVN과 SON에서 주로 발현된다[12]. 이 신경핵은 항이뇨 호르몬인 AVP가 발현되는 곳인데, 흥미롭게도 TonEBP는 hyperosmotic 자극에 반응하여 이 뉴런에서의 발현이 증가한다[13]. 우리는 hyperosmotic 자극에 대하여 TonEBP와 AVP의 발현 변화를 관찰하였고 따라서 TonEBP가 AVP의 전사를 활성화 시킨다는 가설을 실험하였다.

최근에 TonEBP는 hypertonicity 자극에 대해서 뿐만 아니라 염증모델, 당뇨모델 등에서도 그 기능이 밝혀지고 있다[14-19]. 특히 diabetic retinopathy에서 TonEBP가 증가되고, hypertonicity 자극에 반응하여 TonEBP에 의해 전사가 조절 되는 osmoprotective gene중 하나인 AR이 diabetic retinopathy 모델에서 TonEBP에 의해 증가 된다는 보고가 있다[20]. AR은 glucose metabolism의 polyol pathway중 첫 번째 단계의 효소이다. 당뇨와 같은 hyperglycemia 상태에서는 glucose를 조절하기 위해 polyol pathway가 활성화 되는데 AR이 glucose를 sorbitol로 바꾸면서 glucose를 조절한다. 그러한 과정에서 발생하는 oxidative stress나 osmotic stress 등이 당뇨의 합병증을 유발하게 된다[21].

당뇨병에서 hyperglycemia 상태가 지속적이게 되면 당뇨병성 고혈당 고삼투압 증후군(Hyperosmolar hyperglycemic syndrome:HHS)이 생길 수 있다[22]. HHS는 극도로 높은 혈당 농도와 연관된 병으로 혈당 농도가 너무 높으면 신장이 소변을 통해 과다한 포도당 일부를 배출시키기 위해 배뇨가 증가하고, 또 혈액이 고농도가 되면 뇌를 포함한 다른 장기로부터 물을 빼내와 극심한 갈증을 느끼는 탈수 상태를 야기한다. 우리는 streptozotocin에 의해 유도된 당뇨모델에서 TonEBP와 AVP의

발현 변화를 관찰하였고 따라서 당뇨에 의한 극심한 탈수상태에서 TonEBP가 AVP를 조절한다는 가설을 실험하였다.

## II. 실험재료 및 방법

### Cell culture

SH-SY5Y 세포는 인간의 neuroblastoma 세포주이고 high glucose Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM, Hyclone, South Logan, UT)에 10% fetal bovine serum (FBS)와 100U/ml penicillin-streptomycin (Hyclone)이 포함된 배양액으로 37°C, 5%CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하였다.

### NaCl treatment

SH-SY5Y 세포에 고장성 및 고삼투압 스트레스를 유발시키기 위해 6 well plate에 2.3\*10<sup>5</sup>/well로 세포를 seeding 하였고 24시간 후 50mM NaCl, 100mM NaCl을 24시간 동안 처리하여 mRNA 발현을 확인하였다. 대조군은 NaCl을 첨가하지 않은 H-DMEM을 사용하였다.

### TonEBP overexpression

SH-SY5Y 세포에 TonEBP를 overexpression 시키기 위해 6 well plate에 2.3\*10<sup>5</sup>/well로 세포를 seeding 하였고 24시간 후에 Turbofect (Thermo scientific, Waltham, MA, USA)를 사용해서 대조군은 pCMV-myc(500ng), 실험군은 pCMV TonEBP-myc(500ng; Dr. Kwon, Ulsan National Institute of Science and Technology)을 transfection 하였다.

### TonEBP siRNA

SH-SY5Y 세포에 TonEBP를 knockdown시키기 위해 siRNA technique를 사용하여 target 유전자를 silencing시켰다. siRNA를 위한 oligonucleotide는 bioneer에서 구매하였다 (Deajeon, Korea). sequence는 table. 2에 나타내었다. 6 well plate에 2.3\*10<sup>5</sup>/well로 세포를 seeding 하였고 24시간 후 Turbofect (Thermo scientific, Waltham, MA, USA)를 사용해서 50nM siTonEBP를 처리하였다. 대조군은 동일한 농도의 Negative control siRNA를 이용하였다.

### Animals

실험동물로는 8주령의 C57BL/6 생쥐(Hyo Chang Bioscience, Tae-Ku, Korea)가 사용되었고, 동물실험은 울산대학교의 임상시험심사위원회(The Institutional Review Board of University of Ulsan)와 미국 국립 보건원의 실험동물사용과 주의 지침서(National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals)에 따라 수행 되었다. 생쥐들은 명암이 12시간 주기로 조절되며 23~25°C의 온도로 유지된 사육실에서 관리되었고 실험 전에 먹이와 물은 자유

롭게 공급되었다. 고삼투압성 스트레스를 유도시키기 위해 이틀 동안 물의 섭취를 제한시켰다. 또한 당뇨를 유발시키기 위해 streptozotocin (STZ; sigma)을 0.05M sodium citrate buffer(pH 4.5)에 180mg/kg으로 녹여 한번 복강주사 하였고 대조군은 buffer만 복강주사 하였다. 당뇨는 복강주사한지 3일후에 혈당농도로 확인하였고 확인 후 생쥐를 희생시켰다.

### **RNA isolation and cDNA synthesis**

Total RNA는 제조사가 제공하는 방법으로 Trizol reagent (Lugen Sci Co., Ltd)를 사용하여 분리되었다. 1ug/ul의 total RNA에 5X M-MLV reaction buffer (beamsbio), 5X DTT (beamsbio), 10mM dNTP (enzymomics), Oligo dT (QIAGEN), M-MLV Reverse Transcriptase (beamsbio)를 넣은 후 37°C에 2시간 incubation하여 cDNA를 얻었다.

### **Real-time quantitative PCR analysis**

안정한 상태인 RNA 발현을 PVN과 SON에서 확인하기 위해 합성한 cDNA 500ng/ul을 주형으로 Table. 1과 같이 제작한 primer를 이용하여 quantitative PCR (qPCR)을 진행하였다. cDNA는 95°C에서 10분간 배양한 후 이후 95°C에서 15초간 및 60°C에서 1분간 배양하여 총 45 cycles를 수행하였다. TonEBP와 AVP,  $\beta$ -actin의 모든 real-time quantitative PCR은 iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad, Hercules, CA)를 사용하여 수행하였다. PCR 결과는 측정된 Ct값을 기반으로  $\beta$ -actin 값으로 보정한 후  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  방법을 사용하여 계산하였다.

### **Immunohistochemistry**

0.1M PB, pH7.4로 perfusion 후 4% paraformaldehyde (PFA)로 fixation하였다. 4% PFA로 overnight post fixation 후에 free floating 방법으로 coronal section (50um)하였다. TonEBP와 AVP를 detection 하기 위하여 double-labeling immunofluorescence 방법을 이용하였다. section을 2% milk, 0.4% triton X in 0.1M PB solution을 이용하여 RT에서 30분간 blocking 하였다. washing 후에 goat anti-TonEBP antibody (1:100 in blocking solution; Santa Cruz Biotech., Santa Cruz, CA, Catalogue No. sc-5501)에서 4°C, overnight incubation 하였고 avidin-biotin complex 방법을 사용하여 (ABC Elite kit, Vector Laboratories) signal을 증폭하였다. section을 biotin-conjugated secondary antibody를 blocking solution에 1:1000으로 희석하여 2시간 incubation 하였다. FITC (TSA-Puls Fluorescein system PerkinElmer, Waltham, MA, USA)를 이용하여 TonEBP를 detection하였다. AVP를 확인하기 위해 3% BSA and 0.3% triton X in 0.1M PB 을 이용해서 RT에서 1시간 동안 blocking을 하였고 rabbit anti-AVP antibody(1:2000 in blocking solution; Santa Cruz Biotech., Santa Cruz, CA,

Catalogue No. sc-390723)에서 4°C, overnight incubation 하였다. washing 후에 Alexa Fluor 594 goat anti-rabbit IgG (Life technologies)를 blocking solution에 희석하여 RT에서 2시간 incubation 하였다.

### **Chromatin immunoprecipitation (ChIP)**

ChIP은 Michelle Kallesen, PhD 방법으로 수행되었다. 조직을 homogenization한 후 1% formaldehyde를 이용해서 crosslink를 시키고 125mM glycine을 넣어주었다. washing 후에 sonication을 통해 DNA를 조각내고 chromatin dilution buffer를 이용해서 5배 희석시켜 주었다. chromatin solution은 anti-TonEBP (Thermo scientific, Waltham, MA, USA) 5ug을 이용해서 4°C에서 overnight 면역침전을 시켜주었다. antibody/DNA complex를 reverse crosslinking 시켜주고 DNA를 정제하였다. AVP promoter 의 specific한 region을 인식하는 primer table. 1을 이용해서 RT-PCR을 하였다.

### III. 결과

#### 1. In vitro에서 NaCl 처리에 따른 고장성 환경에서 TonEBP와 AVP의 발현

고장성 환경은 우리 몸에 삼투 스트레스를 일으키게 된다. 이러한 삼투 스트레스에 대하여 우리 몸은 방어기작을 가지고 있다[10]. 삼투 스트레스에서 반응하는 TonEBP와 AVP가 어떠한 관계가 있는지 알아보기 위해 in vitro에서 고장성 환경을 유도했다. 먼저 in vitro에서 SH-SY5Y 세포에 대조군은 H-DMEM media로 실험군은 50mM, 100mM NaCl을 이용한 고장성 환경을 만들고 TonEBP와 AVP의 mRNA 발현을 확인하였다. 대조군에 비해 NaCl에 의한 고장성 환경에서 TonEBP와 AVP의 발현이 증가하였다 (Fig. 1A). TonEBP overexpression vector를 transfection 시킨 그룹에서 AVP의 발현이 증가하였다 (Fig. 1B). TonEBP를 siRNA를 이용해 knock down 시킨 그룹에서 AVP의 발현이 감소되었다 (Fig. 1C). 그 결과 고장성 환경은 TonEBP와 AVP를 증가시키고 TonEBP를 과발현 시키거나 knock down시켰을 때 AVP의 발현이 증가하고, 감소하는 것으로 보아 고장성 환경의 TonEBP가 AVP의 발현을 조절함을 보여준다.

#### 2. In vivo에서 탈수그룹과 같은 고장성 환경에서 TonEBP와 AVP의 발현

In vivo에서 고장성 환경을 유도하기 위해 C57BL/6 쥐에 48시간 동안 물의 섭취를 제한시켰다. 먼저 물의 섭취를 제한시킨 탈수그룹에서 몸무게가 대조군 보다 감소하는 것을 확인 하였고 먹이 섭취량 또한 감소하는 것을 확인 하였다 (Fig. 2A). 그리고 PVN과 SON에서 대조군과 탈수그룹의 TonEBP와 AVP의 mRNA 발현을 qPCR을 통해 확인하였다. PVN에서 TonEBP의 mRNA 발현양이 약 1.3배 증가하였고 AVP의 mRNA 발현양이 약 2배 증가하였다 (Fig. 2B). SON에서도 마찬가지로 TonEBP와 AVP의 mRNA 발현양이 각각 1.5배, 1.8배 증가하였다 (Fig. 2C). 따라서 in vivo에서도 물을 제한한 탈수 그룹과 같은 고장성 환경이 만들어졌을 때 TonEBP와 AVP의 발현이 증가하고 그들이 관계가 있음을 보여준다.

#### 3. 탈수와 같은 고장성 환경에서 TonEBP와 AVP promoter의 직접적인 binding 확인

AVP promoter 위에는 TonEBP가 binding할 수 있는 site가 존재한다. TonEBP가 AVP promoter에 직접적으로 binding하여 전사를 조절하는지 확인하기 위해 대조군과 탈수그룹에서 ChIP assay를 수행하였다. TonEBP-binding DNA 조각들은 specific한 mouse AVP promoter primer를 사용하여 RT-PCR을 통해 확인되었다. 정확한 size의 band가 TonEBP에 의해 면역 침전된 DNA에서 관찰되었다 (Fig. 3). 이것은 TonEBP가 AVP promoter에 직접적으로 binding하는 것을 보여준다. 또한 탈수 그룹에서 band의 강도가 증가하였다. 이것은 탈수그룹과 같은 고장성 환경에

서 TonEBP가 AVP promoter에 binding하는 것이 증가되었음을 보여준다. 따라서 TonEBP는 AVP의 전사를 조절하기 위해 AVP promoter에 binding을 하고 탈수 그룹에서 그 binding이 증가하였다.

#### 4. PVN과 SON에서 고장성 환경에서의 TonEBP와 AVP의 colocalization

PVN과 SON의 neuronal cell에서 TonEBP의 발현을 확인하였고 AVP를 double-immunofluorescent 염색으로 확인하였다 (Fig. 4A,B). PVN의 대조군에서 TonEBP와 AVP가 약하게 관찰되었고 탈수그룹에서 TonEBP와 AVP가 강하게 관찰되었다 (Fig. 4A). 또한 SON에서도 대조군에서 TonEBP와 AVP가 약하게 관찰되었고 탈수그룹에서 TonEBP와 AVP가 강하게 관찰되었다 (Fig. 4B). 60X의 confocal 이미지는 TonEBP와 AVP의 colocalization을 보여주고 PVN과 SON의 탈수그룹에서 TonEBP와 AVP의 colocalization이 증가하였다.

#### 5. STZ에 의해 유도된 당뇨 모델에서 TonEBP와 AVP의 발현

C57BL/6 쥐에 STZ를 복강 주사하여 당뇨를 유도하였다. STZ를 처리 후에 3일 동안 혈당을 측정하였고 STZ를 주사한 모델에서 대조군보다 혈당이 증가하였다 (Fig. 5A). 먹이섭취량은 STZ를 처리한 모델이 대조군보다 많았고 (Fig. 5B), 몸무게는 STZ를 처리한 모델이 대조군보다 감소하였다 (Fig. 5C). 또한 STZ를 처리한 모델에서 물의 섭취량이 급격하게 증가하였다 (Fig. 5D).

이렇게 STZ를 이용한 당뇨모델을 만든 후 PVN과 SON에서 대조군과 STZ를 주사한 모델의 TonEBP와 AVP의 mRNA 발현을 qPCR을 통해 확인하였다. PVN에서 TonEBP의 mRNA 발현양이 약 1.4배 증가하였고 AVP의 mRNA 발현양이 약 2.5배 증가하였다(Fig 5E). 그러나 SON에서는 TonEBP와 AVP의 발현에 차이가 없었다 (Fig 5F). 따라서 STZ에 의해 유도된 당뇨모델에서 TonEBP와 AVP의 발현은 PVN에서만 증가하고 PVN에서의 당에 의한 반응을 확인 하였다.

## IV. Legends to Figure

Table. 1 Primer sequences used in this study

Gene	Primer sequence (5'→3')	Accession number	Product size (bp)
TonEBP (mouse)	AAGCAGCCACCACCAAACATG AAATTGCATGGGCTGCTGCT	AF369980.1	137
AVP (mouse)	GCTTGTTTCCTGAGCCTGCT GCTCCATGTCAGAGATGGCC	BC051997.1	91
b-actin (mouse)	TGGAATCCTGTGGCATCCATGAAAC TAAAACGCAGCTCAGTAACAGTCCG	NM_007393.5	456
TonEBP (human)	TCGCCAGTTTACCAGCAGAC TTCTGAGCATCGGCAATAGG	BC146765.1	464
AVP (human)	TGTGTGCACCAGGATGCCT TCAGCTCCAGGTCGGACAT	NM_000490.4	131
GAPDH (human)	AGGGCTGCTTTTAACTCTGGT CCCCACTTGATTTTGGAGGGA	KJ891221.1	209
TonEBP-AVP binding site	TGGACCTGACATCCATTCAT GACAGCGGCTTTGTGTTATG	NC_000068.7	210



Table. 2 siRNA sequences used in this study

Gene	Sense	Antisense
Negative control siRNA	SN-1012 (AccuTarget Negative Control siRNA, 10 nmole, HPLC)	
siTonEBP	GACCAUGGUCCAAAUGCAA	UUGCAUUUGGACCAUGGUC

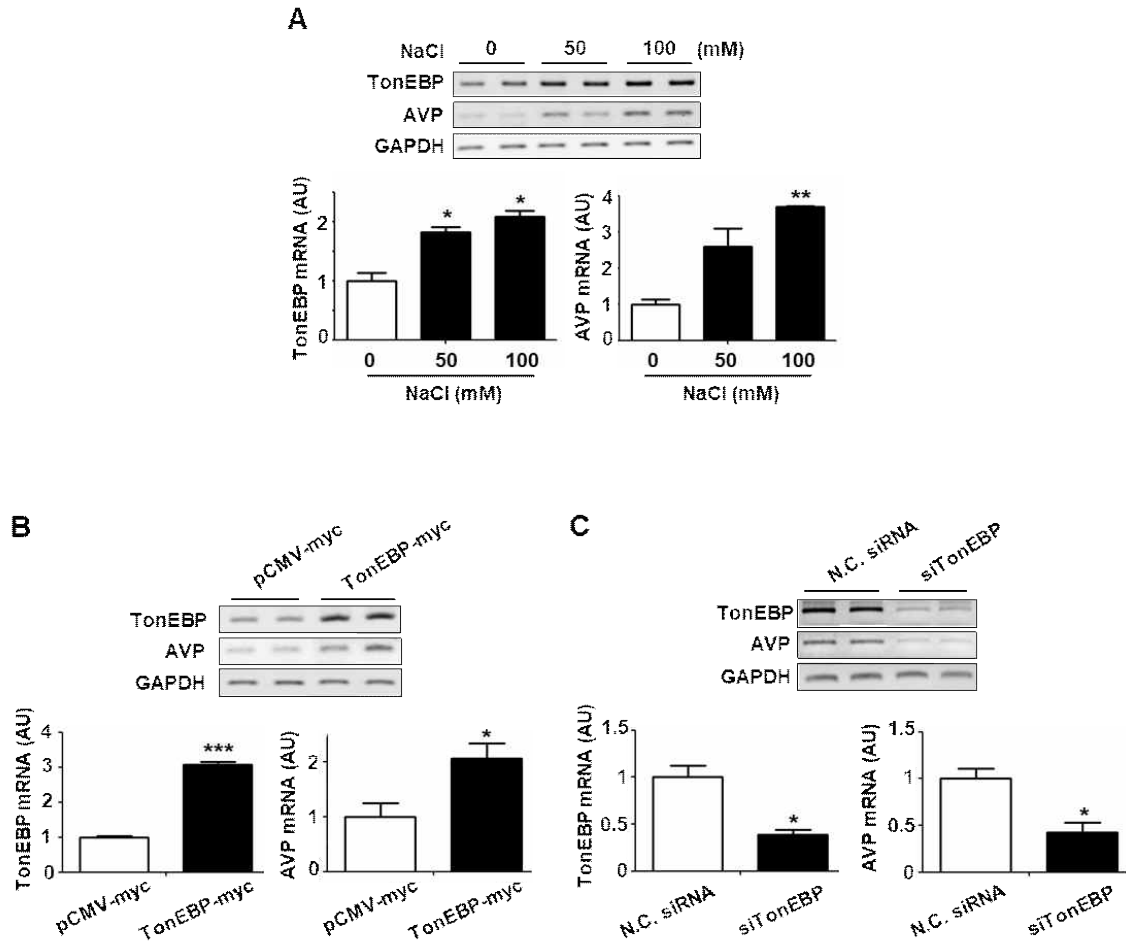


Fig. 1 In vitro에서 NaCl 처리에 따른 고장성 환경에서 TonEBP와 AVP의 발현 조사

(A) SH-SY5Y세포에 다양한 농도의 NaCl 처리 후, TonEBP와 AVP의 RNA발현 확인. (B) TonEBP를 과 발현시킨 SH-SY5Y세포에서 AVP mRNA 발현 확인. (C) siTonEBP(50nM) 이용하여 TonEBP를 knockdown시킨 SH-SY5Y세포에서 AVP의 mRNA 발현 확인. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.005$ .

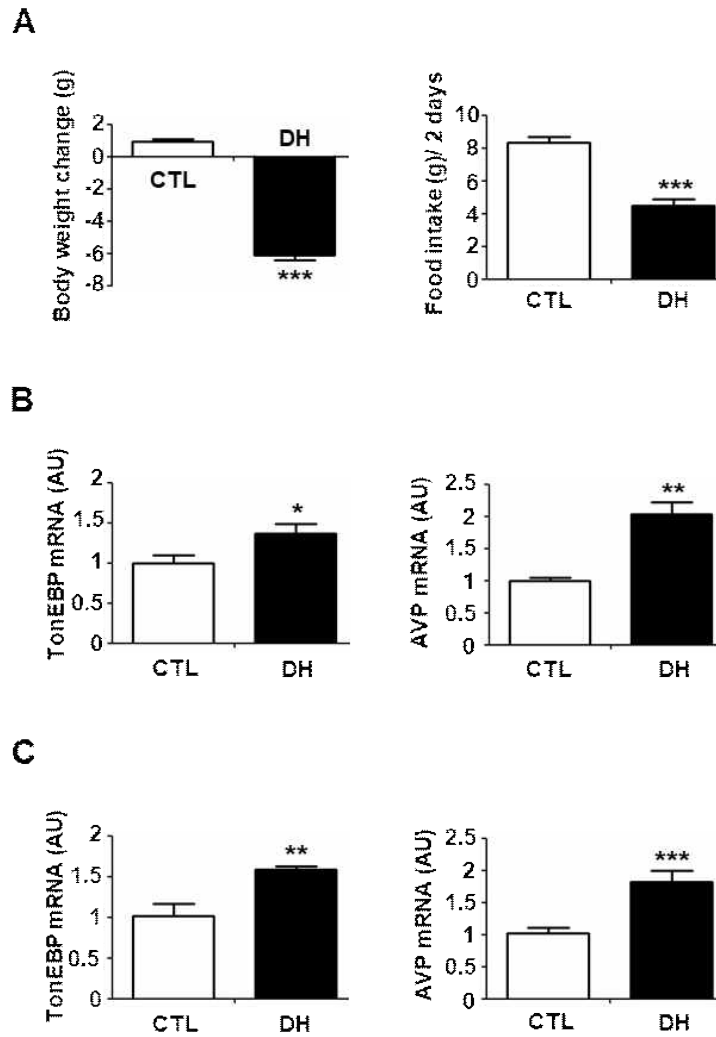


Fig. 2 마우스에서 탈수그룹과 같은 고장성 환경에서 TonEBP와 AVP의 발현 확인

(A) 대조군(CTL)과 48시간 동안 수분섭취를 제한한 탈수 그룹(DH)에서 몸무게와 먹이섭취량을 측정함. 대조군과 48시간 동안 수분섭취를 제한한 탈수 그룹 (DH)에서 (B) PVN과 (C) SON 지역에서의 TonEBP와 AVP 발현을 q-PCR을 통해 확인함 \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.005$ .

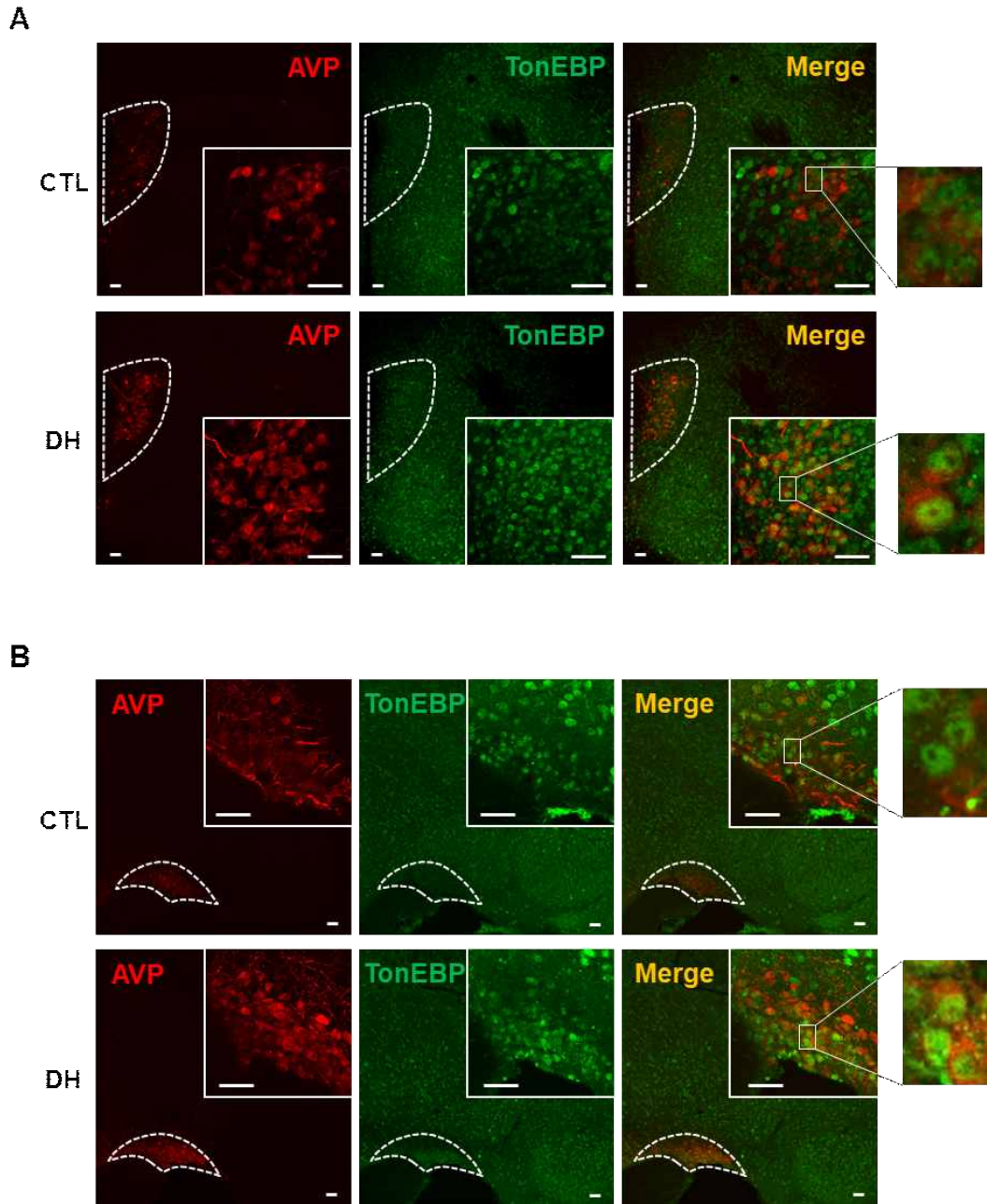


Fig. 3 탈수에 의한 고장성 환경에서 시상하부 신경핵의 TonEBP와 AVP의 colocalization 확인

탈수 그룹에서 시상하부의 (A) PVN과 (B) SON에 있는 TonEBP(green)와 AVP(red)의 colocalization을 immunohistochemistry를 이용하여 실험한 후, 20배율과 60배율로 colocalization을 확인함.

**A**

```

AGCTACAGATTTCAGACCOCTGTCTAGTATTGGGAAAAAAGAGCTATGAGGCTATCTGGGAGTCCATGTGGCATGTGGGAGGGGAGGACCTG
AACTGAAGAGAGCCAGCATGCTGTGGGACCTTTCCCTAGCCAGCAGAGATGCTAAGGCAGGTGAAGATTAGGTCCTGGACCTGACATC
CATTTCATGAAGCAGCAGAGACCOCTCAAAGCTCTGGTGGACATGCCACTCAAGGGCTCTGGACAGGCCAGACAATAGTCTGCCCAACG
CTCATCTTCAGTCCATTAGCGAAAAAGGTTTCTCTGACCAAGGAAGCTGTTCCCTGGGAAACAACTACTTAACAAGGACATTCAT
AACACAAAGCCGCTGTCTAGCTAACATCACCATGACGCAAGCACTTCCCTGGGGTTCATAGTAAGTGAATCAGGGCTCACAGCCCTGCAG
AGTGCCTGGCCCTTCACTACTTTATGCTGGAGTTAAGTGGGGAGTFCAGACACCCAGATGACCTGCCCAAGTCAGAAAGCTTCGAGGCATA
GAAGCCAGCATGTCCCTGGGCTTCTACATAGCAGCTGGCTCTTATCCCTCAAGTGCACCCAGTCATTCCTGAAAGGCTTCGGCCGCAC
TCCTGAGGATGGACGGCAGCTTGGCTCCCTGTCCCACTGTACTTGTGGGAAAGAGGCCAAACAGTCCCTGGAGCTCTTGAAGCATGC
TGGTGTACCCGGGAGGGGTGGCAAGAGCCGATGGGATGGGAGGCCCTGGCCCTATGCATGGCTTAGAAGCCCTGGCTAGGTGTGCATA
GGTCAAGCATAGGCCAACTAATCTGGGCCCAACCAATAAAGTTTTCTGGTGCCTSAAGTAAAGGAGTCTGTAAAGCCTAGAGCAGAAT
GGGTGATGCACCCCTGTAAACCTTAGCACTGGAGAGCCAGAGACAAAAGATGAAGAGCTCAAAGCCAGCTTTCAGCTGTGTAGTAAAGT
CAAGGCCAGCTGGACTAAACTAGACTGCTTTAGAAACAAACAACTGACTTACAGTCTAAATCAGGAATTACACCAGCTTCTCAGACTG
GCTCTGTTAGCTGGGTCTCCCTCCATTTCCTGTCTAGAAATAACACCCACTTCCAAATCCCTGGCTTAGACCTGAGATTTCCCAACCTCA
GGCCCTGGGGTCTCCCAAGCTCTTCCCTCTTTACGGCTGTGGGTCTCAACCAAGGACTATTTCTGAGCTATCTCACACCTAGCTTC
TACCTTAGAAGCCCTGGAACTCACAGAACTCTCCTGCTCTGCTTCCCAATGGCTGGGACTAAAGGCCACGCCACAGACTGGCTCTCTT
TTTATGTTTTTAAATATGAGACAGTGTCTPCACCAAGTTACTCAGTCTGGCCCTTGAACCTTTGACCTTCTACTTTAGCTTCCCAAGTGGC
TCTGACCCACAGGCCATGAAGCCAGATCCCTCTGTGAAGCTTTGCACCTTACTGAGCCCTGGAGTTGACATGGCCACCATAGCTTTCCCAT
TTGTCTCCTTAGTAGAAACAATGGGCACCTATCCCAAGCTCTCCCAACCCCGGCTTACAGGGTTATGATGGGATAGAAACATCCCTGT
GGGGCCCGAAGGCAGCCATGCTGGCACAGGGCAGACCTTTCACCTGTCTCAGCCCTGACCTCCATGACTGTGGCCCTTAGCCATGAGA
CTGCAAGTGGGAATTTCTTCTAAAGCCCACTGATGGGGTCTCCCTCATCCCTATACCAACAATAAACAAGCCCTGGCCACCCCTCT
GGTGTGACCCCTGCCAAAACCTGCCACCCCTTGTGGATGGGGCTGTGGACCCCTTTAGTCTGCTGAGAGCAGCTGGAATATTCACCT
ATGATTTCCAGGTGACCCCTCCAGTCCGCTCACTCCTGATCGCACAGCACCATCACTGTGGCAGTGGCTCTGTACACGGTGGCCGG
TGACAGCCCTGATGGCTGGCTCCCTCTCCACCCCTCTGCACTGACAGGCCACCTGGTCCCAAGATGCTGGAATCACTGCTGACAG
CTTGGGACCTGTGGCTGAGGGCTCCCTGGGAGCCACTGGGGAGGGGTAGCAGCCACTGTGGCTCTAGGAAACACTGCGACACA
TAAATAGGCAGCCCGCCCAAGGCAGCAGGCTGAGCTGCACACAGTGCACCCTTGGTGGCAGGATGCTCAACACTAGCCTCT
CCGCTTGTTT
    
```

**B**



Fig. 4 탈수에 의한 고장성 환경에서 TonEBP와 AVP promoter의 결합 조사

대조군(CTL)과 48시간 동안 수분섭취를 제한한 탈수그룹(DH)에서 TonEBP와 AVP의 결합을 확인하기 위하여 마우스의 뇌에서 ChIP assay를 진행한 결과 TonEBP와 AVP는 결합부위에서 반응함.

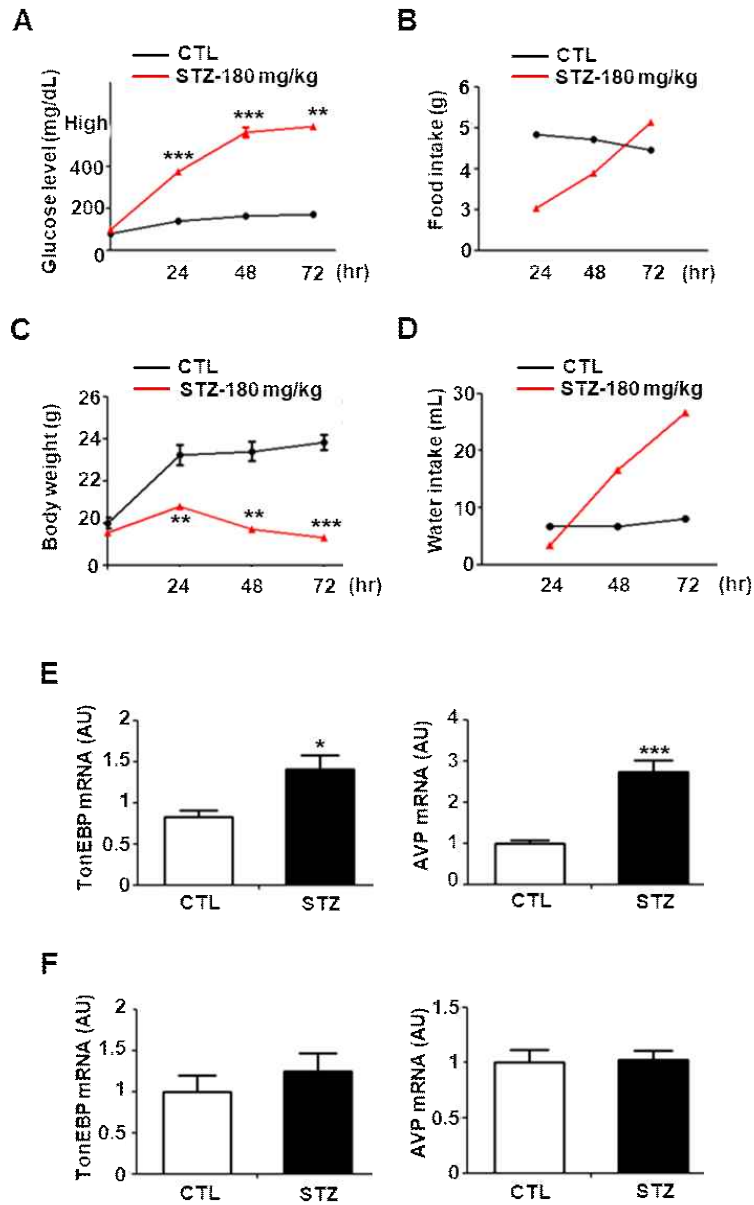


Fig. 5 STZ에 의해 유도된 당뇨모델에서 TonEBP와 AVP의 발현 확인

대조군은 0.05M sodium citrate buffer를 복강주사 하고 실험군은 0.05M sodium citrate buffer에 streptozotocin을 180mg/kg의 농도로 녹여 복강주사 함. 72시간 동안 (A) 혈당, (B) 먹이섭취량, (C) 몸무게 변화량, (D) 물 섭취량을 측정함. (E) PVN에서 TonEBP와 AVP 발현을 q-PCR을 통해 확인함. (F) SON의 TonEBP와 AVP 발현을 확인함. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.005$ .

## V. 고찰

설사, 발한, 비뇨기의 손실과 같은 상황을 통해 체내의 수분을 지나치게 잃게 되면 탈수 증상이 생길 수 있다. 이러한 탈수 증상은 신장에 다양한 방향으로 영향을 미치는데 그 중, 물이 체내로부터 빠져 나가게 되어 혈청의 osmolality가 증가하면 vasopressin의 활성을 증가시킨다[23]. 이러한 상황에서 활성화되는 AVP는 항이뇨 호르몬으로서 체내의 물을 재흡수 함으로써 체내의 수분을 유지시키는 역할을 한다. AVP는 시상하부의 시상핵 중 PVN과 SON의 magnocellular neurons에서 만들어지고 뇌하수체 후엽에 저장되어 탈수와 같은 상태가 지속되었을 때 혈류로 분비되어 신장에서 작용한다. 신장에서 AVP의 작용기전은 잘 알려져 있지만 어떻게 뇌에서 조절되는지는 아직 밝혀지지 않았다. 따라서 우리는 이러한 AVP가 뇌에서 어떻게 조절이 되는지 확인하기 위하여 실험을 진행하였다.

이렇게 osmolality가 증가 하였을 때 발현이 증가하는 분자 중에 TonEBP는 tonicity에 반응하여 항상성을 조절하는 분자로 잘 알려져 있다[24,25]. 이전의 연구에서 TonEBP는 hypertonicity 자극에 대하여 PVN과 SON에서 발현이 증가된다는 보고가 있었다[26]. 우리는 TonEBP가 2일동안 물을 제한한 탈수그룹에서 TonEBP의 mRNA 발현이 PVN과 SON에서 증가되는 것을 확인하였다. 또한 마찬가지로 AVP의 mRNA 발현도 PVN과 SON에서 증가되는 것을 확인하였다.

TonEBP는 T-세포에서 T-세포 수용체들의 활성화에 의해 표현이 뚜렷하게 증가되어 나타나기 때문에 nuclear factor activated T-cell 5 (NFAT5)라고도 하며 hypertonicity 자극에 대하여 TNF- $\alpha$ 나 lymphotoxin-b등과 같은 사이토카인들의 전사를 직접적으로 자극한다고 알려져 있다[27]. 이러한 NFAT family에는 1~5가 존재하는데 모두 Rel-homology domain을 가지고 있기 때문에 NF- $\kappa$ B와 같은 Rel-family에 속한다. 이러한 TonEBP가 활성화되기 위해서는 세포전체의 TonEBP 양이 증가되거나 세포질 내에서 세포핵으로의 재분포의 증가가 되는 두 가지 경로를 통해서 활성화가 이루어진다[28]. 따라서 hypertonicity 자극에 대하여 TonEBP의 분포가 어떻게 달라지는지 확인하기 위하여 추후 실험을 통하여 세포질과 세포핵을 분리하여 TonEBP의 단백질 발현양 차이를 확인하고자 한다.

TonEBP가 AVP 전사에 어떻게 관여하는지 확인하기 위해서 ChIP assay를 수행하여 TonEBP가 AVP에 직접적으로 binding하는 것을 확인하였다. 우리는 TonEBP binding site가 mouse AVP promoter에 2군데 있는 것을 확인하였지만 실질적으로 binding하는 곳은 1군데 (TGGAAAAA) 였다. 2일동안 물을 제한한 탈수그룹에서 이러한 binding이 증가함을 확인하여 TonEBP가 AVP를 조절하는 것은 AVP promoter에 직접 binding하여 조절함을 알 수 있다. 또한 IHC를 통하여 탈수그룹에서 TonEBP와 AVP의 colocalization이 증가하는 것을 확인하였다.

이러한 TonEBP는 osmotic 자극에 대한 변화뿐만 아니라 최근에는 여러 자극들에

대해서 그 기능이 밝혀지고 있다. 특히 당뇨모델에서 당이 증가하게 되면 고혈당에 의한 고삼투압성 증후군이 만들어질 수 있는데 이렇게 고혈당에 의한 osmolality가 변화되었을 때 TonEBP와 AVP의 관계를 확인하였다. 쥐에 STZ를 복강주사해서 당뇨모델을 만들었다. STZ를 주사한 그룹에서 당이 증가하는 것을 확인하였고, 이때 먹이 섭취량은 STZ를 주사한 직후는 당뇨모델의 먹이 섭취량이 훨씬 적었지만 3일 후에는 당뇨모델이 대조군보다 먹이 섭취량이 더 증가하였다. STZ에 의한 당뇨모델에서는 insulin의 분비에 장애가 생기기 때문에 glucose의 항상성이 똑바로 조절되지 못한다. 따라서 소변으로 당이 계속 배출이 되고 우리 몸에서는 더 많은 glucose를 얻기 위하여 먹이 섭취량이 증가하게 되는 것이다. STZ를 복강주사하고 난 직후의 먹이 섭취량이 적은 것은 STZ에 의한 독성에 의한 것이다. 이 당뇨모델에서는 당이 계속 배출되기 때문에 먹이 섭취량이 증가하여도 몸무게는 오히려 감소한 것을 확인하였다. 또한 당뇨모델에서 물먹는 양이 지나치게 증가하였는데 이로 인해 소변의 양도 많아진 것을 확인하였다.

이러한 당뇨모델의 PVN과 SON에서 TonEBP와 AVP의 mRNA 발현을 확인하였다. 당뇨모델의 PVN에서는 DH모델과 같이 TonEBP와 AVP가 모두 증가하였지만 SON에서 TonEBP와 AVP의 발현에는 차이가 없었다. SON에는 insulin receptor와 glucokinase를 발현한다. insulin receptor와 glucokinase는 glucose 또는 metabolic sensors의 hollmark이다. SON에서 insulin과 glucose 각각에 의해 AVP의 분비가 증가 하지만 glucose와 insulin을 함께 반응시켰을 때 AVP의 분비가 더 많이 증가한다[29]. 즉 glucose와 insulin을 함께 반응 시켰을 때 synergy 효과를 나타낸다. 하지만 우리는 STZ를 이용한 당뇨모델을 만들었는데 이때 STZ는 췌장의 b-cell을 파괴하여 insulin이 분비되지 못하게 하므로 insulin이 없는 상태이다. 따라서 우리의 결과에서 STZ에 의해 유도된 당뇨모델에서는 SON에서 AVP의 분비를 자극시키지 못한다고 생각된다.

이상의 결과를 요약하면 TonEBP는 osmotic 자극을 받았을 때 PVN과 SON에서의 발현이 증가하고 AVP에 직접적으로 binding하여 AVP의 전사를 활성화 시킨다는 것을 시사한다. 더 나아가 TonEBP가 유전적으로 결핍된 TonEBP heterozygous 쥐를 이용하여 AVP를 조절하는데 있어 TonEBP가 AVP를 조절하는 주된 전사조절인자인지 확인할 필요가 있고, 어떠한 신호 기작으로 이를 조절하는지에 대한 연구가 필요 할 것이다.



## VI. 참고문헌

1. Antunes-Rodrigues J, de Castro M, Elias LL, Valença MM, McCann SM (2004) Neuroendocrine control of body fluid metabolism. *Physiol Rev* 84(1):169–208.
2. Agnieszka Konopacka, Jing Qiu, Song T. Yao, Michael P. Greenwood, Mingkwan Greenwood, Thomas Lancaster, Wataru Inoue, Andre de Souza Mecawi, Fernanda M.V. Vechiato, Juliana B.M. de Lima, Ricardo Coletti, See Ziau Hoe, Andrew Martin, Justina Lee, Marina Joseph, Charles Hindmarch, Julian Paton, Jose Antunes-Rodrigues, Jaideep Bains, and David Murphy (2008) Osmoregulation Requires Brain Expression of the Renal Na-K-2Cl Cotransporter NKCC2. *The Journal of Neuroscience* 35(13):5144–5155.
3. Brownstein MJ, Russell JT, Gainer H (1980) Synthesis, transport, and release of posterior pituitary hormones. *Science* 25;207(4429):373–8.
4. Verbalis JG (2007) How does the brain sense osmolality? *J Am Soc Nephrol* 18(12):3056–9.
5. Breyer MD1, Ando Y (1994) Hormonal signaling and regulation of salt and water transport in the collecting duct. *Annu Rev Physiol* 56:711–39.
6. Hasler U, Jeon US, Kim JA, Mordasini D, Kwon HM, Féraillé E, Martin PY (2006) Tonicity-responsive enhancer binding protein is an essential regulator of aquaporin-2 expression in renal collecting duct principal cells. *J Am Soc Nephrol* 17(6):1521–31.
7. Kortenoeven ML, Pedersen NB, Rosenbaek LL, Fenton RA (2015) Vasopressin regulation of sodium transport in the distal nephron and collecting duct. *Am J Physiol Renal Physiol* 309(4):F280–99.
8. Greenwood M, Bordieri L, Greenwood MP, Rosso Melo M, Colombari DS, Colombari E, Paton JF, Murphy D (2014) Transcription factor CREB3L1 regulates vasopressin gene expression in the rat hypothalamus. *J Neurosci*

34(11):3810–20.

9. Cheung CY, Ko BC (2013) NFAT5 in cellular adaptation to hypertonic stress – regulations and functional significance. *J Mol Signal* 8(1):5.
10. Neuhofer W, Beck FX. (2006) Survival in hostile environments: strategies of renal medullary cells. *Physiology (Bethesda)* 21:171–80.
11. Miyakawa H, Woo SK, Dahl SC, Handler JS, Kwon HM (1999) Tonicity-responsive enhancer binding protein, a rel-like protein that stimulates transcription in response to hypertonicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(5):2538–42.
12. Maallem S, Berod A, Mutin M, Kwon HM, Tappaz ML (2006) Large discrepancies in cellular distribution of the tonicity-induced expression of osmoprotective genes and their regulatory transcription factor TonEBP in rat brain. *Neuroscience* 142(2):355–68.
13. Maallem S, Mutin M, Kwon HM, Tappaz ML (2006) Differential cellular distribution of tonicity-induced expression of transcription factor TonEBP in the rat brain following prolonged systemic hypertonicity. *Neuroscience* 137(1):51–71.
14. Bingmei Yang, Andrea D. Hodgkinson, Peter J. Oates, Hyug Moo Kwon, Beverley A. Millward, Andrew G. Demaine (2006) Elevated Activity of Transcription Factor Nuclear Factor of Activated T-Cells 5 (NFAT5) and Diabetic Nephropathy. *DIABETES VOL.* 55.
15. YJ Yang, YY Han, K Chen, Y Zhang, X Liu, S Li, KQ Wang, JB Ge, W Liu, J Zuo (2015) TonEBP modulates the protective effect of taurine in ischemia-induced cytotoxicity in cardiomyocytes. *Cell Death and Disease* e2025; doi:10.1038.
16. Soo Youn Choi, Hwan Hee Lee, Jun Ho Lee1, Byeong Jin Ye, Eun Jin Yoo, Hyun Je Kang, Gyu Won Jung, Seung Min An, Whaseon Lee-Kwon, Mario Chiong, Sergio Lavandero, Hyug Moo Kwon (2016) TonEBP suppresses IL-10-mediated immunomodulation. *Scientific Reports* 6:25726 DOI:

10.1038.

17. Ga Ram Jeong, Sun-Kyoung Im, Yun-Hee Bae, Eun Su Park, Byung Kwan Jin, Hyug Moo Kwon, Beom-Joon Lee, Youngmin Bu, Eun-Mi Hur, Byoung Dae Lee (2016) Inflammatory signals induce the expression of tonicity-responsive enhancer binding protein (TonEBP) in microglia. *Journal of Neuroimmunology* 295-296.
18. HJ Shin, H Kim, RW Heo, HJ Kim, WS Choi, HM Kwon, GS Roh (2014) Tonicity-responsive enhancer binding protein haplodeficiency attenuates seizure severity and NF- $\kappa$ B-mediated neuroinflammation in kainic acid-induced seizures. *Cell Death and Differentiation* 1095-1106.
19. Keri Man Chi Mak, Amy Cheuk Yin Lo, Amy Ka Man Lam, Patrick Ka Kit Yeung, Ben Chi Bun Ko, Stephen Sum Man Chung, Sookja Kim Chung (2012) Nuclear Factor of Activated T Cells 5 Deficiency Increases the Severity of Neuronal Cell Death in Ischemic Injury. *Neurosignals* ;20:237-251.
20. Park J, Kim H, Park SY, Lim SW, Kim YS, Lee DH, Roh GS, Kim HJ, Kang SS, Cho GJ, Jeong BY, Kwon HM, Choi WS (2014) Tonicity-responsive enhancer binding protein regulates the expression of aldose reductase and protein kinase C  $\delta$  in a mouse model of diabetic retinopathy. *Exp Eye Res* 122:13-9.
21. Lorenzi M (2007) The polyol pathway as a mechanism for diabetic retinopathy: attractive, elusive, and resilient. *Exp Diabetes Res* 61038.
22. Pasquel FJ, Umpierrez GE (2014) Hyperosmolar hyperglycemic state: a historic review of the clinical presentation, diagnosis, and treatment. *Diabetes Care* 37(11):3124-31.
23. Roncal-Jimenez C, Lanaspa MA, Jensen T, Sanchez-Lozada LG, Johnson RJ (2015) Mechanisms by Which Dehydration May Lead to Chronic Kidney Disease. *Ann Nutr Metab* 66 Suppl 3:10-3.
24. Woo SK, Lee SD, Kwon HM (2002) TonEBP transcriptional activator in

the cellular response to increased osmolality. *Pflugers Arch* 444(5):579–85.

25. Jeon US, Kim JA, Sheen MR, Kwon HM (2006) How tonicity regulates genes: story of TonEBP transcriptional activator. *Acta Physiol (Oxf)* 187(1–2):241–7.
26. Maallem S, Mutin M, Kwon HM, Tappaz ML (2006) Differential cellular distribution of tonicity-induced expression of transcription factor TonEBP in the rat brain following prolonged systemic hypertonicity. *Neuroscience* 137(1):51–71.
27. López-Rodríguez C, Aramburu J, Jin L, Rakeman AS, Michino M, Rao A (2001) Bridging the NFAT and NF- $\kappa$ B families: NFAT5 dimerization regulates cytokine gene transcription in response to osmotic stress. *Immunity* 15(1):47–58.
28. WK Park (2004) The abundance and nuclear distribution of TonEBP in response to changes of tonicity in hyperglycemic cells. *대한내분비학회지 제 19권 제 5호*
29. Zhilin Song, Barry E. Levin, Wanida Stevens, Celia D. Sladekcorresponding author (2014) Supraoptic oxytocin and vasopressin neurons function as glucose and metabolic sensors. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 306(7): R447-R456.

## Abstract

The hyperosmotic environment causes stress in most organism. So, accurately controlling the volume or osmolality of body fluids is a fundamental element of survival in a hypertrophic environment. It involves interaction of control center called the hypothalamic–neurohypophyseal system (HNS) and the filtration machinery of the kidney. The HNS controls osmotic stress through the synthesis and release of the neuropeptide hormone, arginine vasopressin (AVP) in paraventricular nuclei (PVN) and supraoptic nuclei (SON). AVP is released into the kidneys and promotes reabsorption of water. However, the transcription factor that regulates the AVP gene expression by hyperosmolality and the mechanism are still unknown. Cells accumulate compatible osmolytes like a sorbitol, betaine, myo–inositol to survive against hypertonicity. The compatible osmolyte is catalyzed by the aldose reductase (AR), betaine transporter (BGT1) and sodium/myo–inositol cotransporter (SMIT). Tonicity–responsive enhancer binding protein (TonEBP) is an essential transcription factor that regulates cellular homeostasis. It controls the expression of osmoprotective gene such as AR, BGT1 and SMIT in response to hypertonicity condition. TonEBP expressed in many tissue but is mainly expressed in the hypothalamus of the brain. In particular, the expression of TonEBP increases in response to hyperosmotic stimulation in PVN and SON in which AVP is synthesized. Therefore, the purpose of this study is to investigate the role of the transcription factor TonEBP in the regulation of AVP gene expression in hypertonicity condition. TonEBP also increases AR to control hyperglycemia status in diabetic retinopathy as well as hyperosmotic condition. Persistent hyperglycemia leads to Hyperosmolar hyperglycemic syndrom (HHS), which causes severe dehydration. Thus, in this study, we investigated the relationship between TonEBP and AVP in extreme dehydration due to diabetes. First, we identified the relationship between TonEBP and AVP in vitro and in vivo. The mRNA level of TonEBP and AVP was increased in the hyperosmotic condition treated with NaCl in SH–SY5Y cells and the dehydrated mouse. Colocalization of TonEBP and AVP was increased by immunohistochemistry in the hyperosmotic condition due to dehydration. Also, direct binding of TonEBP to the AVP promoter was shown by chromatin immunoprecipitation. The mRNA level of TonEBP and AVP was increased in streptozotocin–induced diabetes model. These results suggest that TonEBP

regulates the expression of AVP gene in response hypersomotic condition such as dehydration and increased osmolality by glucose in the mouse hypothalamus.