

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory

Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Jana Novotná

Molekulární mechanismy adaptace živočišných buněk na hyperosmotický stres

Molecular mechanism of animal cells adaptation on hyperosmotic induced stress

Bakalářská práce

Vedoucí práce: Mgr. Ing. Jiří Vávra

Praha, 2022

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 1.5.2022

Jana Novotná

Poděkování

Ráda bych poděkovala svému školiteli Mgr. Ing. Jiřímu Vávrovi za jeho celkovou pomoc při sepsání bakalářské práce, za jeho cenné rady, ochotu, velice milý, osobitý přístup a čas, který mi věnoval při řešení dané problematiky. Poděkování rovněž patří svým rodičům, příteli a přátelům za jejich podporu a sílu, kterou mi dodávali.

Abstrakt

Nejrůznější buněčné typy, které tvoří živočišné tkáně, se musí vyrovnávat a extracelulárními změnami osmolarity, aby si udržely svou homeostázu. Hypertonicita (zvýšená osmolarita) je jedním z faktorů, který v buňkách spouští komplexní odpověď. Aby byla buňka schopna se s tímto stresem vyrovnat, musí zapojit regulační kaskády, které buď prostřednictvím WNK kináz regulují transportéry iontů anebo je prostřednictvím transkripčního faktoru TonEBP/NFAT5 spuštěna exprese genů pro transportéry kompatibilních osmolytů. Fyziologicky jsou hypertonicitě vystaveny buňky dřeně ledvin, chrupavek, buňky tkáně vnitřního ucha, ve specializovaných neuronech anebo buňkách bukalního epitelu. Práce shrnuje základní a aktuální poznatky o adaptaci buněk na zvýšenou osmolaritu okolního prostředí.

Klíčová slova: Hyperosmolarita, osmotický stres, TonEBP, WNK kinázy, NF- κ B, HSP70

Abstract

Various types of cells animal tissues consist of need to adapt to intracellular as well as extracellular osmotic changes in order to maintain homeostasis. Hypertonicity (increased osmolarity) is one of the factors activating complex cellular reactions. In order to manage such stress, a cell needs to incorporate regulation pathways that can either regulate ion transporters through WNK kinases or activate gene expression of transporters of compatible osmolytes through the transcription factor TonEBP/NFAT5. Physiologically exposed to hypertonic conditions are cells in renal medulla, cartilage, inner ear tissues, in specialised neurons or buccal epithelium. This work includes basic and current knowledge about the adaption of cells to increased osmolarity of outer environment.

Key words: Hyperosmolarity, osmotic stress, TonEBP/NFAT5, WNK kinases, NF- κ B, HSP70

Obsah

1. Úvod	1
2. Mechanismy registrace osmolarity prostředí	2
2.1. Primární cilie	2
2.2. OSM protein	3
2.3. TRPV1 receptor	3
2.4. WNK kinázy	5
3. Regulační kaskády a elementy zajišťující reakci buňky na hyperosmolaritu	7
3.1. Transkripční faktor NF- κ B	8
3.2. Protein Arp2/3	9
3.3. Transkripční faktor TonEBP (NFAT5)	11
4. Mechanismy adaptace na osmotický šok	12
4.1. Transportéry osmoticky aktivních částic	13
4.1.1. Betainový transportér	13
4.1.2. Taurinový transportér	13
4.1.3. <i>Myo</i> -inositolový transportér	14
4.1.4. Transportéry aminokyselin	15
4.1.5. Transportéry anorganických iontů	16
4.1.5.1. Transportér NKCC1	16
4.1.5.2. Transportér NKCC2	16
4.1.5.3. Transportéry KCC	17
4.2. Enzymy syntetizující kompatibilní osmolyty	17
4.2.1. Aldoso-reduktáza (AR)	17
4.3. Proteiny HSP70	18
4.4. Protein OSP94	20
4.5. Cyklooxygenasa – 2 (COX-2)	21
4.6. Autofagie	22
5. Závěr	23
6. Literatura	24

Seznam zkratk:

AR	Aldose reductase	Aldoso-reduktáza
Akt	Protein kinase B	Protein kináza B
Arp 2/3	Actin related protein 2/3	Protein související s aktinem 2/3
BGT1	Betain/GABA transporter 1 Na ⁺ /Cl ⁻ coupled betaine transporter	Betain/GABA transportér 1 Na ⁺ /Cl ⁻ spřažený betainový transportér
Bcl-2	B-cell lymphoma	B-buněčný lymfom
CCL2	C-C motif of chemokine ligand 2	C-C motiv chemokinového ligandu 2
Cdc42	Cell division control protein 42	Protein pro řízení buněčného dělení 42
CDO	Cysteine dioxygenase	Cystein dioxygenáza
COX-2	Cyclooxygenase -2	Cyklooxygenáza -2
CSD	Cysteine sulfinatase decarboxylase	Cysteinsulfinát dekarboxyláza
DCT	Distal convoluted tubule	Distální stočený tubulus
EGFR	Epidermal growth factor receptor	Receptor epidermálního růstového faktoru
ERK	Extracellular signal-regulated Kinase	Kináza regulovaná extracelulárním signálem
ESC	Endometriosis stromal cells	Endometriózní stromální buňky
GSK-3 β	Glycogen synthase kinase - 3 β	Glykogensyntáza kináza - 3 β
HSP70	Heat shock protein 70 kDa	Protein tepelného šoku 70 kDa
HUVEC	Human umbilical vein endothelial cells	Endoteliální buňky lidské pupečnickové žíly
I κ B α	Nuclear factor - κ B inhibitor α	Inhibitor α jaderného faktoru - κ B
IKK- β	Inhibitor of nuclear factor κ -B kinase subunit beta	Inhibitor beta podjednotky kinázy jaderného faktoru κ -B
IL – 6,8, 1 α ,1 β	Interleukin - 6, 8, 1 α , 1 β	Interleukin - 6, 8, 1 α , 1 β

IMCD-K2	Inner medullary collecting duct-K2	Vnitřní medulární sběrný kanálek-K2
JNK1	c-Jun N-terminal kinase 1	c-Jun N-terminální kináza 1
KCC	K ⁺ /Cl ⁻ cotransporter	K ⁺ /Cl ⁻ kotransportér
MCP1	Monocyte Chemoattractant Protein-1	Monocytový chemoatraktantový Protein-1
MDCK	Madin-Darby canine kidney cells	Madin-Darby psí ledvinové buňky
MEKK3	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 3	Mitogenem aktivovaná protein kináza kináza kináza 3
MKK3	Dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase3	Duálně specifická mitogenem aktivovaná protein kináza kináza3
MO-25	Mouse protein-25	Myší protein-25
NFAT5	Nuclear factor of activated T-cells 5	Jaderný faktor aktivovaných T-buněk 5
NF-κB	Nuclear factor-κB	Jaderný faktor-κB
NKCC	Na ⁺ /K ⁺ /2Cl ⁻ cotransporter	Na ⁺ /K ⁺ /2Cl ⁻ kotransportér
NOS2	Nitric oxide synthase 2	Syntáza oxidu dusnatého 2
NP	<i>Nucleus pulposus</i>	Pulpózní jádro
ORE	Osmotic response element	Element citlivý na osmoticitu
OREBP	Osmotic response element binding protein	Vazebný protein elementu citlivého na osmoticitu
OSP94	Osmotic stress protein 94 kDa	Protein osmotického stresu 94 kDa
OSM	Osmosensing scaffold protein for MEKK 3	Osmosenzitivní lešenový protein pro MEKK3
OSR1	Oxidative-stress-responsive kinase 1	K oxidativnímu stresu citlivá kináza 1
OVL1	<i>Organum vasculosum</i> of the lamina terminalis	<i>Organum vasculosum</i> terminální laminy
PA28α	Proteasome activator 28α	Proteasomový aktivátor 28α
PGE2	Prostaglandin E2	Prostaglandin E2
PGI2	Prostaglandin I2	Prostaglandin I2
PKCμ	Protein kinase Cμ	Proteinkináza Cμ

PLC- γ 1	Phospholipase C- γ 1	Fosfolipáza C- γ 1
PLC	Phospholipase C	Fosfolipáza C
PPAR δ	Peroxisome proliferator-activated receptor δ	Receptor δ aktivovaný peroxisomovým proliferátorem
PRR	(Pro) renin receptor	(Pro) reninový receptor
p38 MAPK	p38 mitogen-activated protein kinases	p38 mitogenem aktivovaná proteinkináz
PTGS2	Prostaglandin endoperoxide synthase2	Prostaglandin endoperoxid syntáza 2
Rac1	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1	Substrát C3 botulotoxinu související s Ras 1
RMIC	Renal medullary interstitial cells	Ledvinové medulární intersticiální buňky
SMIT	Na ⁺ / <i>myo</i> -inositol cotransporter	Na ⁺ / <i>myo</i> -inositolový kotransportér
PASK/SPAK	STE20/SPS1 related proline alanine rich kinase	STE20/SPS1 příbuzná na prolin a alanin bohatá kináza
TAD	Transactivation domains	Transaktivační domény
TAUT	Taurin transporter	Tautinový transportér
TNF- α	Tumor necrosis factor α	Faktor nádorové nekrózy α
TonE	Tonicity response element	Element citlivý na tonicitu
TonEBP	Tonicity response element binding protein	Vazebný protein elementu citlivého na tonicitu
TRPM3	Transient receptor potential cation channel subfamily M member 3	Člen podrodiny M přechodného receptorového potenciálu kationtového kanálu 3
TRPV1	Transient receptor potential cation channel subfamily V member 1	Člen podrodiny V přechodného receptorového potenciálu kationtového kanálu 1
TRPV4	Transient receptor potential cation channel subfamily V member 4	Člen podrodiny V přechodného receptorového potenciálu kationtového kanálu 4
WNK	With no lysine (K) kinase	Kináza bez lysinu (K)

1. Úvod

Celá řada buněčných typů je vystavena hyperosmotickému stresu (vyšší osmolaritě okolního prostředí než je osmolarita cytoplazmy buněk), na který se musí adaptovat. Spuštění adaptačního mechanismu je závislé na nejrůznějších regulačních kaskádách, které jsou v reakci na hyperosmotický stres aktivovány. Buňky ledvin jsou fyziologicky vystaveny výrazným změnám osmolarity během své normální funkce *in vivo* (Kültz and Chakravarty 2001; Cheng et al. 2015). Ovšem změnám osmolarity musí čelit i další buněčné typy jako například astrocyty a neurony, chondrocyty, endoteliální buňky, buňky *nucleopulposus*, monocyty a makrofágy, dráhy zapojené do reakce na osmotický stres jsou rovněž důležité pro funkci lymfocytů *in vivo* během imunitní odpovědi (Denkert et al. 1998; De Angelis et al. 1999; Bitoun and Tappaz 2000; Petronini et al. 2000; Go et al. 2004; Ciura and Bourque 2006; Maallem et al. 2006; Tsai et al. 2006; Pukale et al. 2021). Regulační kaskády napříč buněčnými typy končí u transkripčního faktoru TonEB, který řídí expresi genů pro produkci kompatibilních osmolytů a ty následně pomohou buňkám se se změnou osmolarity vyrovnat. U lymfocytů je také nutný pro normální buněčnou proliferaci za hyperosmotických podmínek, ale je také nezbytný pro optimální adaptivní imunitu (Go et al. 2004). V buňkách *nucleus pulposus* meziobratlových plotének může být signalizace prostřednictvím TonEBP zapojena do patogeneze zánětlivého onemocnění a revmatoidní artritidy (Johnson et al. 2016). Exprese proteinů typických pro reakci na zvýšenou osmolaritu je významná ve vnitřním uchu, kde je indukována v reakci na hlasitý zvukový stres a nejspíš hraje i potenciální roli související s buněčnou adaptací na specifické endoperilymfatické iontové a osmotické prostředí vnitřního ucha (Yamamoto et al. 2009; Kim et al. 2012). V buňkách HUVEC (human umbilical vein endothelial cells) hypertonicita zvyšuje expresi TonEBP a dochází k indukci apoptózy endoteliálních buněk, která souvisí s Aneurysmatem břišní aorty (AAA= Abdominal aortic aneurysm)(Xie et al. 2021). Hlavním cílem této práce je tedy přinést základní přehled známých fyziologických regulací v živočišné buňce při stresu navozeném zvýšenou osmolaritou prostředí. Vzhledem k tomu, že hyperosmotický šok je komplexní děj, zasahující buňku jako celek, uvádíme níže přehled mechanismů a součástí buňky, které jsou podle našeho názoru nejdůležitější.

2. Mechanismy registrace osmolarity prostředí

V následující kapitole uvádíme stručný přehled dosud známých mechanismů, kterými buňky vyšších živočichů zaznamenávají změnu osmolarity ve svém okolí. Vzhledem k diferenciaci tkání živočichů do různých, specializovaných buněčných typů se pochopitelně nemusí všechny mechanismy se stejnou četností vyskytovat v každém z nich. Přehled se tedy týká spíše jakési zobecněné živočišné buňky.

2.1. Primární cilie

Řasinky epitelálních buněk, tzv. primární cilie, neslouží pouze ke zvětšení absorpčního povrchu apikální strany buněk, ale jsou zodpovědné i za mechanorecepci. Mechanickým ohýbáním cilií došlo ke vtoku vápníku do buněk linie MDCK (a následnému uvolnění vápníku z vnitrobuněčných zásob). Protein zodpovědný za transdukcii signálu je zřejmě polycystin 1 a 2 (Praetorius and Spring 2001; 2003). Primární cilie jsou nejspíš také zodpovědné za registraci osmolarity v epitelálních buňkách ledvin. Tato registrace je pravděpodobně zajištěna prostřednictvím proteinu TRPM3 (Siroky et al. 2017). Stejně tak v ciliích prasečích cholangiocyty, tedy buněk vystylajících žlučové cesty, byla popsána schopnost registrovat osmolaritu prostředí, nejspíš pomocí receptoru TRPV4. V tomto případě byla ale změna intracelulárního vápníku indukována hypoosmotickými podmínkami (Gradilone et al. 2007). Nicméně se zdá, že receptor TRPV4 se účastní registrace snížené osmolarity v okolí buněk (hypoosmolarity), proto se mu již dále nevěnujeme (Phan et al. 2009; Sadowska et al. 2020). Tyto příklady dokládají význam cilií v osmoticky namáhaných epitelálních buňkách jakožto kompartmentu, ve kterém mohou být soustředěny samotné receptory osmolarity.

2.2. OSM protein

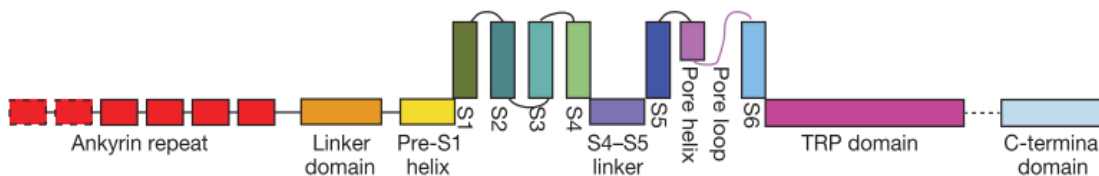
OSM protein, též Malcaverin je kódován genem *CCM2*, podle mozkové kavernózní malformace, kterou způsobuje (Zawistowski et al. 2005). Gen byl lokalizován do oblasti q11 - q22 chromozomu 7 (Dubovsky et al. 1995). U člověka byly zmapovány tři lokusy genu CCM: 7q21-22 (*CCM1*), 7p13-15 (*CCM2*) a 3q25.2-27 (*CCM3*) (Craig et al. 1998). OSM je tedy aktin a Rac1 GTPázu vázající lešenový protein, který se po hyperosmotickém šoku rychle rekrutuje pomocí MEKK3 kinázy do aktinem podporovaného membránového vlášení (actin based ruffles), kde vzniká stabilní komplex OSM-MEKK3. (Uhlik et al. 2003). Osmoregulace v savčích buňkách je zprostředkována signalizací proteinovým komplexem Rac1- OSM- Arp2/3 - MEKK3 - MKK3, která následně aktivuje p38 MAP kinázu, přičemž Arp2/3 jej propojuje s cytoskeletem (Uhlik et al. 2003; Wu et al. 2013). Nakonec p38 MAP kináza aktivuje transkripční faktor TonEBP (Tessier et al. 2020). OSM protein usnadňuje aktivaci MAP p38 kinázy v reakci na hyperosmolaritu (Uhlik et al. 2003). Ovšem existuje i druhý způsob signalizace zprostředkované hyperosmolaritou. OSM protein, po interakci s Rac1, stimuluje aktivitu TonEBP prostřednictvím aktivace fosfolipázy C- γ 1, nikoli tedy přes p38 kinázu (Zhou et al. 2011).

2.3. TRPV1 receptor

Jedná se o protein o velikosti 95-100 kDa, též nazývaný jako vaniloidní receptor 1 (VR1) (Yiangou et al. 2001). Receptor je kódován transkriptem o velikosti 2514 bp. Je pro něj také používán název kapsaicinový receptor (Caterina et al. 1997). Je aktivován řadou substrátů, také např. allicinem obsaženým v cibuli a česneku (Salazar et al. 2008). Receptor TRPV1 (viz obrázek 1) má tetramerní architekturu, ve které jsou podjednotky uspořádány kolem vlastního kanálu pro vstup iontu. Každá podjednotka se skládá ze šesti transmembránových α -helixů (S1–S6). Tyto α -helixy překlenují lipidovou dvojvrstvu. Na N-konci se nachází ankyrinové repetice, které jsou charakteristické pro TRP kanály. TRP doména jim pravděpodobně slouží k vazbě ligandu a následně allostericky ovlivňuje konformaci pórů (Moiseenkova-bell et al. 2008; Liao et al. 2013). Kanál ve struktuře dále obsahuje šest transmembránových smyček zahrnujících oblasti propojené s doménou pórové smyčky (mezi TM 5 a 6) a velkou C - terminální intracelulární doménou (Caterina et al. 1997). Ankyrinové zbytky jsou schopné interagovat s kalmodulinem a jsou podstatné pro regulaci kanálu (pomocí fosforylace nebo interakce s kalmodulinem) (Numazaki et al. 2003; Rosenbaum et al. 2004; Lishko et al. 2007). V experimentu s myšími neurony se ukázalo, že zachovaný N-konec TRPV1 receptoru je

nezbytný pro registraci hyperosmolarity prostředí (Naeini et al. 2006). Hyperosmotická stimulace aktivovala kanál TRPV1. To vedlo k transaktivaci receptoru EGFR. Signální kaskády TRPV1-EGFR přispěly k fosforylaci kináz ERK a p38 MAPK a k následné aktivaci transkripčního faktoru NF- κ B, což vedlo k vyššímu uvolňování IL-6 a IL-8. Hyperosmotický šok tedy vyvolává touto cestou uvolnění prozánětlivých cytokinů (Pan et al. 2011). Stejný děj nastává fyziologicky i při osmotické zátěži buněk meziobratlových plotének (Johnson et al. 2016). Podobně mononukleární krevní buňky vykazují zvýšenou expresi IL-1 α , IL-1 β , IL-8 a TNF- α , když jsou buňky vystaveny zvýšené extracelulární tonicitě (Shapiro and Dinarello 1997). Stimulaci signální kaskády p38 MAPK hypersomolaritou dokládají i experimenty s T-lymfocyty (Junger et al. 1997; Loomis et al. 2003). Kanál TRPV1 je podstatný pro registraci osmolarity prostředí, neboť snímání hypertonicity je narušeno v neuronech izolovaných z OVLT (*organum vasculosum of the lamina terminalis*) myši s deplecí tohoto kanálu. Na základě studií bylo zjištěno, že tyto myši mají chronicky zvýšenou osmolaritu plazmy a tkáňového moku. U myši bez exprese *Trpv1* byla pozorována necitlivost sekrečních neuronů pro antidiuretický hormon na změnu osmolarity plazmy. Další výzkum prokázal, že TRPV1 -/- myši vykazovaly významně oslabený příjem vody v reakci na systémovou hypertonicitu ve srovnání s wild-type kontrolami. Tyto výsledky ukazují na významnou roli TRPV v osmoticky řízené žízni u myši. Myši TRPV1-/- tedy vykazují významné deficity v systémové osmoregulaci. Exprese genu *Trpv1* je nutná pro osmorecepci v neuronech OVLT. Zjištění z této studie jednoznačně ukazují, že pro osmosenzitivitu v primárních osmosenzorických neuronech OVLT je nutný produkt genu *TRPV1* a že deplece tohoto proteinu nezpůsobuje vymizení neuronů. Pravděpodobnější možností je, že produkt genu *TRPV1* funguje jako kanál tvořící póry v komplexu osmosenzorické transdukce neuronů OVLT (Ciura and Bourque 2006; Naeini et al. 2006). U neuronů OVLT, izolovaných z TRPV1 -/- myši, byly zkoumány reakce na mechanicky a osmoticky vyvolané smršťování bez vnějších vlivů. Výsledky naznačují, že neurony OVLT mohou být depolarizovány vlivem aktivace neselektivních kationtových kanálů. Oba typy odpovědí na mechanické i osmotické smršťování vymizely v neuronech OVLT získaných z TRPV1 -/- zvířat. Navíc u wild-type neuronů byly reakce indukované oběma typy stimulů eliminovány inkubací s SB366791, který se používá jako selektivní blokátor toku iontů přes kanály TRPV1. Tyto výsledky ukazují, že gen *TRPV1* kóduje mechanicky ovládaný kanál, který je zodpovědný za registraci osmolarity OVLT neurony. TRPV1 může být aktivován kapsaicinem, ale také dalšími fyziologickými podněty jako jsou protony a teplo (Gunthorpe et al. 2004; Ciura et al. 2011). Je to také receptor zajišťující nocicepci prostřednictvím senzorických neuronů (Caterina et al. 1997). V kyselém

pH extracelulární tekutiny dochází k otevření kanálu TRPV1. Kanálem následně teče proud. Kysele zprostředkované aktivace lidského TRPV1 je dosaženo aplikací extracelulárního roztoku se sníženým pH na 5,3 (Gunthorpe et al., 2004). K obdobným poznatkům došli i autoři již zmíněné studie, kteří prokázali, že myši OVLT neurony jsou citlivé na zvýšení osmotického tlaku extracelulární tekutiny. Hypertonické stavy vyvolávají zvýšení vodivosti pro kationty procházející membránou (Ciura and Bourque 2006). Neurony OVLT registrují nejen krevní tlak, ale také osmolaritu (Kinsman et al. 2020). Mutace nebo polymorfismy v myším genu *Trpv1* byly spojeny s vývojem diabetického fenotypu u myších NOD (nonobese diabetic). Výsledky této studie odhalují zásadní roli senzoričkových neuronů TRPV1+ citlivých na inzulín ve funkci β -buněk a patoetiologii diabetu (Razavi et al. 2006).



obrázek 1: schéma terciární struktury receptoru TRPV1, převzato z (Liao et al. 2013)

2.4. WNK kinázy

Endogenně exprimovaná WNK1 je specificky aktivována hyperosmotickými podmínkami (sorbitol, NaCl a KCl), ale nikoli jinými stresy. Její aktivace je rychlá a pozorovaná během asi 30 vteřin. Hyperosmotický stres aktivuje WNK1 stimulací její fosforylace, stejně tak ji aktivuje naopak hypotonický stav s nízkou koncentrací solí v extracelulární tekutině (Moriguchi et al. 2005; Zagórska et al. 2007). WNK1 je kináza schopna autofosforylace. Úpravou osmolarity inkubačního prostředí pomocí chloridu sodného nebo sorbitolu může tuto autofosforylaci WNK1 zvýšit, což ukazuje na to, že se WNK1 může podílet na osmosenzitivních drahách (Xu et al. 2000). U člověka existují čtyři WNK kinázy, které tvoří podrodinu proteinkináz s variabilitou ve struktuře subdomén I a II (katalytické domény). Lokalizace jednotlivých WNK kinázových genů na chromosomech jsou následující: gen pro lidskou proteinkinázu WNK1 (*PRKWNK1*), zahrnuje 160 kb genomové DNA a obsahuje 28 exonů a leží na chromozomu 12p13.3, gen WNK2 (*PRKWNK2*) leží na chromozomu 9q22.3, WNK3 (*PRKWNK3*) na chromozomu Xp11.21-23 a WNK4 (*PRKWNK4*) na chromozomu 17q. Exprese genů pro jednotlivé WNK kinázy se liší podle typu tkáně (Verissimo and Jordan

2001). V buňkách se WNK kináza nachází převážně v cytoplazmě, což bylo ukázáno na modelu buněčné linie HEK293. Ukázalo se, že pro aktivitu WNK1 je vyžadován lysin 233. Všechny ostatní zbytky konzervované mezi proteinkinázami jsou v očekávaných místech i ve WNK1, která se tak řadí mezi serin/threoninové kinázy. A ačkoliv postrádá konzervovaný katalytický lyzinový zbytek, který je nahrazen na této pozici cysteinem, tak vykazuje kinázovou aktivitu, jak vyplývá z její schopnosti autofosforylovat a fosforylovat exogenní substrát *in vitro*. Exprese WNK1 byla zkoumána v různých potkaních tkáních a byly detekovány dva transkripty o velikosti 11 a 9,5 kb. WNK1 je nejvíc exprimována ve slezině a plicích, dále v játrech a ledvinách, slaběji ve svalech a varlatech a vůbec žádná není exprimována v mozku a srdci. Molekulární hmotnost WNK1 udávají autoři na 230 kDa až 251 kDa (Xu et al. 2000; Veríssimo and Jordan 2001). Ovšem výsledky množství exprese WNK1 v jednotlivých tkáních se mírně liší v jiné studii, v níž se uvádí vysoká exprese i v srdci a lymfocytech. WNK2 je exprimován převážně v srdci, mozku a tlustém střevě, WNK3 je většinou exprimován v mozku a exprese WNK4 byla nalezena v tlustém střevě a kůži. Každá z WNK kináz má tedy tkáňově specifické funkce a to, jak během vývoje, tak u dospělých. Také tyto výsledky ukazují, že v mnoha tkáních je exprimován více než jeden gen pro WNK (Veríssimo and Jordan 2001). Kináza WNK1 fosforyluje například kinázy SPAK a OSR1, které jsou během hyperosmotického stresu touto fosforylací aktivovány (Zagórska et al. 2007). Následná fosforylace a aktivace uvedených kináz SPAK a OSR1 stimuluje aktivitu kotransportéru NKCC1 rovněž prostřednictvím jeho fosforylace, a to nejspíš na threoninu 175. Tyto dvě kinázy dále interagují s transportéry KCC3, NKCC2 (Piechotta et al. 2002; Vitari et al. 2005; 2006). Zmíněné proteiny fosforylují také některé receptory jako např. β 2 adrenergní receptor (Elzwawi et al., 2020). SPAK a OSR1 tak ve svém důsledku napomáhají k udržení homeostázy draslíku (Ferdaus et al. 2016). Oba proteiny obsahují doménu CCT nezbytnou pro interakci s transportérem NKCC1 a kinázu WNK1, respektive WNK4 (Vitari et al. 2006). Naopak se zdá, že WNK1 neinteraguje s MAP kinázovými drahami (ERK, JNK1 ani p38) a nejspíš tak tvoří paralelní dráhu reagující na zvýšenou osmolaritu prostředí (Xu et al. 2000). C-terminální nekatalytická oblast WNK1, po stimulaci sorbitolem, zprostředkovává translokaci do intracelulárních vezikul. Po hyperosmotickém stresu je značné množství WNK1 lokalizováno do *trans*-Golgi recyklačních endozomů (Zagórska et al. 2007). Dalším členem rodiny WNK je kináza WNK3, která aktivací transportérů NKCC a inhibicí KCC1 a KCC2 reguluje intracelulární koncentraci chloridových iontů (Kahle et al. 2005; Ponce-Coria et al. 2008). Exprese WNK4 byla prokázána i mimo ledviny. V extrarenálních tkáních se WNK4 nachází téměř výlučně v polarizovaném epitelu,

kteřý je variabilně spojován s těsnými spoji, laterálními membránami a cytoplazmou. Epitely, u kterých byla zjištěna exprese WNK4, vystylají potní kanálky, krypty tlustého střeva, pankreatické vývody, žlučovody a také u nadvarlete. WNK4 je také exprimována ve specializovaném endotelu hematoencefalické bariéry. WNK4 má inhibiční účinek na aktivitu kanálů a transportérů zajišťujících tok chloridových iontů epitelem. WNK4 je silným inhibítořem aktivity kotransportéřu NKCC1 a transportéřu SLC26A6 (CFEX), které fungují jako mediátory toku chloridových iontů přes bazolaterální a apikální membrán (Kahle et al. 2004). Další kinázou, regulující v reakci na osmotický stres koncentraci draselných, sodných a chloridových iontů, je kináza PASK/SPAK (Dowd and Forbush 2003). Fosforylací motivu WEWS u kináz SPAK a OSR1 dochází k vazbám těchto kináz na lešenový protein MO-25, který zprostředkovává jejich aktivaci. Kinázy SPAK/OSR1 jsou důležité při regulaci iontové homeostázy (Filippi et al. 2011; Mehellou et al. 2018). Specifickou vlastností kaskády WNK-SPAK/OSR1 v buňkách epitelu distálního tubulu ledvin je, že se její složky mohou koncentrovat ve sférických cytoplazmatických doménách, postrádajících vymezující membránu, nazvaných jako WNK bodies. V distálních stočených kanálcích nefronů je aktivita sodnochloridových kotransportérů modulována koncentrací draselných iontů v plazmě prostřednictvím interakcí WNK1/4-SPAK/OSR1 ve WNK bodies (Boyd-Shiwarski et al. 2018; Thomson et al. 2020). Vznik těchto tělísek nejspíš zvyšuje procesivitu kináz WNK.

3. Regulační kaskády a elementy zajišťující reakci buňky na hyperosmolaritu

Buňky využívají nejrůznějších mechanismů pro aktivaci regulačních drah, které jim pomohou vyrovnat se s osmotickým stresem. Zdá se, že existují dva základní typy aktivace těchto drah pro adaptaci na hyperosmolaritu:

- Rychlá aktivace

Je zprostředkována regulací transportérů pro průchod iontů mezi vnějším a vnitřním prostředím buňky. Regulace samotných transportérů je zajištěna pomocí kináz WNK, které regulují transportéry z rodiny NKCC a KCC. Ovšem hypertonicita může také přímo ovlivňovat komplex p38/MSK1. Ten následně reguluje subjednotku LRRC8A chloridového kanálu (Serra et al. 2021). Fosforylace cílových proteinů je zřejmě rychlejší odpovědí buňky na zvýšenou osmolaritu než *de novo* syntéza transportérů kompatibilních osmolytů. Následný

vtok sodných a chloridových iontů velmi rychle kompenzuje rozdíl koncentrací osmoticky aktivních látek v cytoplazmě a vně buňky.

- Pomalá aktivace

Je zajištěna přes signalizační kaskádu zapnutím p38 MAPK, která aktivuje transkripční faktor TonEBP. Ten spustí transkripci genů pro příslušné transportéry organických látek, které kompenzují osmotický tlak (tzv. osmolytů). Mezi tyto transportéry patří například BGT1, TAUT, SMIT, AR (Miyakawa et al. 1998; Rim et al. 1998; Takenaka et al. 1994; Ko et al. 1997; Tessier et al. 2020). Níže uvádíme základní přehled klíčových molekul účastnících se vnitrobuněčné signalizace v případě hyperosmotického šoku.

3.1. Transkripční faktor NF- κ B

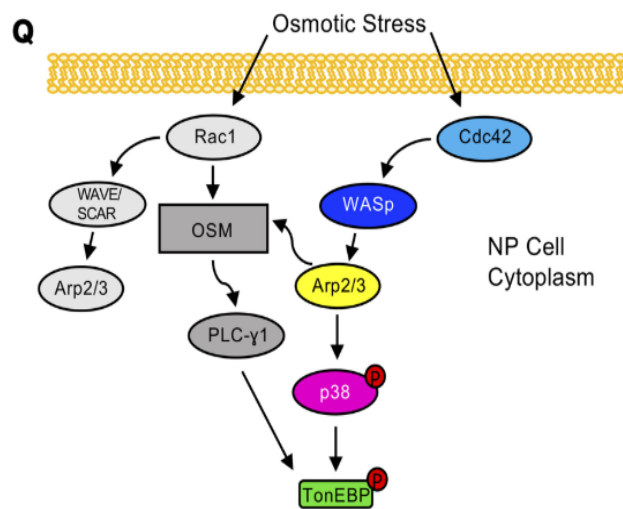
Komplex NF- κ B transkripčního faktoru byl původně charakterizován na základě vazebné aktivity enhanceru lehkého řetězce imunoglobulinu κ (Sen and Baltimore 1986). NF- κ B je heterodimer a skládá se z 50 kDa a 65 kDa proteinové podjednotky. Funkce těchto podjednotek jsou rozdílné. 65 kDa protein (p65) neváže DNA, zatímco 50 kDa protein (p50) představuje DNA-vazebnou podjednotkou NF- κ B (Baeuerle and Baltimore 1989). Proto se o něm hovoří jako o komplexu NF- κ B transkripčního faktoru. Rodina dimerních transkripčních faktorů NF- κ B (také nazývaná NF- κ B/Rel) zprostředkovává buněčné odpovědi na širokou škálu různých stimulů regulací exprese velkého počtu genů vysoce různorodých funkcí (Ghosh et al. 1990; Kieran et al. 1990). Proteiny NF- κ B/Rel vytvářejí stabilní dimer v roztoku v nepřítomnosti DNA a dimerizace je nezbytná pro vazbu DNA a transkripční aktivitu. V tomto ohledu se jim podobá transkripční faktor NFAT5/TonEBP (López-Rodríguez et al. 2001). Kromě oxidačního stresu, či genotoxického stresu, má na aktivitu NF- κ B vliv i stres hypertonický (Sarada et al. 2008; Roth et al. 2010; Su et al. 2017; Medunjanin et al. 2020; Xie et al. 2021). Hypertonicita aktivuje NF- κ B ve dvou krocích. V prvním kroku hypertonické prostředí stimuluje p38 kinázu, která zvyšuje aktivitu kinázy Akt (známá také jako protein kináza B) i TonEBP. Zvýšená aktivita Akt přispívá jak ke zvýšení aktivity TonEBP, tak ale také indukuje disociaci inhibitoru I κ B α k z cytoplazmatického proteinu p65. Tento proces závisí na aktivitě IKK- β . Nekonjugovaný I κ B α je degradován a umožňuje volnému p65, dimerizovanému s p50, se translokovat přes jadernou membránu. Ve druhém kroku se TonEBP spojuje s komplexy obsahujícími p65 navázanými na DNA, čímž se zvyšuje transkripční aktivita NF- κ B. Aktivace NF- κ B hypertonicitou je přechodná a snižuje se s rostoucí expresí proteinu I κ B α v reakci na zvýšenou transkripční aktivitu I κ B α (Roth et

al. 2010). Na transkripčním faktoru NF- κ B se pochopitelně protíná více signálních drah, které zprostředkovávají reakci na více stimulů. V buněčné kultuře MDCK je NF- κ B ovlivněn tumor nekrotizujícím faktorem- α (TNF- α), ale v epitelálních buňkách sběrného kanálku ledvin, hypertonicitou zprostředkovaná stimulace NF- κ B, může být zvýšena lipopolysacharidem, ale nikoli TNF- α (Woo et al. 2000; Roth et al. 2010). I v plicním epitelu je aktivace NF- κ B odlišná: hypertonické prostředí inhibuje TNF α indukovanou aktivaci NF- κ B. Fosforylace I κ B α je snížena a jeho degradace je proto zpožděna, což má za následek sníženou nukleární translokaci NF- κ B a expresi prozánětlivých genů (Nydam et al. 2009). Obdobně je NF- κ B zapojen do regulačního mechanismu v renálních medulárních intersticiálních buňkách. Nedostatek vody a hypertonicita aktivují NF- κ B, který následně indukuje zvýšení exprese cyklooxygenázy (COX-2). Ta podporuje přežití buněk v hypertonických podmínkách (Hao et al. 2000). Hypertonické kultivační médium zvýšilo expresi TonEBP v endoteliálních buňkách a vyvolalo buněčnou smrt. Ukázalo se, že TonEBP zvýšil aktivitu signální dráhy NF- κ B a inhiboval expresi Bcl-2, antiapoptotického proteinu (Xie et al. 2021). Expozice vysoké koncentraci chloridu sodného v myších buňkách IMCD-K2, indukuje expresi proteinu PRR ((Pro)reninový receptor) a tento děj byl doprovázen zvýšenou fosforylací proteinu NF- κ B p65, což v konečném důsledku vedlo k apoptóze způsobené vyřazením antiapoptotického proteinu Bcl-2 z funkce. Tyto výsledky ukazují potenciální roli NF- κ B/PRR dráhy v regulaci buněčného poškození během osmotického stresu (Su et al. 2017). Hypertonický stres zvyšuje aktivitu glykogensyntázykinázy-3 β (GSK-3 β) v buňkách linie RMIC, což je opět spojeno s počátkem apoptózy. Je-li však GSK-3 β inhibována, zvýší se aktivita NF- κ B, který upreguluje cyklooxygenázu (COX-2) a podporuje přežití buněk po hypertonickém stresu. GSK-3 β tedy negativně reguluje expresi COX-2 a inhibitory GSK-3 β chrání buňky před hypertonickým stresem prostřednictvím indukce dráhy závislé na NF- κ B - COX-2 (Rao et al. 2004).

3.2. Protein Arp2/3

Jednou z částí signalizační kaskády při zvýšené osmolaritě je protein Arp2/3 (actin-branching Arp2/3 complex), který je zároveň součástí buněčného cytoskeletu. Hyperosmotické prostředí nejprve aktivuje Rho GTPázu Cdc42 (Cell division control protein 42). Ta následně moduluje aktivitu transkripčního faktoru TonEBP prostřednictvím Arp2/3 a p38 MAP-kinázy, a to nezávisle na dráze zprostředkované G-proteinem Rac1 a fosfolipázou C (PLC), což by mohlo ukazovat na jednu z dalších funkcí Arp2/3 při kontrole osmoadaptivní reakce (viz obrázek 2)

(Tessier et al. 2020). Ústředním transkripčním faktorem, který řídí aktivitu mnoha osmoprotektivních genů, je TonEBP (Takenaka et al. 1994; Ferraris et al. 1996; Ko et al. 1997; Miyakawa et al. 1998; Rim et al. 1998). Na zvýšení aktivity TonEBP má vliv také GTPáza Rac1 a protein OSM. Komplex Rac1/OSM zvyšuje aktivitu TonEBP prostřednictvím aktivace fosfolipázy C (PLC- γ 1), nikoli tedy přes MAP kinázovou dráhu p38 (Zhou et al. 2011). V jiných buněčných typech, např. v ledvinových buňkách linie MDCK nebo v buňkách *nucleus pulposus*, je naopak TonEBP aktivován prostřednictvím MAP kinázových drah p38 a ERK, přičemž je koncovými kinázami těchto drah fosforylován (Sheikh-Hamad et al. 1998; Dahl et al. 2001; Tsai et al. 2007; Choi et al. 2018). Aby mohla kináza p38 aktivovat TonEBP, musí být nejprve sama aktivována, a to prostřednictvím Arp2/3 (Tessier et al. 2020). Protein Arp2/3 interaguje s OSM proteinem. Při depleci Arp2/3 jsou buňky vysoce citlivé na osmotický stres (Wu et al. 2013). Aktivace TonEBP nemusí být spuštěna jen přes signalizační kaskádu p38 MAPK. Rac1/OSM podporuje aktivitu TonEBP, ale tato aktivita není zprostředkována p38 MAP kinázou, nýbrž prostřednictvím PLC- γ 1 (Zhou et al. 2011). Interakce mezi OSM a Arp2/3 komplexem umožňuje interakci s cytoskeletem (Uhlik et al. 2003; Wu et al. 2013). Změna objemu buněk, vyvolaná změnou osmolarity, indukuje charakteristickou remodelaci kortikálního cytoskeletu. Hyperosmotický stres vyvolává remodelaci kortikálního cytoskeletu, již se účastní s aktinem asociovaný Arp2/3 a protein CDC42, zodpovědný za regulaci aktinového cytoskeletu. Celý proces se dá shrnout jako *de novo* polymerace kortikálního cytoskeletu (Ciano et al. 2002). S tímto procesem je úzce spojen OSM protein, který je schopen vázat F-aktin a je řízen Rac1 GTPázou (Uhlik et al. 2003).



obrázek 2: reakce buňky na hyperosmotický šok prostřednictvím Arp2/3 a Rac1, převzato z (Tessier et al. 2020)

3.3. Transkripční faktor TonEBP (NFAT5)

TonEBP, též nazýván jako OREBP nebo NFAT5, je transkripční faktor, který se váže na enhancer TonE/ORE s konsenzuální sekvencí 5'-(C/T)GGAA_nn(C/T)_n(C/T)-3', charakterizované v psím genu pro transportér BGT1 a rovněž v králičím genu pro aldoso-reduktázu (AR), kde tato sekvence TonE odpovídá sekvenci nazvané ORE (osmotic response element) (Ferraris et al. 1996; Miyakawa et al. 1998; 1999; López-Rodríguez et al. 1999; Ko et al. 2000). NFAT5 je transkripční faktor indukovaný především hypertonickým stresem. Od konvenčních NFAT proteinů NFAT1 až NFAT4 se liší svou strukturou, vazbou na DNA a regulací. NFAT5 obsahuje homologní doménu Rel, která jej řadí do rodiny NFAT. Rozdíly mezi rodinou proteinů NFAT1-4 a proteinem NFAT5 byly pozorovány i v regulaci jaderného importu, který u NFAT 5 není regulován defosforylací zprostředkovanou kalcineurinem, jako je tomu u NFAT1-4. Gen *NFAT5* je široce transkribován a u člověka se nachází na chromozomu 16q22 (López-Rodríguez et al. 1999; Hebinck et al. 2000). Molekulová hmotnost je 200 kDa (Miyakawa et al. 1998). NFAT5 vykazuje vlastnosti obou rodin, jak NFAT, tak i NF- κ B/Rel proteinů vázajících se na DNA. Je ovšem jediným členem rodiny Rel/NFAT, který je aktivován osmotickým stresem, stejně jako proteiny Rel/NF- κ B. Pro transkripční aktivitu je nezbytná jeho dimerizace. Mezi důležité funkce NFAT5 patří například regulace transkripce cytokinových genů TNF α a lymfotoxinu- β v osmoticky stresovaných T-buňkách, váže se na regulační oblasti genů TNF- α a aldózareduktázy. Je aktivován osmotickým stresem na více úrovních, včetně proteinové exprese, posttranslační modifikace a subcelulární lokalizace. Aktivuje především geny, jejichž produkty se podílejí na syntéze kompatibilních osmolytů. Naopak bylo prokázáno, že další proteiny rodiny NFAT, jakými jsou NFAT1 a RelA, nejsou aktivovány osmotickým stresem (Miyakawa et al. 1998; López-Rodríguez et al. 2001). TonEBP (neboli NFAT5) je cílem signální kaskády p38 MAPK a MEK-ERK, jejichž aktivací tento transkripční faktor například aktivuje transkripci proteinu MCP1 v ledvinách potkana (Kojima et al. 2010). Stejně zjištění přinesly i experimenty provedené na modelu psích ledvinových buněk (Padda et al. 2006). MAP kinázová dráha tedy hraje zřejmě důležitou roli v buněčných mechanismech, které jsou základem regulace genové exprese v reakci na zvýšenou osmolaritu prostředí. Fosforylace C - koncové transaktivační domény TonEBP je závislá na tonicitě a hraje zásadní roli při regulaci aktivity proteinu. Tato doména je cílem MAP kinázových drah (např. ERK) (Ferraris et al. 2002; Tsai et al. 2007). Fosforylace zvyšuje účinnost transkripce, ale není nutná pro samotnou vazbu na DNA (Miyakawa et al., 1998). Kromě genů BGT1 a AR byl TonE/ORE identifikován v proximální

oblasti 5'-přesahující oblasti genů proteinů tepelného šoku, jako jsou *HSP70* a *OSP94* a také reguluje geny pro SMIT (Na^+ /*myo*-inositolového kotransportéru), které řadíme mezi osmoprotektivní geny (Rim et al. 1998; Woo et al. 2002; Kojima et al. 2004). Stejný výsledek, tedy zvýšená exprese betainového transportéru (BGT1), Na^+ /*myo*-inositolového transportéru (SMIT), aldoso-reduktázy (AR), chaperonu HSP70 a NF- κ B transkripčního faktoru byla potvrzena i v novější studii (Ahmed and Hussein 2020). TonEBP má zřejmě klíčovou roli také při udržování histologické stavby ledvin (López-Rodríguez et al. 2004). TonEBP je kromě hypertonicity stimulován rovněž hyperglykemií. V tom případě stimulace TonEBP vede k apoptóze (Park et al. 2014). Již dříve bylo prokázáno, že aldózoreduktáza je upregulována prostřednictvím TonEBP, který za podmínek s vysokým obsahem glukózy má vyšší vazebnou aktivitu k TonE elementu v genu pro aldosoreduktázu (Yang et al. 2006). TonEBP podporuje také transkripci prozánětlivých genů v buňkách *nucleus pulposus* meziobratlových plotének, a to i za fyziologicky relevantních hypertonických podmínek. Sledovány byly prozánětlivé geny jako C-C motiv chemokinového ligandu 2 (CCL2), interleukin 6 (IL-6), TNF- α a syntáza oxidu dusnatého 2 (NOS2). Předpokládá se, že tento jev odráží fyziologickou adaptaci buněk na denní osmotickou zátěž meziobratlové ploténky a může být zásadní pro buněčnou homeostázu (Johnson et al. 2016). Vstup do jádra je zároveň podporován TNF- α , ale nezpůsobuje indukci osmoregulačních genů (Johnson et al. 2017). Recentně bylo také zjištěno, že TonEBP umožňuje diferenciaci dendritických buněk do efektorových T-buněk (Ye et al. 2020).

4. Mechanismy adaptace na osmotický šok

Závěrečným krokem v adaptaci buňky na zvýšenou osmolaritu v okolí jsou mechanismy, které mají tento v zásadě negativní jev kompenzovat. Buňka může zvolit buď adaptaci v podobě akumulace či syntézy osmoticky aktivních částic (tzv. kompatibilních osmolytů), které ale současně nenarušují její klidový membránový potenciál a elektrochemické poměry v cytoplazmě, respektive může využít mechanismy určené k opravě poškozených proteinů, anebo mechanismy vedoucí k oddálení buněčné smrti. Apoptózu jako konečný, krajní a nevratný důsledek vysoké extracelulární osmolarity ve výčtu neuvádíme.

4.1. Transportéry osmoticky aktivních částic

4.1.1. Betainový transportér

Transportér zajišťující uptake betainu byl poprvé identifikován v buněčné linii MDCK a pojmenován BGT-1. Jedná se o transportér zajišťující symport se sodnými i chloridovými ionty. Transportér je schopen přenášet i kyselinu γ -aminomáselnou (Yamauchi et al. 1992; Uchida et al. 1993). Fosforylace transportéru proteinkinázami A nebo C vede k inhibici transportu betainu (Preston et al. 1995). Gen BGT1 má velikost 28 kbp a skládá se z 18 exonů. Betainový transportér je exprimován převážně ve dřeni ledvin, která je fyziologicky vystavena zvýšené osmolaritě. Konkrétně se jedná o tlusté raménko Henleovy kličky a sběrný kanálek dřeně (Takenaka et al. 1995; Miyai et al. 1996) Transkripce genu je řízena transkripčním faktorem TonEBP, který nasedá do oblasti délky 20 bp, kterou tvoří TonE element (Takenaka et al. 1994). Experimentálním vyřazením TonEBP se projevila nedostatečná transkripce genu BGT-1 a *in vivo* také atrofie dřeně ledvin (López-Rodríguez et al. 2004). Stejný výsledek přinesla i novější studie na myších, která navíc ukázala, že exprese BGT1 (ale také ostatních osmoprotektivních genů jako aldozoreduktáza nebo *myo*-inositolový transportér), je řízena MAP kinázou p38. Tato kináza má zjevně aktivační účinek na TonEBP (Roth et al. 2010). Vyjma tkáně ledvin se tento transportér BGT1 nachází i v astrocytech, kde vycytává betain potřebný k regulaci velikosti buněk za hypertonických podmínek (Pukale et al. 2021).

4.1.2. Taurinový transportér

Taurinový transportér (TAUT) je kodován genem *SLC6A6* (Stipanuk et al. 2017). Jedná se o protein o 619 aminokyselinách s vypočítanou molekulovou hmotností 69,7 kDa (Jhiang et al. 1993). Stejně jako u ostatních osmolytů, tak i u taurinu se jeho akumulace pomalu zvyšuje, když jsou buňky přesunuty do hypertonického média. Naopak k rychlým ztrátám taurinu dochází, když jsou buňky převedeny z hypertonického na izotonické médium (Uchida et al. 1991). K samotné regulaci taurinového transportéru dochází na základě zvýšeného množství mRNA pro taurinový transportér, které je indukováno právě hypertonicitou (Uchida et al. 1992; Satsu et al. 2003). Exprese transportéru TAUT je řízena transkripčním faktorem TonEBP, který se váže do vazebného místa TonE v regulační oblasti genu *SLC6A6* (Ito et al. 2004). Aktivace genu pro TAUT má zřejmě nižší práh citlivosti než mají geny kódující enzymy biosyntetické dráhy taurinu CDO (cysteinsulfinátdekarboxyláza) a CSD

(cysteindeoxygenáza) (Bitoun et al. 2001). V astrocytech je genová exprese taurinového transportéru, ale nikoli exprese biosyntetických enzymů CDO a CSD pro taurin, řízena dvěma antagonistickými regulacemi, a to konkrétně samotným taurinem, který exprese snižuje a osmolaritou, která jí naopak zvyšuje (Bitoun and Tappaz 2000). Transportér TAUT a enzymy biosyntézy taurinu mají nezávislý regulační systém. Avšak za určitých podmínek, jako je hypertonicita, mohou být regulovány ve vzájemné závislosti (Satsu et al. 2003). To podporuje závěr, že pro buňku je výhodnější taurin získat z prostředí tkáně, než jej syntetizovat *de novo*. Osmotická regulace lidského TAUT byla zkoumána z hlediska intracelulární signální dráhy a bylo zjištěno, že aktivace $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ kinázy II se podílela na zvýšení exprese lidského TAUT vyvolaného zvýšeným osmotickým tlakem (Satsu et al. 2004). Již dřívější studie prokázaly, že v proteinu lidského TAUT se nachází šest potenciálních fosforylačních míst proteinkinázy C a sedm potenciálních fosforylačních míst kaseinkinázy II (Jhiang et al. 1993). Aktivace proteinkinázy C hraje důležitou roli v regulaci vychytávání taurinu v kultivovaných renálních epiteliálních buňkách (Jones et al. 1991). Proto může fosforylace proteinu hrát důležitou roli v regulaci aktivity lidského TAUT (Jhiang et al. 1993). V immortalizovaných potkaních retinálních kapilárních endoteliálních buňkách *in vitro* byly sledovány účinky oxidačního stresu, vysoké hladiny glukózy a hypertonických podmínek na transport taurinu. Výsledky studie ukazují, že oxidační stres a hypertonické stavy zvyšují vychytávání taurinu, zatímco hyperglykemie rychlost vychytávání snižují (Gyawali and Kang 2019). Kromě hypertonického prostředí je TAUT zřejmě aktivován i UV-B zářením, při němž vyšší koncentrace taurinu (ale i dalších osmolytů) chrání buňky před indukcí apoptózy (Dayang and Dongbo 2018).

4.1.3. *Myo*-inositolový transportér

Lidský Na^+/myo -inositolový kotransportér (SMIT) je kodován genem *SLC5A3*, který byl lokalizován na chromozomu 21. Konkrétní pozice tohoto genu je na 21q22.1 a q22.2. (Berry et al. 1995). V linii psích buněk MDCK byl identifikován protein o 718 aminokyselinách s molekulovou hmotností 79,5 kDa. Protein vykazuje vysoce významnou sekvenční aminokyselinovou podobnost s Na^+/D -glukózovými kotransportéry střevní sliznice a proximálních tubulů ledvin. Transportér je exprimován v ledvinách, mozku, indukovat jej lze i v buňkách linie MDCK. V SMIT je přítomno několik potenciálních fosforylačních míst pro cAMP-dependentní proteinkinázu a proteinkinázu C. Tato místa se nachází v jeho cytoplazmatických doménách (Kwon et al. 1992). Hypertonicita zvyšuje aktivitu tohoto sodíkového kotransportéru zvýšením transkripce jeho genu. Může existovat menší regulace

exprese na úrovni stability mRNA, translace nebo posttranslačně (Yamauchi et al. 1993). U člověka je transportér SMIT kódován mRNA složenou z alespoň pěti exonů, přičemž může podléhat alternativnímu sestřihu (Porcellati et al. 1998). Byla analyzována 5'-přesahující oblast genu, kodující tento transportér, z hlediska cis-působící regulační sekvence. Identifikováno bylo pět enhancerů reagujících na tonicitu, které jsou rozptýleny přes v úseku dlouhém více než 50 kbp proti směru transkripce. Všechny enhancery jsou variacemi stejného typu enhanceru reagujícího na tonicitu, TonE (tonicity-responsive enhancer). Všechny enhancery přispívají k regulaci transkripce genu SMIT, což naznačuje, že regulace SMIT zahrnuje poměrně neobvykle dlouhé interakce mezi regulačními sekvencemi a promotorem. Transportér SMIT podléhá regulaci v elementech TonE, které jsou před samotným genem a interagují s již zmíněným faktorem TonEBP (Rim et al. 1998; Miyakawa et al. 1998). Analýza lidské dřene meziobratlových plotének, konkrétně buněk *nucleus pulposus*, ukázala, že exprese TonEBP pozitivně koreluje s expresí osmoregulačních proteinů SMIT, TAUT a AR, což naznačuje, že všechny tyto geny jsou jím regulovány (Johnson et al. 2017).

4.1.4. Transportéry aminokyselin

Stejnou osmoprotektivní úlohu jako výše popsané kompatibilní osmolyty mohou plnit i některé aminokyseliny. Například u buněk linie odvozené z lidského endotelu bylo pozorováno, že intracelulární zásoba aminokyselin (zejména prolinu, glutamínu a glutamátu) pozitivně ovlivňuje adaptaci na zvýšenou osmolaritu. Dlouhodobě zvýšená koncentrace těchto aminokyselin hraje podstatně větší roli než koncentrace anorganických iontů (Dall'Asta et al. 1999) Významné jsou tři elektroneutrální transportéry volných aminokyselin (tzv. systém A), které kotransportují substrát symportem se sodnými ionty. Součástí systému A jsou SNAT1 (ATA1,SAT1), SNAT2 (ATA2,SAT2) a SNAT4 (ATA3), členové genové rodiny *SLC38A* (Yao et al. 2000; Hatanaka et al. 2001). Tyto aminokyselinové transportéry jsou závislé na sodíku, membránovém potenciálu a jsou citlivé na pH. Katalyzují jednosměrný příjem malých alifatických neutrálních aminokyselin, jako je alanin, glutamin a glycin (Yao et al. 2000; Varoqui et al. 2000; Dall'Asta et al. 1999). Jednotlivé typy aminokyselinových transportérů jsou tkáňově specifické a setkáme se s nimi v neuronální tkáni, v játrech (HepG2 buňky), v lidských epiteliálních buňkách i v placentě člověka i potkana (Dall'Asta et al. 1999; Hatanaka et al. 2001; Rodríguez et al. 2011; Takahashi et al. 2017). Obdobně hladina mRNA pro paralogní transportér SNAT2 (ATA2) výrazně vzrostla u prasečích endoteliálních buněk vystavených hypertonicitě (Alfieri et al. 2001). Vyvíjející se thymocyty v mikroprostředí brzlíku jsou tedy vystaveny osmotickému stresu, který je účinně kompenzován mechanismem

závislým na TonEBP/NFAT5, který spouští exprese zmíněného transportéru ATA2 (Trama et al. 2002)

4.1.5. Transportéry anorganických iontů

Vyjma organických látek, využívaných jako osmolyty, se po zvýšení osmolarity okolního prostředí využívají k její kompenzaci anorganické ionty. Níže uvádíme základní přehled transportérů těchto iontů, které jsou řízeny osmolaritou prostředí.

4.1.5.1. Transportér NKCC1

Transportér NKCC1 byl jako transportér popsán v sekrečním epitelu myši, kde je lokalizován na bazolaterální membráně epiteliálních buněk, ale také v myocytech či erythrocytech (Delpire et al. 1994). Gen, kódující kotransportér NKCC1, může být odlišně regulován zánětlivými cytokiny a mechanickými silami kapaliny v kultivovaném endotelu. Za řízení exprese transportéru je zodpovědný transkripční faktor NF- κ B (Topper et al. 1997; Lan et al. 2017). NKCC1 zprostředkovává vstup Na^+ , K^+ a Cl^- do buňky. Zvýšený transport Cl^- do buňky je zprostředkován přes WNK3 kinázu a naopak WNK4 kináza má na tento kanál inhibiční účinek (Kahle et al. 2004; 2005). Transportér má u člověka velikost 170 kDa (Payne et al. 1995).

4.1.5.2. Transportér NKCC2

NKCC2 byl jako kotransportér sodných, draselných a chloridových iontů ($\text{Na}^+/\text{K}^+/2\text{Cl}^-$) poprvé popsán u potkana jako 4,6 kb dlouhý transkript, který byl nalezen v kůře a vnější dřeni ledvin. Ortologní transportér byl popsán i u králíka (Payne and Forbush 1994). Renální NKCC2 umožňuje vstup Cl^- , Na^+ a K^+ do buňky (Kahle et al. 2005). V případě vyčerpání intracelulárních chloridů je NKCC2 aktivován, a to závislou interakcí mezi WNK3 a SPAK (Ponce-Coria et al. 2008). V ledvinách se NKCC2 svou aktivitou významně podílí na udržování koncentrace K^+ v plazmě (Ferdous et al. 2016). Molekulární hmotnost transportéru u člověka lze vypočítat na základě jeho struktury na 121,4 kDa (Simon et al. 1996). Zdá se, že aktivita kotransportéru NKCC2 v hypertonickém prostředí je řízena cestou WNK-SPAK/OSR1, která reguluje fosforylaci Thr105 (Richardson et al. 2011).

4.1.5.3. Transportéry KCC

Zprostředkovávají odtok draselných a chloridových iontů z buňky a jejich aktivita je v hypertonických podmínkách inhibována WNK3 kinázou, která zablokuje odtok Cl^- přes kanály KCC1 a KCC2. Tyto kanály jsou naopak maximálně aktivní při hypotonických podmínkách (Kahle et al. 2005). WNK izoformy aktivují SPAK/OSR1 kinázy, které v přítomnosti regulační podjednotky MO-25 silně fosforylují všechny izoformy transportérů KCC na jejich N-terminální doméně i C-terminální doméně. Touto fosforylací je stimulován odtok eflux draslíku a chloridů. Kinázami WNK regulované SPAK/OSR1 kinázy přímo fosforylují jak NKCC, tak i KCC, čímž podporují jejich stimulaci a inhibici (v daném pořadí) (Los Heros et al. 2014).

4.2. Enzymy syntetizující kompatibilní osmolity

4.2.1. Aldoso-reduktáza (AR)

Gen pro aldosoreduktázu (*AKR1B1*) byl identifikován u potkana, u člověka a u králíka (Graham et al. 1991b; Graham et al. 1991a; Wang et al. 1993; Ferraris et al. 1994). Aldosoreduktáza katalyzuje NADPH-dependentní redukci fyziologických a xenobiotických aldehydů na jejich příslušné alkoholy s širokým rozsahem katalytické účinnosti. Rovněž se může podílet na metabolismu kortikosteroidů. Aktivitu enzymu inhibují flavonoidy a naopak stimulační účinek mají síranové ionty. Aldosoreduktáza se skládá z jediného polypeptidového řetězce s molekulovou hmotností 38 kDa (Wermuth et al. 1982). Promotor lidské aldoso-reduktázy byl částečně charakterizován proti směru transkripce od iniciačního místa transkripce. Fragment (-192 až +31 bp) obsahuje několik prvků, které řídí bazální expresi enzymu (Wang et al. 1993). V downstream oblasti genu byla definována nejmenší sekvence schopná zprostředkovat reakci na hyperosmotický šok (Ferraris et al. 1996). Později byla i v lidském genu pro aldoso-reduktázu identifikována sekvence o 132 párech bází umístěná 1235 bp proti směru transkripce, ve které existují tři sekvence, analogické sekvenci TonE, charakterizované v genu pro BGT1 a ORE (osmotic response element) králíčího genu pro AR. Tyto tři sekvence dostaly označení OreA, OreB a OreC (Ko et al. 1997). Rovněž sekvence TonE/ORE myšího promotoru vykazovala podobnost s TonE sekvencí v promotoru pro osmoticky aktivní transportér BGT1, popsany na buňkách psích ledvin MDCK (Daoudal et al. 1997). Jak již bylo uvedeno, na tyto sekvence TonE/ORE se specificky váže transkripční faktor TonEBP (Miyakawa et al. 1998; 1999). Sekvence dlouhá 11 bp (-TGGAAAATTAC-)

je umístěna 3,7 kb proti směru transkripce od místa iniciace transkripce a vykazuje aktivitu enhanceru, aktivního v hyperosmotickém prostředí (Ruepp et al. 1996). Myši s deficiencí genu *Akr1b1* vykazovaly hyperkalcérii, hyperkalcémii, hypermagnezémii a sníženou schopnost koncentrovat moč, což naznačuje novou fyziologickou roli aldoso-reduktázy v homeostáze divalentních kationtů (Aida et al. 2000). Přeměna D-glukózy na sorbitol představuje první krok polyolové dráhy, doplňkové dráhy metabolismu glukózy, která přeměňuje glukózu na fruktózu. Ve vnitřních dřeňových ledvinových buňkách je aktivita aldoso-reduktázy výrazně zvýšena za hypertonických podmínek, což pomáhá vyrovnat osmotické tlaky pomocí sorbitolu (Bagnasco et al. 1987). Celková délka genu je přibližně 14,7 kb, nezahrnující 5' a 3' přilehlé oblasti. Gen má 10 exonů a 9 intronů (Ferraris et al. 1994). Byla prokázána rovněž vazba na TonE sekvenci i u lidského TonE vazebného proteinu (TonEBP) (Miyakawa et al. 1999). Aldoso-reduktáza a její transkripce je řízena i jinými transkripčními faktory. Například u myši byla identifikována vazebná místa pro transkripční faktory reagující na steroidní hormony (Daoudal et al. 1997). Zvýšení intracelulární koncentrace sodíku a draslíku (nebo intracelulární iontové síly) způsobuje indukci transkripce genu pro aldoso-reduktázu v buňkách vystavených hypertonickému stresu a naopak, po syntéze dostatečného množství kompatibilních osmotitů je transkripce zastavena (Smardo et al. 1992).

4.3. Proteiny HSP70

Kromě akumulace kompatibilních osmolytů jsou buňky také chráněny před hypertonicitou expresí HSP. Tyto molekulární chaperony jsou indukovány během prvních hodin po hypertonickém ošetření, aby působily proti škodlivým účinkům zvýšené intracelulární iontové síly a aby chránily intracelulární makromolekuly proti ztrátě struktury a agregaci (Cohen et al. 1991; Petronini et al. 1993; Sheikh-Hamad et al. 1994). Hladina exprese genu *HSP70* je více než 20krát vyšší v ledvinové dřeni vystavené hypertonicitě než ve tkáních s normální osmolaritou a upregulace exprese *HSP70* podporuje přežití buněk po hypertonické stimulaci (Woo et al. 2002). Obdobně MDCK buňky s vyřazeným *HSP70* jsou mnohem citlivější na osmotický stres (Shim et al. 2002). Rodinu *HSP70* tvoří proteiny o molekulové hmotnosti 70 kDa (Nadler et al. 1992). Proteiny *HSP70* jsou součástí ubikvitin - proteázového systému a cest degradace proteinů. U lidské genové rodiny *HSP70* bylo identifikováno 47 sekvencí *HSP70*, 17 genů a 30 pseudogenů. Geny kódující lidské proteiny *HSP70* jsou rozděleny do sedmi evolučně odlišných skupin s rozlišitelnými podskupinami podle fylogenetických a dalších dat. N-terminální doména vázající ATP byla zachována alespoň částečně ve většině

proteinů, ale C-terminální doména vázající substrát nikoli. Rodina HSP70 je definována svou jedinečnou doménou vázající ATP, konzervovanou u všech jejích členů s výjimkou dvou genů *HSPA12*, kde je tato doména více divergentní, ale stále rozpoznatelná. Úplný konzervovaný protein HSP70 má 641 aminokyselin (Brocchieri et al. 2008). Funkční geny kódující proteiny HSP70 byly mapovány na lidských chromozomech 6, 14, 21 (Harrison et al. 1987). Protein tepelného šoku HSP70 má tři polymorfní varianty HSPA1A, HSPA1L a HSPA1B (Pae et al. 2005). Stejnojmenné geny pro tyto tři polymorfní varianty proteinu HSP70 jsou lokalizovány na chromozomu 6 a to následovně: *HSPA1L* na 6p21.33, *HSPA1A* na 6p21.33, *HSPA1B* na 6p21.32. Expze jednotlivých genů *HSP70* se velmi liší v závislosti na typu tkáně (ledviny, mozek, srdce, kostní tkáň, játra, pankreas, svalovina), vývojovém stádiu daného jedince a buněčném kompartmentu (jádro, endoplasmatické retikulum, cytoplazma, mitochondrie) (Brocchieri et al. 2008). Buněčná adaptace na osmotický stres hraje významnou roli v osmotické kontrole expze HSP70 (Flanagan et al. 1995; Schliess et al. 1998). Transkripci genu *HSP70* indukovanou tepelným šokem, těžkými kovy, zajišťuje v promotoru element HSE (heat shock element), který leží v oblasti mezi -105 a -91 (Williams and Morimoto 1990). Expze HSP70 byla u různých buněčných typů prokázána po jejich expzi těžkým kovům jako je měď, zinek, kadmium, kobalt nebo nikl a dále pak při vystavení buněk teplu nebo hyperosmolaritě (Hatayama et al. 1993; Flanagan et al. 1995; Schliess et al. 1998; Wagner et al. 1999). HSP70 je tedy zapojen do obecného mechanismu odpovědi na buněčný stres vyvolaný vnějšími faktory. Hypertonicita indukuje expzi mRNA pro HSP70. V experimentálně navozené nepřítomnosti betainu a inositolu v cytoplazmě je HSP70 signifikantně více exprimován, což naznačuje, že tento protein hraje podstatnou roli, vyjma reakce na zvýšenou teplotu, také při reakci na hyperosmotický šok (Sheikh-Hamad et al. 1994). HSP70 je regulována transkripčním faktorem TonEBP prostřednictvím aktivace protein kinázy C- μ (PKC μ) (Lim et al. 2008). Důkaz o aktivaci genu *HSP70* prostřednictvím TonEBP přinesla i další studie. V oblasti přiléhající proti směru transkripce ke genu *HSPA1B* jsou tři místa pro vazbu TonEBP, z nichž všechna jsou pro transkripci podstatná. (Woo et al. 2002) Aktivace TonEBP hypertonicitou je typicky doprovázena indukcí HSP70. U potkanů reaguje na tonicitu a také na teplo gen *HSPA1A*. V této studii bylo zjištěno, že HSPA1A byl indukován hypertonicitou, což ukazuje, že TonEBP je aktivován v buněčné linii TR-TBT 18d-1 kultivované v hypertonickém médiu (Nishimura et al. 2010).

4.4. Protein OSP94

Kromě klasických proteinů HSP70 existují také atypické proteiny, které jsou podobné HSP70. Tyto proteiny obsahují těžší sekvence 105 až 110 kDa a jsou kódovány třemi geny: *HSPA4*, *HSPA4L*, *HSPH1* (Brocchieri et al. 2008). *Hsp110* je konstitutivně exprimován ve všech myších tkáních. Je vysoce exprimován v mozku a je nejodvozenějším členem rodiny HSP70 (Lee-Yoon et al. 1995). Rodina savčích genů *HSP110* se skládá z genů *HSPA4L* (také známý jako *APG1*, *OSP94* nebo *HSPH3*), *HSPA4* (též *APG2*), *HSPH1* (Hsp 105) a *HSP110*, které kódují stejnojmenné proteiny. (Lee-Yoon et al. 1995; Yasuda et al. 1995; Kojima et al. 1996; Kaneko et al. 1997b; Kaneko et al. 1997a; Brocchieri et al. 2008). Protein OSP94 (Osmotic Stress Protein 94 kDa) byl identifikován jako homolog kvasinkového Hsp110 a byl tedy jako nový člen zařazen do podrodiny stresového proteinu Hsp110/SSE a působí jako molekulární chaperon. Jeho exprese je zvýšená v buňkách vnitřního medulárního sběrného kanálku ledvin během jejich vystavení hyperosmotickému stresu. Gen kóduje 838 aminokyselin velký protein. Stejně jako HSP má OSP94 N-terminální doménu vázající ATP a C-terminální doménu vázající substrát (peptid). A dále bylo prokázáno, že *OSP94* je indukovatelný hyperosmotickým stresem a tepelným šokem (Kojima et al. 1996). Konstitutivní exprese v zárodečných buňkách varlat naznačuje, že OSP94 hraje specifickou roli ve spermatogenezi, stejně jako v reakci na stres (Kaneko, et al. 1997b). Oproti tomu HSP110 a HSP105 jsou konstitutivně exprimovány ve všech myších tkáních a vysoce exprimovány v mozku (Lee-Yoon et al. 1995; Yasuda et al. 1995). Stejně tak exprese OSP94 byla zjištěna ve všech myších tkáních, ale nejhojnější byla ve varlatech a vaječnicích (Kaneko, et al. 1997a). Pozdější studie rovněž prokázala, že OSP94 je exprimován ve všech myších tkáních a převážně ve varlatech. V ledvinách je protein omezen na kortikální segmenty distálních tubulů. U myši s deficitem OSP94 nebyla narušena funkce ledvin ani vývoj do dospělosti, ale zato vykazovaly citlivost na osmotický stres a byl u nich pozorován zvýšený výskyt mužské neplodnosti charakterizovaný sníženým počtem spermií a jejich motility (Held et al. 2006). OSP94 se nachází také v epitelu sběrného kanálku ledvin myši, kde se významně podílí na odolnosti buněk vůči zvýšené osmolaritě (Valkova and Kültz 2006). Funkce OSP94 a HSP110 v reakci na tepelný šok jsou odlišné od funkcí HSP70 (Kaneko et al. 1997b). OSP94 je také ve zvýšené míře exprimován v myokardu při hypertenzi vyvolané hyperosmolaritou (Mala and Takeuchi 2009). Hypertonické prostředí může regulovat transkripci genů jako je *HSP70*, stejně jako genu *OSP94* prostřednictvím TonE/TonEBP. Exprese je řízena MAP kinázovou drahou (p38 a ERK) (Kojima et al. 2004). OSP94 je

ve vyšší míře exprimován ve vnitřním uchu myši a indukován v reakci na hlasitý zvukový stres. OSP94 by tedy měl hrát potenciální roli související s buněčnou adaptací na specifické endoperilymfatické iontové a osmotické prostředí v *kochlee* vnitřního ucha (Yamamoto et al. 2009). Ke stejnému závěru došla i další studie vycházející z vnitřního ucha myši jako modelové tkáně (Kim et al. 2012). Protein OSP94 se váže na rozvinuté polypeptidy, čímž pomáhá bránit jejich agregaci. Jeho C-terminální oblast hraje podobnou roli jako PA28 α (proteasome activator) při opětovném skládání nesbalených proteinů (Kojima et al. 2022). Je tedy možné, že OSP94 má za úkol chránit proteiny s rozvolněnou konformací po hyperosmotickém šoku, případně poškozené proteiny vrátit do správné konformace.

4.5. Cyklooxygenasa – 2 (COX-2)

COX-2 je rovněž známá pod názvem prostaglandin endoperoxid syntáza 2 (PTGS2) a je kódována genem *PTGS2*. Lidský gen *PTGS2*, kódující prostaglandin endoperoxid syntázu 2, má nukleotidovou sekvenci větší než 8,3 kbp a skládá se z deseti exonů. Místo počátku transkripce je 134 bází proti směru translace od místa iniciace translace. Fluorescenční *in situ* hybridizační experimenty ukázaly, že lidský gen *PTGS2* leží na chromosomu 1q25.2-q25.3 (Kosaka et al. 1994). Hypertonicita stimuluje expresi COX-2 prostřednictvím aktivace MAPK dráhy nebo Src kinázové dráhy. Indukce COX-2 může vykazovat specifickou cytoprotektivní funkci v celkové osmotické odpovědi myších medulárních epiteliálních buněk (Yang et al. 2000). Hypertonicita v okolním prostředí indukuje expresi COX-2 v renálních medulárních intersticiálních buňkách ledvin (RMIC). Zvýšená exprese COX-2 je spojena se zvýšenou produkcí prostaglandinů. Ovšem pouze prostaglandin PGI₂ zvýšil životaschopnost buněčné linie RMIC vystavené hypertonickému stresu, prostřednictvím zvýšení exprese transkripčního faktoru PPAR δ (Hao et al. 2002). COX-2 je regulována zejména cytokiny produkovanými imunitním systémem jako je např. IL-1 β . Aktivace exprese je řízena MAP kinázovou p38 drahou, která je aktivována rovněž při zvýšené osmolaritě prostředí (Huang et al. 2013; Cho and Choe 2020). Hypertonicita zvýšila akumulaci organických osmolytů inositolu, sorbitolu a betainu v kultivovaných myších ledvinových medulárních buňkách. Inhibice COX-2 dramaticky snížila expresi genů pro transportéry SMIT, BGT1 a genu pro aldoso-reduktázu, čímž došlo k potlačení mechanismů pro vychytávání organických osmolytů *myo*-inositolu, betainu a sorbitolu za hypertonických podmínek. Akumulace osmolytů ve vnitřní dřeni ledvin je závislá na aktivitě COX-2 a v případě, že jsou tyto osmolyty poskytnuty exogeně, tak stimulují expresi COX-2, která zabrání buněčné smrti (Moeckel et al. 2003). Exprese COX-2

v renálních medulárních intersticiálních buňkách (RMIC) je také indukována aktivací NF- κ B v hypertonických podmínkách (Hao et al. 2000). Ovšem i přesto, že je syntéza mRNA pro COX-2 indukována hypertonicitou, její exprese nezávisí na TonEBP (Woo et al. 2002). Tonicitou indukovaná exprese COX-2 vede k zvýšené produkci prostaglandinu E2 (PGE2), který podporuje přežití MDCK buněk, vystavených osmotickému stresu. Za hyperonických podmínek v přítomnosti PGE2 dochází v MDCK buňkách k potlačení aktivity kaspáz a tak jsou buňky chráněny před apoptózou, která jinak nastává v nepřítomnosti PGE2 (Neuhofer et al. 2007).

4.6. Autofagie

Autofagie zřejmě rovněž hraje roli při pomalé reakci na hypertonický stres, jak je vidět například na ochraně buněk ústního epitelu před hypertonickým poškozením. Autofagie zde hraje klíčovou ochrannou roli v hypertonických stresových reakcích vyvolaných vysokou koncentrací glukózy i chloridu sodného (Yang et al. 2020). Indukce autofagie po hypertonickém stresu zvyšuje přežití buněk. V buněčné linii LLC-PK1 pocházející z proximálního tubulu ledvin bylo prokázáno, že hypertonicita podporuje autofagii a autofagozomální shluky závislé na mikrotubulech. Autofagie hypertonickým stresem vyžadovala remodelaci mikrotubulů (Nunes et al. 2013). Lze se tedy domnívat, že autofagie vede ve svém důsledku ke zvětšení cytoplazmatické koncentrace volných aminokyselin, které pak mohou rovněž plnit funkci osmolytů.

5. Závěr

Buňky se s osmotickým stresem navozeným hypertonicitou vyrovnávají dvěma způsoby, a to pomocí zapnutí rychlého a pomalého adaptačního mechanismu. V rámci rychlého adaptačního mechanismu se jedná o zapnutí signalizační kaskády pomocí WNK kináz, které jsou v hypertonických podmínkách schopny autofosforylace, čímž následně ovlivňují komplex SPAK/OSR1. Ten pak reguluje NKCC a KCC kotransportéry, díky nimž je zajištěna iontová homeostáza buňky. U pomalého adaptačního mechanismu je situace výrazně komplikovanější. Jednak je do něj zapojena celá řada regulačních proteinů a enzymů, které mohou být pro jeden buněčný typ podstatné, ale u jiného pro regulaci potřebné být nemusí. Ovšem, co je pro většinu buněčných typů společné, je aktivace transkripčního faktoru, závislého na hypertonicitě, TonEBP. Jeho aktivita je nejčastěji stimulována p38 MAP kinázou, ale prokázána byla rovněž jeho aktivace prostřednictvím PLC- γ . Transkripční faktor TonEBP následně spouští expresi genů pro transportéry kompatibilních osmolitů, jakými jsou BGT1, SMIT, TAUT, případně i transportérů aminokyselin nebo enzymu aldoso-reduktázy, které pak umožňují akumulaci kompatibilních osmolitů v buňce, a tak umožní udržení buněčné homeostázy a vyrovnání se s hypertonicitou. V extrémním případě může tento typ stresu vést k programované buněčné smrti (kterou ale již nepovažujeme za formu adaptace). Kromě hypertonicity se buňky musí vyrovnávat i s opačnou formou stresu, kterou je hypotonicita. Za těchto podmínek využívají buňky částečně podobné mechanismy, ale jejich bližší popis už je mimo řešené téma práce. Celkově bylo nutné zde popsané regulační kaskády zestručnit, protože podrobnější popis by přesáhl rámec práce. Odpověď buněk na hypertonický stres závisí na konkrétním buněčném typu, ale i na tkáni a jedná se o komplexní proces. Tato práce může posloužit jako přehled základních poznatků, které je možné využít při dalším výzkumu.

6. Literatura

- Ahmed, Mona M., and Mohamed M. A. Hussein. 2020. "Osmoregulatory Element Binding Protein and Osmoprotective Genes as Molecular Biomarkers for Discriminate Patterns of Drowning." *Australian Journal of Forensic Sciences* 52 (2): 146–54. <https://doi.org/10.1080/00450618.2018.1484163>.
- Aida, Kaoru, Yukinobu Ikegishi, Jing Chen, Masato Tawata, Sadahiro Ito, Shuichiro Maeda, and Toshimasa Onaya. 2000. "Disruption of Aldose Reductase Gene (Akr1b1) Causes Defect in Urinary Concentrating Ability and Divalent Cation Homeostasis." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 277 (2): 281–86. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2000.3648>.
- Alfieri, Roberta R., Pier Giorgio Petronini, Mara A. Bonelli, Alessandro E. Caccamo, Andrea Cavazzoni, Angelo F. Borghetti, and Kenneth P. Wheeler. 2001. "Osmotic Regulation of AT2A MRNA Expression and Amino Acid Transport System A Activity." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 283 (1): 174–78. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.4729>.
- Angelis, Elena De, P. Giorgio Petronini, Paolo Borghetti, Angelo F. Borghetti, and Kenneth P. Wheeler. 1999. "Induction of Betaine- γ -Aminobutyric Acid Transport Activity in Porcine Chondrocytes Exposed to Hypertonicity." *Journal of Physiology* 518 (1): 187–94. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.1999.0187r.x>.
- Bauerle, P. A., and D. Baltimore. 1989. "A 65-KappaD Subunit of Active NF-KappaB Is Required for Inhibition of NF-KappaB by I KappaB." *Genes & Development* 3 (11): 1689–98. <https://doi.org/10.1101/gad.3.11.1689>.
- Bagnasco, S. M., S. Uchida, R. S. Balaban, P. F. Kador, and M. B. Burg. 1987. "Induction of Aldose Reductase and Sorbitol in Renal Inner Medullary Cells by Elevated Extracellular NaCl." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84 (6): 1718–20. <https://doi.org/10.1073/pnas.84.6.1718>.
- Berry, Gerard T., John J. Mallee, H. Moo Kwon, Jong S. Rim, Wadia R. Mulla, Maximilian Muenke, and Nancy B. Spinner. 1995. "The Human Osmoregulatory Na⁺/Myo-Inositol Cotransporter Gene (SLC5A3): Molecular Cloning and Localization to Chromosome 21." *Genomics* 25 (2): 507–13. [https://doi.org/10.1016/0888-7543\(95\)80052-N](https://doi.org/10.1016/0888-7543(95)80052-N).
- Bitoun, Marc, Olivier Levillain, Marcel Tappaz, ..., and .. 2001. "Gene Expression of the Taurine Transporter and Taurine Biosynthetic Enzymes in Rat Kidney after Antidiuresis and Salt Loading." *Pflugers Archiv European Journal of Physiology* 442 (1): 87–95. <https://doi.org/10.1007/s004240000506>.
- Bitoun, Marc, and Marcel Tappaz. 2000. "Taurine Down-Regulates Basal and Osmolarity-Induced Gene Expression of Its Transporter, but Not the Gene Expression of Its Biosynthetic Enzymes, in Astrocyte Primary Cultures." *Journal of Neurochemistry* 75 (3): 919–24. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2000.0750919.x>.
- Boyd-Shiwerski, Cary R., Daniel J. Shiwerski, Ankita Roy, Hima N. Namboodiri, Lubika J. Nkashama, Jian Xie, Kara L. McClain, et al. 2018. "Potassium-Regulated Distal Tubule WNK Bodies Are Kidney-Specific WNK1 Dependent." *Molecular Biology of the Cell* 29 (4): 499–509. <https://doi.org/10.1091/mbc.E17-08-0529>.
- Brocchieri, Luciano, Everly Conway De Macario, Alberto J.L. Macario, ..., and .. 2008. "Hsp70 Genes in the Human Genome: Conservation and Differentiation Patterns Predict a Wide Array of Overlapping and Specialized Functions." *BMC Evolutionary Biology* 8 (1): 1–20. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-8-19>.

- Caterina, Michael J., Mark A. Schumacher, Makoto Tominaga, Tobias A. Rosen, Jon D. Levine, and David Julius. 1997. "The Capsaicin Receptor: A Heat-Activated Ion Channel in the Pain Pathway." *Nature* 389 (6653): 816–24. <https://doi.org/10.1038/39807>.
- Cheng, Chih Jen, Joonho Yoon, Michel Baum, and Chou Long Huang. 2015. "STE20/SPS1-Related Proline/Alanine-Rich Kinase (SPAK) Is Critical for Sodium Reabsorption in Isolated, Perfused Thick Ascending Limb." *American Journal of Physiology - Renal Physiology* 308 (5): F437–43. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00493.2013>.
- Cho, Whajung, and Jongseon Choe. 2020. "Prostaglandin E2 Stimulates COX-2 Expression via Mitogen-Activated Protein Kinase P38 but Not ERK in Human Follicular Dendritic Cell-like Cells." *BMC Immunology* 21 (1): 1–8. <https://doi.org/10.1186/s12865-020-00347-y>.
- Choi, Hyowon, Weera Chaiyamongkol, Alexandra C. Doolittle, Zariel I. Johnson, Shilpa S. Gogate, Zachary R. Schoepflin, Irving M. Shapiro, and Makarand V. Risbud. 2018. "COX-2 Expression Mediated by Calcium-TonEBP Signaling Axis under Hyperosmotic Conditions Serves Osmoprotective Function in Nucleus Pulposus Cells." *Journal of Biological Chemistry* 293 (23): 869–8981. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA117.001167>.
- Ciano, Caterina Di, Zilin Nie, Katalin Szászi, Alison Lewis, Takehito Uruno, Xi Zhan, Ori D. Rotstein, Alan Mak, and András Kapus. 2002. "Osmotic Stress-Induced Remodeling of the Cortical Cytoskeleton." *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 283 (3 52-3): 850–65. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00018.2002>.
- Ciura, Sorana, and Charles W. Bourque. 2006. "Transient Receptor Potential Vanilloid 1 Is Required for Intrinsic Osmoreception in Organum Vasculosum Lamina Terminalis Neurons and for Normal Thirst Responses to Systemic Hyperosmolality." *Journal of Neuroscience* 26 (35): 9069–75. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0877-06.2006>.
- Ciura, Sorana, Wolfgang Liedtke, Charles W. Bourque, .., and .. 2011. "Hypertonicity Sensing in Organum Vasculosum Lamina Terminalis Neurons: A Mechanical Process Involving TRPV1 but Not TRPV4." *Journal of Neuroscience* 31 (41): 14669–76. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1420-11.2011>.
- Cohen, D M, J C Wasserman, S R Gullans, ., and .. 1991. "Immediate Early Gene and HSP70 Expression in Hyperosmotic Stress in MDCK Cells." *The American Journal of Physiology* 261 (4 Pt 1): C594-601. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1991.261.4.C594>.
- Craig, Holly D., Murat Günel, Obed Cepeda, Eric W. Johnson, Louis Ptacek, Gary K. Steinberg, Christopher S. Ogilvy, et al. 1998. "Multilocus Linkage Identifies Two New Loci for a Mendelian Form of Stroke, Cerebral Cavernous Malformation, at 7p15-13 and 3q25.2-27." *Human Molecular Genetics* 7 (12): 1851–58. <https://doi.org/10.1093/hmg/7.12.1851>.
- Dahl, Stephen C., Joseph S. Handler, H. Moo Kwon, and .. 2001. "Hypertonicity-Induced Phosphorylation and Nuclear Localization of the Transcription Factor TonEBP." *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 280 (2 49-2): 248–53. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.2001.280.2.c248>.
- Dall'Asta, Valeria, Ovidio Bussolati, Roberto Sala, Alessandro Parolari, Francesco Alamanni, Paolo Biglioli, and Gian C. Gazzola. 1999. "Amino Acids Are Compatible Osmolytes for Volume Recovery after Hypertonic Shrinkage in Vascular Endothelial Cells." *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 276 (4 45-4): 865–72. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1999.276.4.c865>.

- Daoudal, Sylviane, Colette Tournaire, Alain Halere, Georges Veysière, and Claude Jean. 1997. "Isolation of the Mouse Aldose Reductase Promoter and Identification of a Tonicity-Responsive Element." *Journal of Biological Chemistry* 272 (5): 2615–19. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.5.2615>.
- Dayang, Wu, and Pang Dongbo. 2018. "Taurine Prevents Ultraviolet B Induced Apoptosis in Retinal Ganglion Cells." *Cutaneous and Ocular Toxicology* 37 (1): 90–95. <https://doi.org/10.1080/15569527.2017.1339714>.
- Delpire, E., M. I. Rauchman, D. R. Beier, S. C. Hebert, and S. R. Gullans. 1994. "Molecular Cloning and Chromosome Localization of a Putative Basolateral Na⁺-K⁺-2Cl⁻ Cotransporter from Mouse Inner Medullary Collecting Duct (MIMCD-3) Cells." *Journal of Biological Chemistry* 269 (41): 25677–83. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)47302-4](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)47302-4).
- Denkert, Carsten, Ulrich Warskulat, Frank Hensel, and Dieter Häussinger. 1998. "Osmolyte Strategy in Human Monocytes and Macrophages: Involvement of P38(MAPK) in Hyperosmotic Induction of Betaine and Myoinositol Transporters." *Archives of Biochemistry and Biophysics* 354 (1): 172–80. <https://doi.org/10.1006/abbi.1998.0661>.
- Dowd, Brian F.X., and Biff Forbush. 2003. "Pask (Proline-Alanine-Rich STE20-Related Kinase), a Regulatory Kinase of the Na-K-Cl Cotransporter (NKCC1)." *Journal of Biological Chemistry* 278 (30): 27347–53. <https://doi.org/10.1074/jbc.M301899200>.
- Dubovsky, Jan, Joseph M. Zabramski, Janice Kurth, Robert F. Spetzler, Steven S. Rich, Harry T. Orr, and James L. Weber. 1995. "A Gene Responsible for Cavernous Malformations of the Brain Maps to Chromosome 7q." *Human Molecular Genetics* 4 (3): 453–58. <https://doi.org/10.1093/hmg/4.3.453>.
- Ferdaus, Mohammed Z., Karl W. Barber, Karen I. López-Cayuqueo, Andrew S. Terker, Eduardo R. Argaiz, Brandon M. Gassaway, Régine Chambrey, Gerardo Gamba, Jesse Rinehart, and James A. McCormick. 2016. "SPAK and OSR1 Play Essential Roles in Potassium Homeostasis through Actions on the Distal Convulated Tubule." *Journal of Physiology* 594 (17): 4945–66. <https://doi.org/10.1113/JP272311>.
- Ferraris, Joan D., Chester K. Williams, Kyu Yong Jung, Jennifer J. Bedford, Maurice B. Burg, and Arlyn García-Pérez. 1996. "ORE, a Eukaryotic Minimal Essential Osmotic Response Element. The Aldose Reductase Gene in Hyperosmotic Stress." *Journal of Biological Chemistry* 271 (31): 18318–21. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.31.18318>.
- Ferraris, Joan D., Chester K. Williams, Brian M. Martin, Maurice B. Burg, and Arlyn García-Pérez. 1994. "Cloning, Genomic Organization, and Osmotic Response of the Aldose Reductase Gene." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91 (22): 10742–46. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.22.10742>.
- Ferraris, Joan D., Chester K. Williams, Prita Persaud, Zheng Zhang, Ye Chen, and Maurice B. Burg. 2002. "Activity of the TonEBP/OREBP Transactivation Domain Varies Directly with Extracellular NaCl Concentration." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (2): 739–44. <https://doi.org/10.1073/pnas.241637298>.
- Filippi, Beatrice M., Paola De Los Heros, Youcef Mehellou, Iva Navratilova, Robert Gourlay, Maria Deak, Lorna Plater, Rachel Toth, Elton Zeqiraj, and Dario R. Alessi. 2011. "MO25 Is a Master Regulator of SPAK/OSR1 and MST3/MST4/YSK1 Protein Kinases." *EMBO Journal* 30 (9): 1730–41. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.78>.

- Flanagan, S. W., A. J. Ryan, C. V. Gisolfi, and P. L. Moseley. 1995. "Tissue-Specific HSP70 Response in Animals Undergoing Heat Stress." *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology* 268 (1 37-1).
<https://doi.org/10.1152/ajpregu.1995.268.1.r28>.
- Ghosh, Sankar, Ann M. Gifford, Lise R. Riviere, Paul Tempst, Garry P. Nolan, and David Baltimore. 1990. "Cloning of the P50 DNA Binding Subunit of NF-KB: Homology to Rel and Dorsal." *Cell* 62 (5): 1019–29. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90276-K](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90276-K).
- Go, William Y., Xuebin Liu, Michelle A. Roti, Forrest Liu, and Steffan N. Ho. 2004. "NFATS/TonEBP Mutant Mice Define Osmotic Stress as a Critical Feature of the Lymphoid Microenvironment." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (29): 10673–78. <https://doi.org/10.1073/pnas.0403139101>.
- Gradilone, Sergio A., Anatoliy I. Masyuk, Patrick L. Splinter, Jesus M. Banales, Bing Q. Huang, Pamela S. Tietz, Tatyana V. Masyuk, and Nicholas F. LaRusso. 2007. "Cholangiocyte Cilia Express TRPV4 and Detect Changes in Luminal Tonicity Inducing Bicarbonate Secretion." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (48): 19138–43. <https://doi.org/10.1073/pnas.0705964104>.
- Graham, A., L. Brown, P. J. Hedge, A. J. Gammack, and A. F. Markham. 1991a. "Structure of the Human Aldose Reductase Gene." *Journal of Biological Chemistry* 266 (11): 6872–77.
[https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(20\)89582-9](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(20)89582-9).
- Graham, Caroline, Claude Szpirer, Gsrn Levan, and Deborah Carpep. 1991b. "Characterization of the Aldose Reductase-Encoding Gene Family in Rat." *Gene* 107 (2): 259–61.
[https://doi.org/10.1016/0378-1119\(91\)90326-7](https://doi.org/10.1016/0378-1119(91)90326-7).
- Gunthorpe, M. J., H. K. Rami, J. C. Jerman, D. Smart, C. H. Gill, E. M. Soffin, S. Luis Hannan, et al. 2004. "Identification and Characterisation of SB-366791, a Potent and Selective Vanilloid Receptor (VR1/TRPV1) Antagonist." *Neuropharmacology* 46 (1): 133–49.
[https://doi.org/10.1016/S0028-3908\(03\)00305-8](https://doi.org/10.1016/S0028-3908(03)00305-8).
- Gyawali, Asmita, and Young-Sook Kang. 2019. "The Effect of Drug Pre-Treatment on Taurine Transport at the Inner Blood-Retinal Barrier Under Variable Conditions." *Advances in Experimental Medicine and Biology* 1155: 959–75. https://doi.org/10.1007/978-981-13-8023-5_80.
- Hao, Chuan Ming, Reyadh Redha, Jason Morrow, and Matthew D. Breyer. 2002. "Peroxisome Proliferator-Activated Receptor δ Activation Promotes Cell Survival Following Hypertonic Stress." *Journal of Biological Chemistry* 277 (24): 21341–45.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M200695200>.
- Hao, Chuan Ming, Fiona Yull, Timothy Blackwell, Martin Kömhoff, Linda S. Davis, and Matthew D. Breyer. 2000. "Dehydration Activates an NF-KB-Driven, COX2-Dependent Survival Mechanism in Renal Medullary Interstitial Cells." *Journal of Clinical Investigation* 106 (8): 973–82. <https://doi.org/10.1172/JC19956>.
- Harrison, Gail Singer, Harry A. Drabkin, Fa Ten Kao, Judith Hartz, Iris M. Hart, Ernest H.Y. Chu, Barbara J. Wu, and Richard I. Morimoto. 1987. "Chromosomal Location of Human Genes Encoding Major Heat-Shock Protein HSP70." *Somatic Cell and Molecular Genetics* 13 (2): 119–30. <https://doi.org/10.1007/BF01534692>.

- Hatanaka, Takahiro, Wei Huang, Robert G. Martindale, and Vadivel Ganapathy. 2001. "Differential Influence of CAMP on the Expression of the Three Subtypes (ATA1, ATA2, and ATA3) of the Amino Acid Transport System A." *FEBS Letters* 505 (2): 317–20. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(01\)02848-4](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(01)02848-4).
- Hatayama, Takumi, Yasuyuki Asai, Tohru Wakatsuki, Teruko Kitamura, and Hirotsugu Imahara. 1993. "Regulation of Hsp70 Synthesis Induced by Cupric Sulfate and Zinc Sulfate in Thermotolerant HeLa Cells." *Journal of Biochemistry* 114 (4): 592–97. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a124222>.
- Hebinck, A., A. Dalski, H. Engel, M. G. Mattei, R. Hawken, E. Schwinger, and Christine Zühlke. 2000. "Assignment of Transcription Factor NFAT5 to Human Chromosome 16q22.1, Murine Chromosome 8D and Porcine Chromosome 6p1.4 and Comparison of the Polyglutamine Domains." *Cytogenetics and Cell Genetics* 90 (1–2): 68–70. <https://doi.org/10.1159/000015665>.
- Held, Torsten, Ilona Paprotta, Janchiv Khulan, Bernhardt Hemmerlein, Lutz Binder, Stephan Wolf, Stephanie Schubert, Andreas Meinhardt, Wolfgang Engel, and Ibrahim M. Adham. 2006. "Hspa41-Deficient Mice Display Increased Incidence of Male Infertility and Hydronephrosis Development." *Molecular and Cellular Biology* 26 (21): 8099–8108. <https://doi.org/10.1128/mcb.01332-06>.
- Huang, Fengying, Jing Cao, Qihong Liu, Ying Zou, Hongyun Li, and Tuanfang Yin. 2013. "MAPK/ERK Signal Pathway Involved Expression of COX-2 and VEGF by IL-1 β Induced in Human Endometriosis Stromal Cells in Vitro." *International Journal of Clinical and Experimental Pathology* 6 (10): 2129–36.
- Ito, Takashi, Yasushi Fujio, Mayo Hirata, Tomoka Takatani, Takahisa Matsuda, Satoko Muraoka, Kyoko Takahashi, and Junichi Azuma. 2004. "Expression of Taurine Transporter Is Regulated through the TonE (Tonicity-Responsive Element)/TonEBP (TonE-Binding Protein) Pathway and Contributes to Cytoprotection in HepG2 Cells." *Biochemical Journal* 382 (1): 177–82. <https://doi.org/10.1042/BJ20031838>.
- Jhiang, Sissy M., Linda Fithian, Patricia Smanik, Jeffrey McGill, Qiang Tong, and Ernest L. Mazzaferri. 1993. "Cloning of the Human Taurine Transporter and Characterization of Taurine Uptake in Thyroid Cells." *FEBS Letters* 318 (2): 139–44. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(93\)80008-i](https://doi.org/10.1016/0014-5793(93)80008-i).
- Johnson, Zariel I., Alexandra C. Doolittle, Joseph W. Snuggs, Irving M. Shapiro, Christine L. Le Maitre, and Makarand V. Risbud. 2017. "TNF- α Promotes Nuclear Enrichment of the Transcription Factor TonEBP/NFAT5 to Selectively Control Inflammatory but Not Osmoregulatory Responses in Nucleus Pulposus Cells." *Journal of Biological Chemistry* 292 (42): 17561–75. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.790378>.
- Johnson, Zariel I., Irving M. Shapiro, Makarand V. Risbud, .., and .. 2016. "RNA Sequencing Reveals a Role of TonEBP Transcription Factor in Regulation of Pro-Inflammatory Genes in Response to Hyperosmolarity in Healthy Nucleus Pulposus Cells a Homeostatic Response?" *Journal of Biological Chemistry* 291 (52): 26686–97. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.757732>.
- Jones, D P, L A Miller, C Dowling, and R W Chesney. 1991. "Regulation of Taurine Transporter Activity in LLC-PK1 Cells: Role of Protein Synthesis and Protein Kinase C Activation." *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 2 (5): 1021–29. <https://doi.org/10.1681/ASN.V251021>.

- Junger, W G, D B Hoyt, M Hamreus, F C Liu, C Herdon-Remelius, W Junger, and A Altman. 1997. "Hypertonic Saline Activates Protein Tyrosine Kinases and Mitogen-Activated Protein Kinase P38 in T-Cells." *The Journal of Trauma* 42 (3): 435–37. <https://doi.org/10.1097/00005373-199703000-00011>.
- Kahle, Kristopher T., Ignacio Gimenez, Hatim Hassan, Frederick H. Wilson, Robert D. Wong, Biff Forbush, Peter S. Aronson, and Richard P. Lifton. 2004. "WNK4 Regulates Apical and Basolateral Cl⁻ Flux in Extrarenal Epithelia." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (7): 2064–69. <https://doi.org/10.1073/pnas.0308434100>.
- Kahle, Kristopher T., Jesse Rinehart, Paola De Los Heros, Angeliki Louvi, Patricia Meade, Norma Vazquez, Steven C. Hebert, Gerardo Gamba, Ignacio Gimenez, and Richard P. Lifton. 2005. "WNK3 Modulates Transport of Cl⁻ in and out of Cells: Implications for Control of Cell Volume and Neuronal Excitability." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (46): 16783–88. <https://doi.org/10.1073/pnas.0508307102>.
- Kaneko, Yoshiyuki, Toshio Kimura, Masamichi Kishishita, Yoichi Noda, and Jim Fujita. 1997a. "Cloning of Apg-2 Encoding a Novel Member of Heat Shock Protein 110 Family." *Gene* 189 (1): 19–24. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(96\)00807-4](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(96)00807-4).
- Kaneko, Yoshiyuki, Hiroynki Nishiyama, Kohsuke Nonoguchi, Hiroaki Higashitsuji, Masamichi Kishishita, and Jun Fujita. 1997b. "A Novel Hsp110-Related Gene, Apg-1, That Is Abundantly Expressed in the Testis Responds to a Low Temperature Heat Shock Rather than the Traditional Elevated Temperatures." *Journal of Biological Chemistry* 272 (5): 2640–45. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.5.2640>.
- Kieran, Mark, Volker Blank, Frédérique Logeat, Joël Vandekerckhove, Friederich Lottspeich, Odile Le Bail, Manuela B. Urban, Philippe Kourilsky, Patrick A. Baeuerle, and Alain Israël. 1990. "The DNA Binding Subunit of NF- κ B Is Identical to Factor KBF1 and Homologous to the Rel Oncogene Product." *Cell* 62 (5): 1007–18. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90275-J](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90275-J).
- Kim, Chang Hee, Young Chul Kim, Byung Yoon Choi, Ho Sun Lee, Seung Ha Oh, and Young Ho Kim. 2012. "Expression of Osmotic Stress Protein 94 in Murine Endolymphatic Hydrops Model." *Acta Oto-Laryngologica* 132 (SUPPL. 1). <https://doi.org/10.3109/00016489.2012.666804>.
- Kinsman, Brian J., Sarah S. Simmonds, Kirsteen N. Browning, Megan M. Wenner, William B. Farquhar, and Sean D. Stocker. 2020. "Integration of Hypernatremia and Angiotensin II by the Organum Vasculosum of the Lamina Terminalis Regulates Thirst." *Journal of Neuroscience* 40 (10): 2069–79. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2208-19.2020>.
- Ko, Ben C.B., Barbara Ruepp, Kurt M. Bohren, Kenneth H. Gabbay, and Stephen S.M. Chung. 1997. "Identification and Characterization of Multiple Osmotic Response Sequences in the Human Aldose Reductase Gene." *Journal of Biological Chemistry* 272 (26): 16431–37. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.26.16431>.
- Ko, Ben C.B., Christoph W. Turck, Karen W.Y. Lee, Yinqing Yang, and Stephen S.M. Chung. 2000. "Purification, Identification, and Characterization of an Osmotic Response Element Binding Protein." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 270 (1): 52–61. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2000.2376>.
- Kojima, Ryoji, Jeffrey Randall, Barry M. Brenner, and Steven R. Gullans. 1996. "Osmotic Stress Protein 94 (Osp94): A New Member of the Hsp110/SSE Gene Subfamily." *Journal of Biological Chemistry* 271 (21): 12327–32. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.21.12327>.

- Kojima, Ryoji, Jeffrey D. Randall, Eri Ito, Hiroyuki Manshio, Yoshio Suzuki, and Steven R. Gullans. 2004. "Regulation of Expression of the Stress Response Gene, *Osp94*: Identification of the Tonicity Response Element and Intracellular Signalling Pathways." *Biochemical Journal* 380 (3): 783–94. <https://doi.org/10.1042/BJ20040313>.
- Kojima, Ryoji, Shinichi Takai, Hinako Osada, Lina Yamamoto, Misa Furukawa, and Steven R Gullans. 2022. "Novel Function of the C-Terminal Region of the Hsp110 Family Member *Osp94* in Unfolded Protein Refolding." *Journal of Cell Science* 135 (6). <https://doi.org/10.1242/jcs.258542>.
- Kojima, Ryoji, Hajime Taniguchi, Aya Tsuzuki, Kanako Nakamura, Yumi Sakakura, and Mikiyo Ito. 2010. "Hypertonicity-Induced Expression of Monocyte Chemoattractant Protein-1 through a Novel Cis -Acting Element and MAPK Signaling Pathways ." *The Journal of Immunology* 184 (9): 5253–62. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0901298>.
- Kosaka, Tetsuya, Atsuro Miyata, Hayato Ihara, Shuntaro Hara, Tamiko Sugimoto, and Osamu Takeda. 1994. "Characterization of the Human Gene (*PTGS2*)." *European Journal of Biochemistry* 221 (3): 889–97. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1994.tb18804.x>.
- Kültz, D., and D. Chakravarty. 2001. "Hyperosmolality in the Form of Elevated NaCl but Not Urea Causes DNA Damage in Murine Kidney Cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (4): 1999–2004. <https://doi.org/10.1073/pnas.98.4.1999>.
- Kwon, H. M., A. Yamauchi, S. Uchida, A. S. Preston, A. Garcia-Perez, M. B. Burg, and J. S. Handler. 1992. "Cloning of the CDNA for a Na⁺/myo-Inositol Cotransporter, a Hypertonicity Stress Protein." *Journal of Biological Chemistry* 267 (9): 6297–6301. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)42695-6](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)42695-6).
- Lan, Chou Chin, Chung Kan Peng, Shih En Tang, Hsueh Ju Lin, Sung Sen Yang, Chin Pyng Wu, and Kun Lun Huang. 2017. "Inhibition of Na-K-Cl Cotransporter Isoform 1 Reduces Lung Injury Induced by Ischemia–Reperfusion." *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* 153 (1): 206–15. <https://doi.org/10.1016/j.jtcvs.2016.09.068>.
- Lee-Yoon, D., D. Easton, M. Murawski, R. Burd, and J. R. Subjeck. 1995. "Identification of a Major Subfamily of Large Hsp70-like Proteins through the Cloning of the Mammalian 110-KDa Heat Shock Protein." *Journal of Biological Chemistry* 270 (26): 15725–33. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.26.15725>.
- Liao, Maofu, Erhu Cao, David Julius, and Yifan Cheng. 2013. "Structure of the TRPV1 Ion Channel Determined by Electron Cryo-Microscopy." *Nature* 504 (7478): 107–12. <https://doi.org/10.1038/nature12822>.
- Lim, Yun Sook, Jae Seon Lee, Tai Qin Huang, and Jeong Sun Seo. 2008. "Protein Kinase C μ Plays an Essential Role in Hypertonicity-Induced Heat Shock Protein 70 Expression." *Experimental and Molecular Medicine* 40 (6): 596–606. <https://doi.org/10.3858/emm.2008.40.6.596>.
- Lishko, Polina V., Erik Procko, Xiangshu Jin, Christopher B. Phelps, and Rachele Gaudet. 2007. "The Ankyrin Repeats of TRPV1 Bind Multiple Ligands and Modulate Channel Sensitivity." *Neuron* 54 (6): 905–18. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.05.027>.
- Loomis, William H., Sachiko Namiki, Rennolds S. Ostrom, Paul A. Insel, and Wolfgang G. Junger. 2003. "Hypertonic Stress Increases T Cell Interleukin-2 Expression through a Mechanism That Involves ATP Release, P2 Receptor, and P38 MAPK Activation." *Journal of Biological Chemistry* 278 (7): 4590–96. <https://doi.org/10.1074/jbc.M207868200>.

- López-Rodríguez, Cristina, Christopher L. Antos, John M. Shelton, James A. Richardson, Fangming Lin, Tatiana I. Novobrantseva, Roderick T. Bronson, Peter Igarashi, Anjana Rao, and Eric N. Olson. 2004. "Loss of NFAT5 Results in Renal Atrophy and Lack of Tonicity-Responsive Gene Expression." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (8): 2392–97. <https://doi.org/10.1073/pnas.0308703100>.
- López-Rodríguez, Cristina, José Aramburu, Lei Jin, Andrew S. Rakeman, Mayako Michino, and Anjana Rao. 2001. "Bridging the NFAT and NF- κ B Families: NFAT5 Dimerization Regulates Cytokine Gene Transcription in Response to Osmotic Stress." *Immunity* 15 (1): 47–58. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(01\)00165-0](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(01)00165-0).
- López-Rodríguez, Cristina, José Aramburu, Andrew S. Rakeman, and Anjana Rao. 1999. "NFAT5, a Constitutively Nuclear NFAT Protein That Does Not Cooperate with Fos and Jun." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (13): 7214–19. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.13.7214>.
- Los Heros, Paola De, Dario R. Alessi, Robert Gourlay, David G. Campbell, Maria Deak, Thomas J. Macartney, Kristopher T. Kahle, and Jinwei Zhang. 2014. "The WNK-Regulated SPAK/OSR1 Kinases Directly Phosphorylate and Inhibit the K⁺ -Cl⁻ Co-Transporters." *Biochemical Journal* 458 (3): 559–73. <https://doi.org/10.1042/BJ20131478>.
- Maallem, S., A. Berod, M. Mutin, H. M. Kwon, and M. L. Tappaz. 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. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2006.06.028>.
- Mala, John Geraldine Sandana, and Satoru Takeuchi. 2009. "Molecular Cloning of OSP94: A Significant Biomarker Protein of Hypertensive Human Heart and a Member of HSP110 Family." *Molecular Biotechnology* 42 (2): 175–94. <https://doi.org/10.1007/s12033-009-9144-1>.
- Medunjanin, Senad, Maximilian Putzier, Till Nöthen, Sönke Weinert, Thilo Kähne, Blerim Luani, Werner Zuschratter, and Ruediger C. Braun-Dullaeus. 2020. "DNA-PK: Gatekeeper for IKK γ /NEMO Nucleocytoplasmic Shuttling in Genotoxic Stress-Induced NF-KappaB Activation." *Cellular and Molecular Life Sciences* 77 (20): 4133–42. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03411-y>.
- Mehellou, Youcef, Mubarak A. Alamri, Binar A. Dhiani, and Hachemi Kadri. 2018. "C-Terminal Phosphorylation of SPAK and OSR1 Kinases Promotes Their Binding and Activation by the Scaffolding Protein MO25." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 503 (3): 1868–73. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.07.128>.
- Miyai, Akiko, Atsushi Yamauchi, Toshiki Moriyama, Tetsuya Kaneko, Masaru Takenaka, Toshihiro Sugiura, Hiroshi Kitamura, et al. 1996. "Expression of Betaine Transporter mRNA: Its Unique Localization and Rapid Regulation in Rat Kidney." *Kidney International* 50 (3): 819–27. <https://doi.org/10.1038/ki.1996.381>.
- Miyakawa, Hiroshi, Seung Kyoon Woo, Ching Pu Chen, Stephen C. Dahl, Joseph S. Handler, and H. Moo Kwon. 1998. "Cis- and Trans-Acting Factors Regulating Transcription of the BGT1 Gene in Response to Hypertonicity." *American Journal of Physiology - Renal Physiology* 274 (4 43-4): 1152–53. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.1998.274.4.f753>.
- Miyakawa, Hiroshi, Seung Kyoon Woo, Stephen C. Dahl, Joseph S. Handler, and H. Moo Kwon. 1999. "Tonicity-Responsive Enhancer Binding Protein, a Rel-like Protein That Stimulates Transcription in Response to Hypertonicity." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (5): 2538–42. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.5.2538>.

- Moeckel, Gilbert W., Li Zhang, Agnes B. Fogo, Chuan Ming Hao, Ambra Pozzi, and Matthew D. Breyer. 2003. "COX-2 Activity Promotes Organic Osmolyte Accumulation and Adaptation of Renal Medullary Interstitial Cells to Hypertonic Stress." *Journal of Biological Chemistry* 278 (21): 19352–57. <https://doi.org/10.1074/jbc.M302209200>.
- Moiseenkova-bell, Vera Y, Lia A Stanciu, Irina I Serysheva, Ben J Tobe, and Theodore G Wensel. 2008. "Structure of TRPV1 Channel Revealed by Electron Cryomicroscopy" 105 (21): 7451–55. <https://doi.org/10.1073/pnas.0711835105>.
- Moriguchi, Tetsuo, Seiichi Urushiyama, Naoki Hisamoto, Shun Ichiro Iemura, Shinichi Uchida, Tohru Natsume, Kunihiro Matsumoto, and Hiroshi Shibuya. 2005. "WNK1 Regulates Phosphorylation of Cation-Chloride-Coupled Cotransporters via the STE20-Related Kinases, SPAK and OSR1." *Journal of Biological Chemistry* 280 (52): 42685–93. <https://doi.org/10.1074/jbc.M510042200>.
- Nadler, Steven G., Mark A. Tepper, Bernice Schacter, and Charles E. Mazzucco. 1992. "Interaction of the Immunosuppressant Deoxyspergualin with a Member of the Hsp70 Family of Heat Shock Proteins." *American Association for the Advancement of Science* 258 (5081): 484–86. <https://doi.org/10.1126/science.1411548>.
- Naeini, Reza Sharif, Marie France Witty, Philippe Séguéla, and Charles W. Bourque. 2006. "An N-Terminal Variant of Trpv1 Channel Is Required for Osmosensory Transduction." *Nature Neuroscience* 9 (1): 93–98. <https://doi.org/10.1038/nn1614>.
- Neuhofner, Wolfgang, Daniela Steinert, Maria Luisa Fraek, and Franz X. Beck. 2007. "Prostaglandin E2 Stimulates Expression of Osmoprotective Genes in MDCK Cells and Promotes Survival under Hypertonic Conditions." *Journal of Physiology* 583 (1): 287–97. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2007.135178>.
- Nishimura, T., Y. Sai, J. Fujii, M. Muta, H. Iizasa, M. Tomi, M. Deureh, N. Kose, and E. Nakashima. 2010. "Roles of TauT and System A in Cytoprotection of Rat Syncytiotrophoblast Cell Line Exposed to Hypertonic Stress." *Placenta* 31 (11): 1003–9. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2010.08.003>.
- Numazaki, Mitsuko, Tomoko Tominaga, Kumiko Takeuchi, Namie Murayama, Hidenori Toyooka, and Makoto Tominaga. 2003. "Structural Determinant of TRPV1 Desensitization Interacts with Calmodulin." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (13): 8002–6. <https://doi.org/10.1073/pnas.1337252100>.
- Nunes, Paula, Thomas Hernandez, Isabelle Roth, Xiaomu Qiao, Deborah Strebel, Richard Bouley, Anne Charollais, et al. 2013. "Hypertonic Stress Promotes Autophagy and Microtubule-Dependent Autophagosomal Clusters." *Autophagy* 9 (4): 550–67. <https://doi.org/10.4161/auto.23662>.
- Nydam, Trevor L., Ernest E. Moore, Robert C. McIntyre, Franklin L. Wright, Fabia Gamboni-Robertson, Phillip C. Eckels, and Anirban Banerjee. 2009. "Hypertonic Saline Attenuates TNF- α Induced NF- κ B Activation in Pulmonary Epithelial Cells." *Physiology & Behavior* 176 (10): 139–48. <https://doi.org/10.1097/SHK.0b013e31818ec47d.HYPERTONIC>.
- Padda, Ranjit, Ann Wamsley-Davis, Michael C. Gustin, Rebekah Ross, Christina Yu, and David Sheikh-Hamad. 2006. "MEKK3-Mediated Signaling to p38 Kinase and TonE in Hypertonicity Stressed Kidney Cells." *American Journal of Physiology - Renal Physiology* 291 (4): 874–81. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00377.2005>.

- Pae, Chi Un, Tae Suk Kim, Oh Joo Kwon, Paola Artioli, Alessandro Serretti, Chang Uk Lee, Soo Jung Lee, Chul Lee, In Ho Paik, and Jung Jin Kim. 2005. "Polymorphisms of Heat Shock Protein70 Gene (*HSPA1A*, *HSPA1B* and *HSPA1L*) and Schizophrenia." *Neuroscience Research* 53 (1): 8–13. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2005.05.004>.
- Pan, Zan, Zheng Wang, Hua Yang, Fan Zhang, and Peter S. Reinach. 2011. "TRPV1 Activation Is Required for Hypertonicity-Stimulated Inflammatory Cytokine Release in Human Corneal Epithelial Cells." *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 52 (1): 485–93. <https://doi.org/10.1167/iovs.10-5801>.
- Park, Jeongsook, Hwajin Kim, So Yun Park, Sun Woo Lim, Yoon Sook Kim, Dong Hoon Lee, Gu Seob Roh, et al. 2014. "Tonicity-Responsive Enhancer Binding Protein Regulates the Expression of Aldose Reductase and Protein Kinase C δ in a Mouse Model of Diabetic Retinopathy." *Experimental Eye Research* 122: 13–19. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2014.03.001>.
- Payne, John A., and Bliss Forbush. 1994. "Alternatively Spliced Isoforms of the Putative Renal Na-K-Cl Cotransporter Are Differentially Distributed within the Rabbit Kidney." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91 (10): 4544–48. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.10.4544>.
- Payne, John A, Jian-Chao Xu, Melanie Haas, Christian Y Lytle, David Ward, and Bliss Forbush III. 1995. "Primary Structure, Functional Expression, and Chromosomal Localization of the Bumetanide-Sensitive Na-K-Cl Cotransporter in Human Colon *." *Journal of Biological Chemistry* 270 (30): 17977–85. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.30.17977>.
- Petronini, Pier Giorgio, R. Alfieri, E. De Angelis, C. Campanini, A. F. Borghetti, and K. P. Wheeler. 1993. "Different HSP70 Expression and Cell Survival during Adaptive Responses of 3T3 and Transformed 3T3 Cells to Osmotic Stress." *British Journal of Cancer* 67 (3): 493–99. <https://doi.org/10.1038/bjc.1993.92>.
- Petronini, Pier Giorgio, Roberta R. Alfieri, M. Nadia Losio, Alessandro E. Caccamo, Andrea Cavazzoni, Mara A. Bonelli, Angelo F. Borghetti, and Kenneth P. Wheeler. 2000. "Induction of BGT-1 and Amino Acid System A Transport Activities in Endothelial Cells Exposed to Hyperosmolarity." *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology* 279 (5 48-5): 1580–89. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.2000.279.5.r1580>.
- Phan, Mimi N., Holly A. Leddy, Bartholomew J. Votta, Sanjay Kumar, Dana S. Levy, David B. Lipshutz, Hee Lee Suk, Wolfgang Liedtke, and Farshid Guilak. 2009. "Functional Characterization of TRPV4 as an Osmotically Sensitive Ion Channel in Porcine Articular Chondrocytes." *Arthritis and Rheumatism* 60 (10): 3028–37. <https://doi.org/10.1002/art.24799>.
- Piechotta, Kerstin, Jianming Lu, Eric Delpire, ., and . 2002. "Cation Chloride Cotransporters Interact with the Stress-Related Kinases Ste20-Related Proline-Alanine-Rich Kinase (SPAK) and Oxidative Stress Response 1 (OSR1)." *Journal of Biological Chemistry* 277 (52): 50812–19. <https://doi.org/10.1074/jbc.M208108200>.
- Ponce-Coria, José, Pedro San-Cristobal, Kristopher T. Kahle, Norma Vazquez, Diana Pacheco-Alvarez, Paola De Los Heros, Patricia Juárez, et al. 2008. "Regulation of NKCC2 by a Chloride-Sensing Mechanism Involving the WNK3 and SPAK Kinases." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (24): 8458–63. <https://doi.org/10.1073/pnas.0802966105>.

- Porcellati, Francesca, Tommy Hlaing, Masaki Togawa, Martin J. Stevens, Dennis D. Larkin, Yoshiyuki Hosaka, Thomas W. Glover, Douglas N. Henry, Douglas A. Greene, and Paul D. Killen. 1998. "Human Na⁺-Myo-Inositol Cotransporter Gene: Alternate Splicing Generates Diverse Transcripts." *The American Journal of Physiology*, no. 16: 1215–25. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1998.274.5.C1215>.
- Praetorius, H. A., and K. R. Spring. 2001. "Bending the MDCK Cell Primary Cilium Increases Intracellular Calcium." *Journal of Membrane Biology* 184 (1): 71–79. <https://doi.org/10.1007/s00232-001-0075-4>.
- Praetorius, H. A., and Kenneth R Spring. 2003. "The Renal Cell Primary Cilium Functions as a Flow Sensor." *Current Opinion in Nephrology and Hypertension* 12 (5): 517–20. <https://doi.org/10.1097/01.mnh.0000088730.87142.d1>.
- Preston, Agnes S., Atsushi Yamauchi, H. Moo Kwon, and Joseph S. Handler. 1995. "Activators of Protein Kinase A and of Protein Kinase C Inhibit MDCK Cell Myo-Inositol and Betaine Uptake." *Journal of the American Society of Nephrology* 6 (6): 1559–64. <https://doi.org/10.1681/asn.v6i61559>.
- Pukale, Dipak D, Mahmoud Farrag, Ravindra Gudneppanavar, Hannah J Baumann, Michael Konopka, Leah P Shriver, and Nic D Leipzig. 2021. "Osmoregulatory Role of Betaine and Betaine/ γ -Aminobutyric Acid Transporter 1 in Post-Traumatic Syringomyelia." *ACS Chemical Neuroscience* 12 (19): 3567–78. <https://doi.org/10.1021/acscchemneuro.1c00056>.
- Rao, Reena, Chuan Ming Hao, Matthew D. Breyer, ..., and .. 2004. "Hypertonic Stress Activates Glycogen Synthase Kinase 3 β -Mediated Apoptosis of Renal Medullary Interstitial Cells, Suppressing an NF κ B-Driven Cyclooxygenase-2-Dependent Survival Pathway." *Journal of Biological Chemistry* 279 (6): 3949–55. <https://doi.org/10.1074/jbc.M309325200>.
- Razavi, Rozita, Yin Chan, F. Nikoo Afifiyan, Xue Jun Liu, Xiang Wan, Jason Yantha, Hubert Tsui, et al. 2006. "TRPV1⁺ Sensory Neurons Control β Cell Stress and Islet Inflammation in Autoimmune Diabetes." *Cell* 127 (6): 1123–35. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.10.038>.
- Richardson, Ciaran, Kei Sakamoto, Paola De Los Heros, Maria Deak, David G. Campbell, Alan R. Prescott, and Dario R. Alessi. 2011. "Regulation of the NKCC2 Ion Cotransporter by SPAK-OSR1-Dependent and -Independent Pathways." *Journal of Cell Science* 124 (5): 789–800. <https://doi.org/10.1242/jcs.077230>.
- Rim, Jong S., Mohamed G. Atta, Stephen C. Dahl, Gerard T. Berry, Joseph S. Handler, and H. Moo Kwon. 1998. "Transcription of the Sodium/Myo-Inositol Cotransporter Gene Is Regulated by Multiple Tonicity-Responsive Enhancers Spread over 50 Kilobase Pairs in the 5'-Flanking Region." *Journal of Biological Chemistry* 273 (32): 20615–21. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.32.20615>.
- Rodríguez, Angelina, Laura C Berumen, Francisco Zafra, Cecilio Giménez, and María Guadalupe García-Alcocer. 2011. "Expression of the SNAT2 Amino Acid Transporter during the Development of Rat Cerebral Cortex." *International Journal of Developmental Neuroscience* 29 (7): 743–48. <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2011.05.010>.
- Rosenbaum, Tamara, Ariela Gordon-Shaag, Mika Munari, and Sharona E. Gordon. 2004. "Ca²⁺/Calmodulin Modulates TRPV1 Activation by Capsaicin." *Journal of General Physiology* 123 (1): 53–62. <https://doi.org/10.1085/jgp.200308906>.

- Roth, Isabelle, Valérie Leroy, H. Moo Kwon, Pierre Yves Martin, Eric Féraille, and Udo Hasler. 2010. "Osmoprotective Transcription Factor NFAT5/TonEBP Modulates Nuclear Factor-KB Activity." *Molecular Biology of the Cell* 21 (19): 3459–74. <https://doi.org/10.1091/mbc.E10-02-0133>.
- Ruepp, Barbara, Kurt M. Bohren, Kenneth H. Gabbay, and .. 1996. "Characterization of the Osmotic Response Element of the Human Aldose Reductase Gene Promoter." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93 (16): 8624–29. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.16.8624>.
- Sadowska, Aleksandra, Birsen Altinay, Wolfgang Hitzl, Stephen J. Ferguson, and Karin Wuertz-Kozak. 2020. "Hypo-Osmotic Loading Induces Expression of IL-6 in Nucleus Pulposus Cells of the Intervertebral Disc Independent of TRPV4 and TRPM7." *Frontiers in Pharmacology* 11 (July): 1–16. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00952>.
- Salazar, Héctor, Itzel Llorente, Andrés Jara-Oseguera, Refugio García-Villegas, Mika Munari, Sharon E. Gordon, León D. Islas, and Tamara Rosenbaum. 2008. "A Single N-Terminal Cysteine in TRPV1 Determines Activation by Pungent Compounds from Onion and Garlic." *Nature Neuroscience* 11 (3): 255–61. <https://doi.org/10.1038/nn2056>.
- Sarada, Sagi, Patir Himadri, Chitaranjan Mishra, Pradhan Geetali, Mastoori Sai Ram, and Govindan Ilavazhagan. 2008. "Role of Oxidative Stress and NFkB in Hypoxia-Induced Pulmonary Edema." *Experimental Biology and Medicine* 233 (9): 1088–98. <https://doi.org/10.3181/0712-RM-337>.
- Satsu, Hideo, Mariko Manabe, Makoto Shimizu, ..., and .. 2004. "Activation of Ca²⁺/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II Is Involved in Hyperosmotic Induction of the Human Taurine Transporter." *FEBS Letters* 569 (1–3): 123–28. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2004.05.062>.
- Satsu, Hideo, Eriko Terasawa, Yu Hosokawa, and Makoto Shimizu. 2003. "Functional Characterization and Regulation of the Taurine Transporter and Cysteine Dioxygenase in Human Hepatoblastoma HepG2 Cells." *Biochemical Journal* 375 (2): 441–47. <https://doi.org/10.1042/BJ20030535>.
- Schliess, Freimut, Sebina Wiese, Dieter Häussinger, and .. 1998. "Osmotic Regulation of the Heat Shock Response in H4IIE Rat Hepatoma Cell." *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 28 (3): 774–81. <https://doi.org/10.1002/hep.510280326>.
- Sen, Ranjan, and David Baltimore. 1986. "Multiple Nuclear Factors Interact with the Immunoglobulin Enhancer Sequences." *Cell* 46 (5): 705–16. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(86\)90346-6](https://doi.org/10.1016/0092-8674(86)90346-6).
- Serra, Selma A., Predrag Stojakovic, Ramon Amat, Fanny Rubio-Moscardo, Pablo Latorre, Gerhard Seisenbacher, David Canadell, et al. 2021. "LRRC8A-Containing Chloride Channel Is Crucial for Cell Volume Recovery and Survival under Hypertonic Conditions." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 118 (23). <https://doi.org/10.1073/pnas.2025013118>.
- Shapiro, Leland, and Charles A. Dinarello. 1997. "Hyperosmotic Stress as a Stimulant for Proinflammatory Cytokine Production." *Experimental Cell Research* 231 (2): 354–62. <https://doi.org/10.1006/excr.1997.3476>.
- Sheikh-Hamad, David, A. Garcia-Perez, J. D. Ferraris, E. M. Peters, and M. B. Burg. 1994. "Induction of Gene Expression by Heat Shock versus Osmotic Stress." *American Journal of Physiology - Renal Fluid and Electrolyte Physiology* 267 (1 36-1): 28–34. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.1994.267.1.f28>.

- Sheikh-Hamad, David, John Di Mari, Wadi N. Suki, Robert Safirstein, Bruns A. Watts, and Diane Rouse. 1998. "P38 Kinase Activity Is Essential for Osmotic Induction of MRNAs for HSP70 and Transporter for Organic Solute Betaine in Madin-Darby Canine Kidney Cells." *Journal of Biological Chemistry* 273 (3): 1832–37. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.3.1832>.
- Shim, Eun-Hee, Jong-Il Kim, Eui-Suk Bang, Jun-Seok Heo, Jae-Seon Lee, Eun-Young Kim, Jong-Eun Lee, et al. 2002. "Target Disruption of Hsp70.1 Sensitizes to Osmotic Stress." *EMBO Reports* 3 (9): 857–61. <https://doi.org/10.1093/embo-reports/kvf175>.
- Simon, David B., Fiona E. Karet, Jahed M. Hamdan, Antonio Di Pietro, Sami A. Sanjad, and Lifton. 1996. "Bartter's Syndrome, Hypokalaemic Alkalosis with Hypercalciuria, Is Caused by Mutation in the Na-K-2Cl Cotransporter NKCC2." *Nature Genetics* 13 (2): 183–88. <https://doi.org/10.1038/ng0696-183>.
- Siroky, Brian J., Nancy K. Kleene, Steven J. Kleene, Charles D. Varnell, Raven G. Comer, Jialiu Liu, Lu Lu, Nolan W. Pachciarz, John J. Bissler, and Bradley P. Dixon. 2017. "Primary Cilia Regulate the Osmotic Stress Response of Renal Epithelial Cells through TRPM3." *American Journal of Physiology - Renal Physiology* 312 (4): F791–805. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00465.2015>.
- Smardo, F. L., M. B. Burg, A. Garcia-Perez, ., and . 1992. "Kidney Aldose Reductase Gene Transcription Is Osmotically Regulated." *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 262 (3 31-3). <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1992.262.3.c776>.
- Stipanuk, Martha H., Halina Jurkowska, Julie Niewiadomski, Kevin M. Mazor, Heather B. Roman, and Lawrence L. Hirschberger. 2017. "Identification of Taurine-Responsive Genes in Murine Liver Using the Cdo1-Null Mouse Model." *Advances in Experimental Medicine and Biology* 975: 475–95. https://doi.org/10.1007/978-94-024-1079-2_38.
- Su, Jiahui, Xiyang Liu, Chuanming Xu, Xiaohan Lu, Fei Wang, Hui Fang, Aihua Lu, Qixiang Qiu, Chunling Li, and Tianxin Yang. 2017. "NF- κ B-Dependent Upregulation of (pro)Renin Receptor Mediates High-NaCl-Induced Apoptosis in Mouse Inner Medullary Collecting Duct Cells." *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 313 (6): C612–20. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00068.2017>.
- Takahashi, Yu, Tomohiro Nishimura, Tetsuo Maruyama, Masatoshi Tomi, and Emi Nakashima. 2017. "Contributions of System A Subtypes to α -Methylaminoisobutyric Acid Uptake by Placental Microvillous Membranes of Human and Rat." *Amino Acids* 49 (4): 795–803. <https://doi.org/10.1007/s00726-017-2384-7>.
- Takenaka, Masaru, Serena M. Bagnasco, Agnes S. Preston, Shinichi Uchida, Atsushi Yamauchi, H. Moo Kwon, and Joseph S. Handler. 1995. "The Canine Betaine γ -Amino-n-Butyric Acid Transporter Gene: Diverse mRNA Isoforms Are Regulated by Hypertonicity and Are Expressed in a Tissue-Specific Manner." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92 (4): 1072–76. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.4.1072>.
- Takenaka, Masaru, Agnes S. Preston, H. Moo Kwon, and Joseph S. Handler. 1994. "The Tonicity-Sensitive Element That Mediates Increased Transcription of the Betaine Transporter Gene in Response to Hypertonic Stress." *Journal of Biological Chemistry* 269 (47): 29379–81. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)43888-4](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)43888-4).

- Tessier, Steven, Alexandra C. Doolittle, Kimheak Sao, Jeremy D. Rotty, James E. Bear, Veronica Ulici, Richard F. Loeser, Irving M. Shapiro, Brian O. Diekman, and Makarand V. Risbud. 2020. "Arp2/3 Inactivation Causes Intervertebral Disc and Cartilage Degeneration with Dysregulated TonEBP-Mediated Osmoadaptation." *JCI Insight* 5 (4): 1–19. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.131382>.
- Thomson, Martin N., Catherina A. Cuevas, Tim M. Bewarder, Carsten Dittmayer, Lauren N. Miller, Jinge Si, Ryan J. Cornelius, et al. 2020. "WNK Bodies Cluster WNK4 and SPAK/OSR1 to Promote NCC Activation in Hypokalemia." *American Journal of Physiology - Renal Physiology* 318 (1): F216–28. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00232.2019>.
- Topper, James N., Scott M. Wasserman, Keith R. Anderson, Jiexing Cai, Dean Falb, and Michael A. Gimbrone. 1997. "Expression of the Bumetanide-Sensitive Na-K-Cl Cotransporter BSC2 Is Differentially Regulated by Fluid Mechanical and Inflammatory Cytokine Stimuli in Vascular Endothelium." *Journal of Clinical Investigation* 99 (12): 2941–49. <https://doi.org/10.1172/JCI119489>.
- Trama, Jason, William Y. Go, and Steffan N. Ho. 2002. "The Osmoprotective Function of the NFAT5 Transcription Factor in T Cell Development and Activation." *The Journal of Immunology* 169 (10): 5477–88. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.169.10.5477>.
- Tsai, Tsung Ting, Keith G. Danielson, Asha Guttapalli, Erbil Oguz, Todd J. Albert, Irving M. Shapiro, and Makarand V. Risbud. 2006. "TonEBP/OREBP Is a Regulator of Nucleus Pulposus Cell Function and Survival in the Intervertebral Disc." *Journal of Biological Chemistry* 281 (35): 25416–24. <https://doi.org/10.1074/jbc.M601969200>.
- Tsai, Tsung Ting, Asha Guttapalli, Amit Agrawal, Todd J. Albert, Irving M. Shapiro, and Makarand V. Risbud. 2007. "MEK/ERK Signaling Controls Osmoregulation of Nucleus Pulposus Cells of the Intervertebral Disc by Transactivation of TonEBP/OREBP." *Journal of Bone and Mineral Research* 22 (7): 965–74. <https://doi.org/10.1359/jbmr.070322>.
- Uchida, Shinichi, H. Moo Kwon, Atsushi Yamauchi, Agnes S. Preston, Fumiaki Marumo, and Joseph S. Handler. 1992. "Molecular Cloning of the cDNA for an MDCK Cell Na⁺ And Cl⁻-Dependent Taurine Transporter That Is Regulated by Hypertonicity." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89 (17): 8230–34. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.17.8230>.
- Uchida, Shinichi, Takeshi Nakanishi, H. Moo Kwon, Agnes S. Preston, and Joseph S. Handler. 1991. "Taurine Behaves as an Osmolyte in Madin-Darby Canine Kidney Cells: Protection by Polarized, Regulated Transport of Taurine." *Journal of Clinical Investigation* 88 (2): 656–62. <https://doi.org/10.1172/JCI115350>.
- Uchida, Shinichi, Atsushi Yamauchi, Agnes S. Preston, H. Moo Kwon, and Joseph S. Handler. 1993. "Medium Tonicity Regulates Expression of the Na⁺ and Cl⁻-Dependent Betaine Transporter in Madin-Darby Canine Kidney Cells by Increasing Transcription of the Transporter Gene." *Journal of Clinical Investigation* 91 (4): 1604–7. <https://doi.org/10.1172/JCI116367>.
- Uhlik, Mark T., Amy N. Abell, Nancy L. Johnson, Weiyong Sun, Bruce D. Cuevas, Katherine E. Lobel-Rice, Eric A. Horne, Mark L. Dell'Acqua, and Gary L. Johnson. 2003. "Rac-MEKK3-MKK3 Scaffolding for P38 MAPK Activation during Hyperosmotic Shock." *Nature Cell Biology* 5 (12): 1104–10. <https://doi.org/10.1038/ncb1071>.

- Valkova, Nelly, and Dietmar Kültz. 2006. "Constitutive and Inducible Stress Proteins Dominate the Proteome of the Murine Inner Medullary Collecting Duct-3 (MIMCD3) Cell Line." *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics* 1764 (6): 1007–20. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2006.03.007>.
- Varoqui, Hélène, Heming Zhu, Dongdong Yao, Hong Ming, and Jeffrey D. Erickson. 2000. "Cloning and Functional Identification of a Neuronal Glutamine Transporter." *Journal of Biological Chemistry* 275 (6): 4049–54. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.6.4049>.
- Verissimo, F., and P. Jordan. 2001. "WNK Kinases, a Novel Protein Kinase Subfamily in Multi-Cellular Organisms." *Oncogene* 20 (39): 5562–69. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1204726>.
- Vitari, Alberto C., Maria Deak, Nick A. Morrice, and Dario R. Alessi. 2005. "The WNK1 and WNK4 Protein Kinases That Are Mutated in Gordon's Hypertension Syndrome Phosphorylate and Activate SPAK and OSR1 Protein Kinases." *Biochemical Journal* 391 (1): 17–24. <https://doi.org/10.1042/BJ20051180>.
- Vitari, Alberto C., Jacob Thastrup, Fatema H. Rafiqi, Maria Deak, Nick A. Morrice, Håkan K.R. Karlsson, and Dario R. Alessi. 2006. "Functional Interactions of the SPAK/OSR1 Kinases with Their Upstream Activator WNK1 and Downstream Substrate NKCC1." *Biochemical Journal* 397 (1): 223–31. <https://doi.org/10.1042/BJ20060220>.
- Wagner, M., I. Hermanns, F. Bittinger, and C. J. Kirkpatrick. 1999. "Induction of Stress Proteins in Human Endothelial Cells by Heavy Metal Ions and Heat Shock." *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology* 277 (5 21-5). <https://doi.org/10.1152/ajplung.1999.277.5.11026>.
- Wang, K., K. M. Bohren, K. H. Gabbay, ., and . 1993. "Characterization of the Human Aldose Reductase Gene Promoter." *Journal of Biological Chemistry* 268 (21): 16052–58. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)82356-0](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)82356-0).
- Wermuth, Bendicht, Hanspeter Bürgisser, Kurt Bohren, and Jean-Pierre Von Wartburg. 1982. "Purification and Characterization of Human-Brain Aldose Reductase." *European Journal of Biochemistry* 127 (2): 279–84. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1982.tb06867.x>.
- Williams, G T, and R I Morimoto. 1990. "Maximal Stress-Induced Transcription from the Human HSP70 Promoter Requires Interactions with the Basal Promoter Elements Independent of Rotational Alignment." *Molecular and Cellular Biology* 10 (6): 3125–36. <https://doi.org/10.1128/mcb.10.6.3125-3136.1990>.
- Woo, Seung Kyoan, Sang Do Lee, Ki Young Na, Won Kun Park, and H. Moo Kwon. 2002. "TonEBP/NFAT5 Stimulates Transcription of HSP70 in Response to Hypertonicity." *Molecular and Cellular Biology* 22 (16): 5753–60. <https://doi.org/10.1128/mcb.22.16.5753-5760.2002>.
- Woo, Seung Kyoan, Djikolngar Maouyo, Joseph S. Handler, and H. Moo Kwon. 2000. "Nuclear Redistribution of Tonicity-Responsive Enhancer Binding Protein Requires Proteasome Activity." *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 278 (2 47-2): 323–30. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.2000.278.2.c323>.
- Wu, Congying, Elizabeth M. Haynes, Sreeja B. Asokan, Jeremy M. Simon, Norman E. Sharpless, Albert S. Baldwin, Ian J. Davis, Gary L. Johnson, and James E. Bear. 2013. "Loss of Arp2/3 Induces an NF-KB-Dependent, Nonautonomous Effect on Chemotactic Signaling." *Journal of Cell Biology* 203 (6): 907–16. <https://doi.org/10.1083/jcb.201306032>.

- Xie, Xupin, Changping Huang, Dong Xu, Yongchang Liu, Mengxiao Hu, Jianyun Long, and Xin Fang. 2021. "Elevation of Hypertonicity-Induced Protein NFAT5 Promotes Apoptosis of Human Umbilical Vein Endothelial Cells through the NF-KB Pathway." *Molecular Medicine Reports* 23 (3). <https://doi.org/10.3892/mmr.2021.11823>.
- Xu, Bing E., Jessie M. English, Julie L. Wilsbacher, Steve Stippec, Elizabeth J. Goldsmith, and Melanie H. Cobb. 2000. "WNK1, a Novel Mammalian Serine/Threonine Protein Kinase Lacking the Catalytic Lysine in Subdomain II." *Journal of Biological Chemistry* 275 (22): 16795–801. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.22.16795>.
- Yamamoto, H., X. Shi, A. L. Nuttall, ..., and .. 2009. "The Influence of Loud Sound Stress on Expression of Osmotic Stress Protein 94 in the Murine Inner Ear." *Neuroscience* 158 (4): 1691–98. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2008.10.063>.
- Yamauchi, A., S. Uchida, H. M. Kwon, A. S. Preston, R. B. Robey, A. Garcia-Perez, M. B. Burg, and J. S. Handler. 1992. "Cloning of a Na⁺- and Cl-Dependent Betaine Transporter That Is Regulated by Hypertonicity." *Journal of Biological Chemistry* 267 (1): 649–52. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)48543-2](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)48543-2).
- Yamauchi, Atsushi, Shinichi Uchida, Agnes S. Preston, H. Moo Kwon, and Joseph S. Handler. 1993. "Hypertonicity Stimulates Transcription of Gene for Na⁺/Myo-Inositol Cotransporter in MDCK Cells" 4 (1): 1–23. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.1993.264.1.F20>.
- Yang, Bingmei, Andrea D. Hodgkinson, Peter J. Oates, Moo Kwon Hyug, Beverley A. Millward, and Andrew G. Demaine. 2006. "Elevated Activity of Transcription Factor Nuclear Factor of Activated T-Cells 5 (NFAT5) and Diabetic Nephropathy." *Diabetes* 55 (5): 1450–55. <https://doi.org/10.2337/db05-1260>.
- Yang, Ji, Huijie Zhang, Sujiao Sun, Xue Wang, Ying Guan, Qili Mi, Wanli Zeng, et al. 2020. "Autophagy and Hsp70 Activation Alleviate Oral Epithelial Cell Death Induced by Food-Derived Hypertonicity." *Cell Stress and Chaperones* 25 (2): 253–64. <https://doi.org/10.1007/s12192-020-01068-2>.
- Yang, Tianxin, Yuning Huang, Lynn E Heasley, Tomas Berl, Jurgen B. Schnermann, and Josephine P. Briggs. 2000. "MAPK Mediation of Hypertonicity-Stimulated Cyclooxygenase-2 Expression in Renal Medullary Collecting Duct Cells." *Journal of Biological Chemistry* 275 (30): 23281–86. <https://doi.org/10.1074/jbc.M910237199>.
- Yao, Dongdong, Bryan Mackenzie, Hong Ming, Hélène Varoqui, Heming Zhu, Matthias A. Hediger, and Jeffrey D. Erickson. 2000. "A Novel System A Isoform Mediating Na⁺/Neutral Amino Acid Cotransport." *Journal of Biological Chemistry* 275 (30): 22790–97. <https://doi.org/10.1074/jbc.M002965200>.
- Yasuda, Kunihiko, Akira Nakai, Takumi Hatayama, and Kazuhiro Nagata. 1995. "Cloning and Expression of Murine High Molecular Mass Heat Shock Proteins, HSP105." *Journal of Biological Chemistry* 270 (50): 29718–23. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.50.29718>.
- Ye, Byeong Jin, Hwan Hee Lee, Eun Jin Yoo, Chae Young Lee, Jun Ho Lee, Hyun Je Kang, Gyu Won Jeong, et al. 2020. "TonEBP in Dendritic Cells Mediates Pro-Inflammatory Maturation and Th1/Th17 Responses." *Cell Death and Disease* 11 (6). <https://doi.org/10.1038/s41419-020-2632-8>.
- Yiangou, Y., P. Facer, A. Ford, C. Brady, O. Wiseman, C. J. Fowler, and P. Anand. 2001. "Capsaicin Receptor VR1 and ATP-Gated Ion Channel P2X3 in Human Urinary Bladder." *BJU International* 87 (9): 774–79. <https://doi.org/10.1046/j.1464-410X.2001.02190.x>.

- Zagórska, Anna, Eulalia Pozo-Guisado, Jérôme Boudeau, Alberto C. Vitari, Fatema H. Rafiqi, Jacob Thastrup, Maria Deak, et al. 2007. "Regulation of Activity and Localization of the WNK1 Protein Kinase by Hyperosmotic Stress." *Journal of Cell Biology* 176 (1): 89–100. <https://doi.org/10.1083/jcb.200605093>.
- Zawistowski, Jon S., Lisa Stalheim, Mark T. Uhlik, Amy N. Abell, Brooke B. Ancrile, Gary L. Johnson, and Douglas A. Marchuk. 2005. "CCM1 and CCM2 Protein Interactions in Cell Signaling: Implications for Cerebral Cavemous Malformations Pathogenesis." *Human Molecular Genetics* 14 (17): 2521–31. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddi256>.
- Zhou, Xiaoming, Yuichiro Izumi, Maurice B. Burg, and Joan D. Ferraris. 2011. "Rac1/Osmosensing Scaffold for MEKK3 Contributes via Phospholipase C- γ 1 to Activation of the Osmoprotective Transcription Factor NFAT5." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (29): 12155–60. <https://doi.org/10.1073/pnas.1108107108>.