

INS-1 세포에서 SHP에 의해 유도된 유전자발현의 변화에 대한 마이크로어레이 분석

대구가톨릭대학교 의과대학 내과학교실, 경북대학교 의과대학 내과학교실¹

정의달, 이지현, 장원구¹, 김정국¹, 김보완¹, 이인규¹

Microarray Analysis of Short Heterodimer Partner (SHP)-induced Changes in Gene Expression in INS-1 Cells

Eui-Dal Jung, Ji-Hyun Lee, Won-Gu Jang¹, Jung-Guk Kim¹, Bo-Wan Kim¹, In-Kyu Lee¹

Department of Internal Medicine, Catholic University of Daegu School of Medicine; and

Department of Internal Medicine¹, Kyungpook National University College of Medicine

Abstract

Background: Nuclear receptors are involved in the cell growth, development, differentiation, and metabolism. The orphan nuclear receptor SHP which lacks a DNA-binding domain is a negative regulator of nuclear receptor signaling pathways. In pancreas, SHP regulate transcriptional activity of HNF3 and HNF4 through binding them and BETA2 which is involved in beta cell differentiation and insulin production. Here, we examined transcriptional activity changes of genes expressed in beta cell when SHP was overexpressed.

Method: INS-1 cells of passage number 24 - 30 were prepared. Affimetrix DNA chip was used to examine gene expression in INS-1 cell when SHP was overexpressed. INS-1 cells were infected with adenovirus-SHP to overexpress SHP. To confirm the result of DNA chip, we used real time RT-PCR.

Result: When SHP was overexpressed by adenovirus-SHP transfection, FXR, Transforming growth factor, beta 2, fructose-1,6-bisphosphatase 2, bone morphogenetic protein 4 genes expression were increased. Contrarily, Activating transcription factor 2, Glycogen synthase kinase 3 alpha, Nur 77, fibroblast growth factor 14 genes expression were decreased. We confirmed DNA microarray analysis by real time RT-PCR. FXR, tribbles homolog 3 (Drosophila), fructose-1,6-bisphosphatase 2, CD36 genes expression were increased in real time RT-PCR. Nur 77 and cAMP response element modulator genes expression were decreased in real time RT-PCR.

Conclusion: we identified several genes which expression are regulated by SHP in pancreas beta cell. These results help to explain how SHP act in the various metabolism of pancreas beta cell. (*J Kor Diabetes Assoc* 31:193~199, 2007)

Key Words: DNA chip, INS-1 cell, Real time RT-PCR, SHP

서 론

핵 호르몬 수용체(Nuclear Hormone Receptor)는 스테로이드와 같은 리간드뿐만 아니라 다양한 신호전달에 의해 표적 유전자들의 발현을 조절하는 전사조절인자로 알려져 있다¹⁾. 핵 호르몬 수용체는 크게 갑상선 수용체, 레티로이드

(Retinoid Acid) 수용체, 스테로이드 수용체, 그리고 그 수용체에 대한 정확한 리간드가 아직까지 밝혀지지 않은 고아 핵 수용체(Orphan Nuclear Receptor)로 분류된다.

SHP는 핵 수용체들의 상호결합(homo, heterodimer) 성질과 Yeast Two Hybrid Screening 방법을 도입하여, CAR (Constitutive Androstane Receptor)를 bait로 이용한 liver

cDNA library screening 결과 CAR-interacting protein으로 처음 클로닝되었다²⁾. SHP는 간, 심장, 췌장, 소장 등의 조직에서 발현되며, 많은 다른 핵 호르몬 수용체들과 상호작용하여 전사활성능력을 억제시킨다²⁾. SHP의 이런 억제작용은 두 가지 기전을 통해 이루어지는데, 첫 번째는 SHP가 활성화된 핵 호르몬 수용체에 결합하려는 보조 활성인자와의 경쟁을 통해 이루어지고, 두 번째는 직접적으로 전사활성의 억제자로 작용하여 이루어진다. SHP가 전사활성인자의 DNA 결합을 방해하는 핵 수용체로는 CAR, HNF4, PXR, nuclear receptor subfamily 4, group A, member 2 (Nur77) 등이 존재하며, SHP에 의해 보조인자와의 결합이 방해받는 전사인자들은 ER, GR, LRH-1, ERR, LXR 등과 같은 핵 수용체들이 있다²⁻¹⁰⁾. SHP 발현을 증가시키는 전사인자들인 HNF4, LRH-1, LXR, nuclear receptor subfamily 1, group H, member 4 (FXR) 등은 콜레스테롤로부터 담즙산을 합성하는데 중요한 전사인자이며^{11,12)}, SREBP-1은 지질대사에 중요한 전사인자이다¹³⁾. 따라서 이러한 전사활성인자들에 의해 발현이 증가되는 SHP는 포도당, 담즙, 지질 등의 대사에 밀접한 관계를 할 것으로 추측된다. SHP는 간과 췌장에서 당신생합성이나 인슐린분비에 관여한다고 알려진 전사인자 HNF3, HNF4와 결합하여 그들의 전사활성도를 조절하고^{6,14)}, 인슐린을 생산하는 베타세포의 분화와 인슐린합성에 관여하는 전사인자 BETA2의 전사활성도를 조절한다¹⁵⁾. 또한 SHP의 돌연변이가 사람에서 발견되었으며, 이 연구는 SHP 유전자다형성(R34X, A195S, G171A)이 비만이나 인슐린분비와 밀접한 관계가 있음을 시사하였다^{16,17)}.

DNA chip은 1995년 미국 스탠포드대학의 생화학과에서 약 2~3천개의 유전자를 1 cm² 넓이 안에 집약시킨 형태로 처음 개발되었다. 초기엔 유전자의 발현변화 측정을 목적으로 cDNA chip을 만들었지만 이후에 돌연변이를 검색할 수 있는 oligonucleotide chip도 개발되었다. 이는 기존의 Southern이나 Northern blot과 비슷하나, 하나의 chip에 여러 종류의 DNA가 부착되어 있어 많은 수의 유전자를 동시에 분석할 수 있고, 극히 소량의 샘플만으로 분석할 수 있는 장점이 있다. DNA chip을 이용하면 수만개의 유전자 발현을 동시에 검색할 수 있으며, 기존의 differential display, representational difference analysis 등과 같은 방법과 호환하면 더 많은 수의 유전자 발현을 비교할 수 있다.

이에 본 연구에서는 DNA chip을 이용하여 SHP에 의해 췌장베타세포주인 INS-1 세포에서 유전자들의 발현이 어떻게 변화되고, 이런 변화된 유전자들이 췌장베타세포의 여러 대사과정과 어떤 연관관계가 있는지를 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

1. 세포배양

INS-1 세포는 계대 번호가 24에서 30번 사이의 것을 사용하였고, RPMI1640 배양용액에 11.1 mM glucose, 10 mM HEPES, 10% FBS, 2 mM L-glutamine, 1 mM sodium pyruvate, 50 M β -mercaptoethanol, 100 U/mL penicillin, and 100 g/mL streptomycin을 추가한 배지에서 배양하였다.

2. Adeno Viral SHP 재조 및 Transfection

재조합 virus의 합성은 다음과 같이 수행하였다¹⁸⁾. Full-length SHP cDNA를 pAdTrack-cytomegalovirus [CMV; AdEasy system; containing green fluorescent protein (GFP) and CMV promoter]에 클로닝하였다. 그 후 pAd-SHP를 BJ5183 bacteria에 pAdEasy-1 (containing the viral backbone)와 함께 Kanamycin LB plates에서 co-transformation하였다. 이것을 증폭하고 plasmid midi-prep system (Qiagen, Valencia, CA)를 이용하여 순수분리 하였다. 그 후 293 세포에서 더욱 증폭시키고, adeno-X rapid titration kit (BD bioscience, Palo Alto, CA)를 이용하여 적정하였다. SHP 유전자의 과발현 실험은 INS-1 세포가 배양용기에 80~90% 정도로 자랐을 때 adenoviral SHP를 100 MOI로 처리하였고, 대조군은 Null virus를 동일 농도로 처리하였다. Infection 시간은 2시간으로 하였으며 그 후 배양용액을 교체하고 24시간 더 배양한 후 RNA를 분리하여 발현의 차이를 보이는 유전자를 탐색하였다.

3. RNA Extraction 및 DNA Microarray

DNA microarray 분석을 위한 RNA의 준비는 TRIZOL reagent (Invitrogen)를 이용하였다. 간단히 요약하면 충분히 세포를 씻어낸 후 1 mL TRIZOL reagent를 처리하고 상온에 5분간 방치하였다. 그 후 4°C 12,000 rpm에서 10분간 원심분리하고 상층용액을 새 tube에 옮겼다. 여기에 0.2 mL의 chloroform을 첨가하고 15초 동안 vortex하였다. 그 후 15분 동안 상온에 방치 하였다가 후 4°C 12,000 rpm에서 15분간 원심분리하고 상층용액을 새 tube에 옮겼다. 동일 부피의 isopropanol을 첨가하고 상온에서 5분간 방치하였다가 4°C 12,000 rpm에서 15분간 원심분리하였다. 그 뒤 세척과정을 거치고 말린 후 RNeasy mini kit으로 clean up과정을 거쳤다. 10 g의 total RNA를 DNA microarray 실험에 사용하였으며, Affymetrix chip (Rat 230 2.0)을 이용하여 분석하였다. 발현의 차이가 2배 이상 증가 혹은 2배 이상 감소하는 것을 의미있는 유전자로 선별하였으며, realtime RT-PCR을 통하여 발현패턴을 재확인하였다.

4. Realtime RT-PCR

cDNA 합성은 TaqMan Reverse Transcription reagent (Applied Biosystems, California)를 이용하였다. 5 mg의 total RNA, 500 mM dNTP, 2.5 mM random hexamers, 0.8 U RNase inhibitor, 25 U의 MultiScribe reverse transcriptase를 넣어 20 mL 양으로 맞추었다. Real-time PCR 반응은 ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems, California)과 SYBR Green PCR master mix (Applied Biosystems, California)를 이용해서 수행하였다. 증폭은 96 well plate에 12.5 mL의 2X SYBR Green PCR Master Mix, 0.04 mM의 primer와

cDNA를 넣고 20 mL로 맞추어 수행하였다. PCR 조건은 50°C에서 2분, 95°C에서 10분으로 시작하고 이후에 95°C에 15초, 60°C에서 1분으로 40회를 수행하였다. 마지막으로 데이터의 해석은 2^{-DDCt} method를 이용하여 분석하였다¹⁹⁾.

결 과

1. INS-1세포에서 발현되는 유전자들의 SHP 유전자 과발현에 의한 변화

INS-1 세포에서 SHP 유전자 과발현에 의해 GTPase IMAP family member 4, Insulin-like growth factor 1, transforming

Table 1. Upregulated genes by SHP overexpression

Gene Title	Fold change
GTPase, IMAP family member 4	5.09
Insulin-like growth factor 1 mRNA, 3' end of mRNA	3.16
Phosphodiesterase 1C	3.12
Heat shock 70kD protein 1B	2.75
Intercellular adhesion molecule 1	2.74
FXR	2.21
Transforming growth factor, beta 2	2.14
ADP-ribosyltransferase 2b	2.00
Bone morphogenetic protein 4	1.83
Tribbles homolog 3 (Drosophila)	1.73
Fructose-1,6-bisphosphatase 2	1.48
Bone morphogenetic protein 2	1.19
TCDD-inducible poly(ADP-ribose) polymerase	1.15
Chemokine (C-X-C motif) ligand 11	1.03

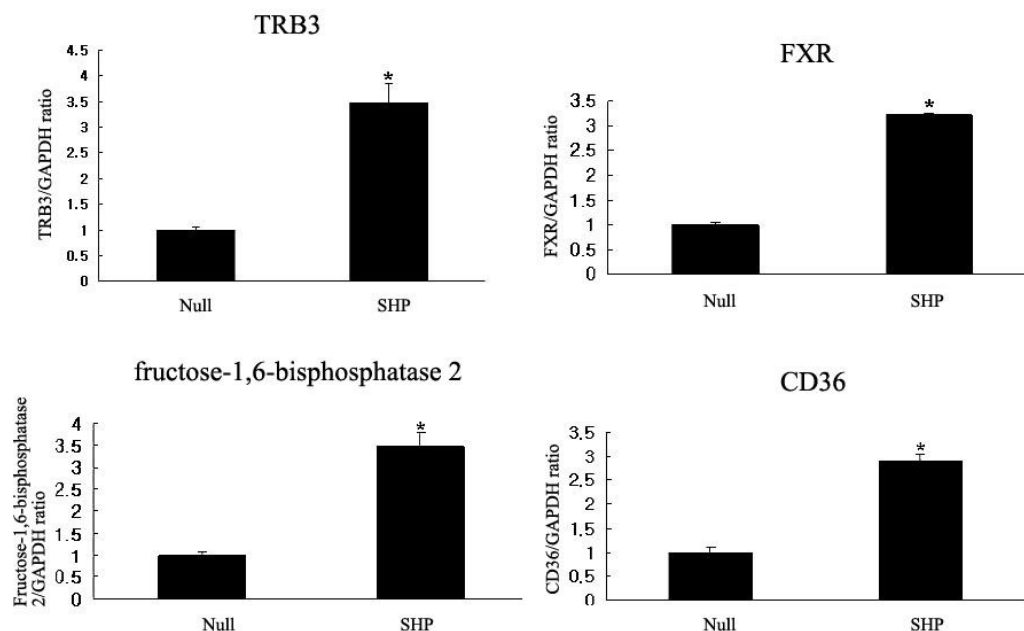


Fig. 1. Realtime RT-PCR of genes that are up-regulated by SHP overexpression in DNA chip assay. FXR, tribbles homolog 3 (Drosophila), fructose-1,6-bisphosphatase 2, CD36 genes expression were increased in Realtime RT-PCR when SHP was overexpressed by SHP adenovirus transfection. * $P < 0.05$ vs. Null-adenovirus.

growth factor-beta 2, FXR, tribbles homolog 3 (Drosophila), fructose-1,6-bisphosphatase 2, bone morphogenetic protein 4, bone morphogenetic protein 2, chemokine (C-X-C motif) ligand 11, CD36 등의 유전자 발현이 2배 이상 증가하였으며(Table 1), DNA chip에서 얻은 결과를 realtime RT-PCR을 통해 확인한 결과 FXR, tribble homolog 3 (Drosophila), fructose-1,6-bisphosphatase 2, CD 36의 유전자 발현이 SHP 과발현에 의해 증가되었다(Fig. 1). INS-1 세포에서 SHP 과발현에 의해 Cytochrome P450, family 2, subfamily d, polypeptide 22, G-protein -coupled receptor GPR34, Glycogen synthase kinase 3 alpha, aquaporin 6, glucagon, Nur 77, Protein kinase C, beta 1, Activating transcription factor 2 등의 유전자 발현이 2배 이상 감소되었으며(Table 2), realtime RT-PCR로 확인한 결과, SHP 과발현에 의한 Nur 77, cAMP response element modulator의 유전자 발현 감소를 확인하였다(Fig. 2).

2. INS-1세포에서 SHP에 의해 조절되는 유전자들의 기능에 따른 분류

SHP 과발현에 의해 조절되는 유전자들을 기능에 따라

분류하면 다음과 같다(Table 3). Fructose-1,6-bisphosphatase 2, glucagon, Glycogen synthase kinase 3 alpha가 포도당 대사에 관여하였고, Fructose-1,6-bisphosphatase 2의 유전자 발현은 증가하였으나, glucagon, Glycogen synthase kinase 3 alpha의 유전자 발현은 감소하였다. Colony stimulating factor 1, transforming growth factor-beta 2, activating transcription factor 3는 세포 증식에 관여하였고, 세 유전자의 발현은 모두 증가하였다. Intercellular adhesion molecule 1, protein tyrosine kinase 3, serine protease inhibitor, kazal type 3는 세포 유착에 관여하였고, intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), serine protease inhibitor, kazal type 3의 유전자 발현은 증가하였고, protein tyrosine kinase 3의 유전자 발현은 감소하였다. Tribbles homolog 3 (Drosophila), BCL2-like 11 (apoptosis facilitator), Nur 77, Activating transcription factor 2은 세포자멸사에 관여하였고, tribbles homolog 3 (Drosophila), BCL2-like 11 (apoptosis facilitator)의 유전자 발현은 증가하였고, Nur 77, Activating transcription factor 2의 유전자 발현은 감소하였다.

Table 2. Downregulated genes by SHP overexpression

Gene Title	Fold Change
Cytochrome P450, family 2, subfamily d, polypeptide 22	-4.25
G-protein-coupled receptor GPR34	-2.78
Collagen, type 1, alpha 1	-2.65
Colony stimulating factor 1 receptor	-1.60
Activating transcription factor 2	-1.39
Aquaporin 6	-1.27
Glucagon	-1.20
Fibroblast growth factor 14	-1.10
Nur 77	-1.10
Aquaporin 1	-1.08
Protein kinase C, beta 1	-1.05

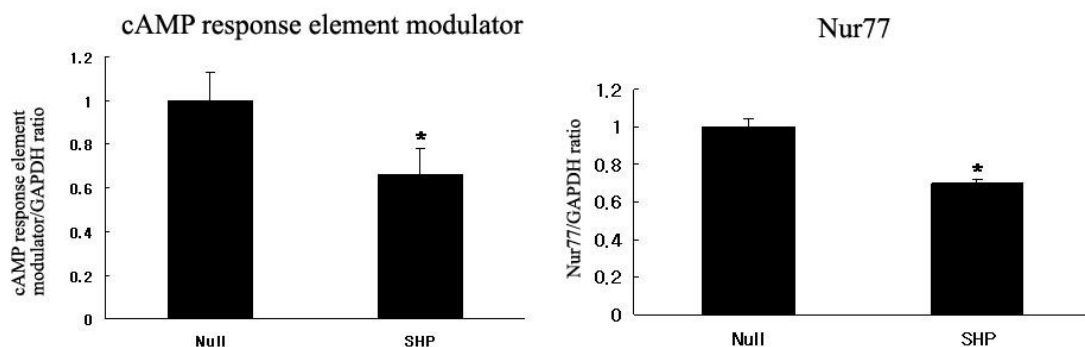


Fig. 2. Realtime RT-PCR of genes that are down-regulated by SHP overexpression in DNA chip assay. Nur 77 and cAMP response element modulator genes expression were decreased in Realtime RT-PCR when SHP was overexpressed by SHP adenovirus transfection. * $P < 0.05$ vs. Null-adenovirus.

Table 3. Function of SHP-regulated genes

Carbohydrate metabolism	
	Fructose-1,6-bisphosphatase 2
	Glucagon
	Glycogen synthase kinase 3 alpha
Cell proliferation	
	Transforming growth factor, beta 2
	Activating transcription factor 3
	Colony stimulating factor 1 (Macrophage)
Cell adhesion	
	Intercellular adhesion molecule 1
	Protein tyrosine kinase 3
	Serine protease inhibitor, kazal type 5
Apoptosis	
	Tribbles homolog 3 (Drosophila)
	BCL2-like 11 (apoptosis facilitator)
	Nur 77
	Activating transcription factor 2

고 찰

INS-1 세포에 SHP를 과발현시킨 경우, 세포자멸사에 관여하는 유전자인 tribbles homolog 3 (*Drosophila*), BCL2-like 11 (apoptosis facilitator)의 유전자 발현은 증가하였지만, Nur 77의 유전자 발현은 감소하였다. Roche 등의 보고에 의하면 Nur 77의 mRNA는 INS-1 세포에서 지방산인 Palmitate와 oleate에 의해 증가됨을 알 수 있다²⁰. SHP가 Nur 77과의 상호작용을 통해 췌장베타세포에서 지방 독성과 관련된 중요한 역할을 할 것으로 기대되므로 이에 대한 추가적인 연구가 필요하다. SHP는 또한 세포 증식에 관여하는 colony stimulating factor 1, transforming growth factor-beta 2, activating transcription factor 3의 유전자발현에 관여하였다. Transforming growth factor-beta는 췌장 외분비 세포인 AR42J 세포가 인슐린을 분비하는 내분비세포로 분화하는데 작용하는 exendin-4의 작용에 관여하며, exendin-4와 TGF-beta를 동시에 주었을 때, 인슐린의 mRNA의 발현이 기저치에 비해 20배나 증가하였다²¹. 생쥐의 췌장 베타세포에서 ICAM-1의 발현을 증가시켰을 때, 세포독성 T-세포를 통해 췌장베타세포의 손상을 악화시켜 자가면역 당뇨병을 유발하였다²². IA-2A-양성 어린이에서 soluble ICAM-1 농도와 IA-2A 농도 사이의 연관성은 soluble ICAM-1이 발현이 낮은 제1형 당뇨병의 전임상단계에서부터 증가한다는 것을 시사하였다²³.

Lu 등은 췌장-특이적 IGF-1 유전자 결핍을 만들었을 때, 혈당이 감소하고, 췌도세포의 크기가 2.3배 증가되었고, 스트렙토조토신에 의한 베타세포자멸사가 감소되는 것을 보고하였다²⁴. 이와는 반대로, Srinivasan 등은 생쥐의 insulinoma 세포에서 ER 스트레스에 의한 세포자멸사가 IGF-1을 같이 투여함으로써 억제된다는 보고를 하였다²⁵. 또한 siRNA로

glycogen synthase kinase 3 beta의 발현을 80% 억제하였을 때, ER 스트레스에 의한 세포자멸사에 세포가 저항성을 나타내는 것을 보여주었다. Yew 등은 BMP 신호전달과정의 세포 내 중간자인 Smad-1과 Smad-8이 exendin-4를 투여하여 인슐린을 합성하는 베타세포로 분화하는 AR42J 세포에서 의미있게 증가하는 것을 보여줌으로써 AR42J 세포가 인슐린을 분비하는 세포로 분화하는 과정에 BMP 신호전달이 exendin-4 신호전달의 새로운 하부조절자라는 것과 transforming growth factor-beta isoform 신호전달의 상부조절자로 작용할 수 있음을 시사하였다²⁶.

Ke Ma 등은 담즙산 대사와 지질대사에 SHP와 함께 중요한 조절자인 FXR이 포도당 대사의 유지에 중요한 조절작용을 한다는 것을 보여주었다²⁷. FXR이 결핍된 생쥐에서 심한 지방간과 혈중 유리지방산의 증가가 나타났으며, 혈당의 증가와 인슐린저항성을 동반하였으며, FXR이 결핍된 골격근과 간에서 인슐린 신호전달의 여러 과정이 나타나지 않았다. FXR이 결핍된 생쥐와는 반대로, 담즙산으로 FXR을 활성화시킨 야생 생쥐에서 당신생과 관련된 유전자의 발현은 억제되었으며, 혈당은 감소하였다. Konstantinos 등은 간에서 SHP의 발현을 증가시켰을 때, 콜레스테롤 대사, 담즙산 합성, 지질 이동과 합성 등의 다양한 대사과정에 관여하는 유전자들에 영향을 미친다고 보고하였다²⁸. SHP의 지속된 발현은 FXR α 를 직접적으로 억제함으로써 간내 담즙의 양을 감소시키고, 간내 중성지방의 축적을 야기했다. Yamagata 등은 담즙산이 SHP에 의존적으로 당신생에 관여하는 유전자들인 glucose-6-phosphatase (G6Pase), phosphoenolpyruvate carboxykinase, fructose 1,6-bis phosphatase의 발현을 억제한다고 보고하였다²⁹. Wang 등은 갈색세포에서 SHP가 갈색지방세포에서 PGC-1 α 의 발현을 억제한다고 보고하였다³⁰. SHP가 결핍된 생쥐는 PGC-1 α 의 기초 발현이 증가되었고, 에너지 소비가 증가되었으며, 식이에 의해 유발된 비만에 저항성을 보였다. SHP의 PGC-1 α 의 발현에 대한 영향은 ERR γ 의 PGC-1 α 프로모터에 대한 활성화를 억제함으로써 일어난다고 보고하였다. 본 연구에서 SHP는 췌장소도세포인 INS-1 세포에서 당대사에 관여하는 glucagon, fructose-1, 6-bisphosphatase 2, glycogen synthase kinase 3 alpha의 유전자 발현에 영향을 주었다. Yamagata 등의 연구에서와 마찬가지로, SHP 과발현은 당신생에 관여하는 fructose-1, 6-bisphosphatase 2의 발현을 증가시켰고, 반대로 당신생에 관여하는 glucagon의 발현은 감소시켰다. SHP가 췌도베타세포에서 당신생에 어떤 작용을 할 것인지에 대해서는 좀 더 연구가 진행되어야 할 것으로 보인다. 결론적으로, SHP는 INS-1 세포에서 당대사과정, 세포증식, 세포자멸사과정 등 여러 과정에 관여하는 유전자들의 발현을 조절하였다. 이와 같은 SHP의 작용이 췌장베타세포의 포도당, 지질대사 등에 어떤 영향을 줄 것인지에 대해서는 추가적인 연구가

필요할 것으로 보인다.

요 약

연구배경: 고아 핵 수용체인 SHP는 간과 췌장에서 당신 생합성이나 인슐린분비에 관여한다고 알려진 전사인자 HNF3, HNF4와 결합하여 그들의 전사활성도를 조절하고, 베타세포의 분화와 인슐린합성에 관여하는 전사인자 BETA2의 전사활성도를 조절한다. DNA chip을 이용하면 수만개의 유전자 발현을 동시에 검색할 수 있다. 이에 저자들은 DNA chip을 이용하여 INS-1 세포에서 SHP에 의해 유전자 발현이 어떻게 변화되는지를 관찰하고자 하였다.

방법: INS-1 세포에서 affimetrix사의 DNA chip을 이용하여 대조군과 SHP 아테노바이러스를 이입한 군에서 유전자 발현의 차이를 관찰하였다. 발현의 차이가 2배 이상 증가 혹은 2배 이상 감소하는 것을 의미 있는 유전자로 선별하였으며, realtime RT-PCR을 통하여 DNA chip의 발현패턴을 재확인 하였다.

결과: SHP 아테노바이러스를 이입한 INS-1 세포에서 FXR, Transforming growth factor, beta 2, tribbles homolog 3 (Drosophila), fructose-1,6-bisphosphatase 2, bone morphogenetic protein 4 등의 유전자의 발현이 증가되고, 그에 반해 Activating transcription factor 2, Glycogen synthase kinase 3 alpha, aquaporin 6, Nur 77, fibroblast growth factor 14 등의 유전자의 발현이 감소하였다. Real time RT-PCR을 통해 DNA chip의 결과를 확인해 본 결과, FXR, tribbles homolog 3 (Drosophila), fructose-1,6-bisphosphatase 2의 유전자 발현이 증가되었고, cAMP response element modulator, Nur 77의 유전자 발현이 감소되었다.

결론: 본 연구를 통해 INS-1 세포에서 SHP에 의해 발현이 조절되는 유전자를 발견함으로써 SHP가 췌장소도세포의 대사과정에 작용하는 기전을 연구하는데 도움이 될 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

1. O'Malley BW, Buller RE: *Herman Beerman lecture. Mechanisms of steroid hormone action. J Invest Dermatol* 68:1-4, 1977
2. Seol W, Choi HS, Moore DD: *An orphan nuclear hormone receptor that lacks a DNA binding domain and heterodimerizes with other receptors. Science* 272:1336-9, 1996
3. Borgius LJ, Steffensen KR, Gustafsson JA, Treuter E: *Glucocorticoid signaling is perturbed by the atypical*

orphan receptor and corepressor SHP. J Biol Chem 277:49761-6, 2002

4. Johansson L, Thomsen JS, Dandimopoulos AE, Spyrou G, Gustafsson JA, Treuter E: *The orphan nuclear receptor SHP inhibits agonist-dependent transcriptional activity of estrogen receptors ERalpha and ERbeta. J Biol Chem* 274:345-53, 1999
5. Seol W, Hanstein B, Brown M, Moore DD: *Inhibition of estrogen receptor action by the orphan receptor SHP (short heterodimer partner). Mol Endocrinol* 12:1551-7, 1998
6. Lee YK, Dell H, Dowhan DH, Hadzopoulou-Cladaras M, Moore DD: *The orphan nuclear receptor SHP inhibits hepatocyte nuclear factor 4 and retinoid X receptor transactivation: two mechanisms for repression. Mol Cell Biol* 20:187-95, 2000
7. Sanyal S, Kim JY, Kim HJ, Takeda J, Lee YK, Moore DD, Choi HS: *Differential regulation of the orphan nuclear receptor small heterodimer partner (SHP) gene promoter by orphan nuclear receptor ERR isoforms. J Biol Chem* 277:1739-48, 2002
8. Brendel C, Schoonjans K, Botrugno OA, Treuter E, Auwerx J: *The small heterodimer partner interacts with the liver X receptor alpha and represses its transcriptional activity. Mol Endocrinol* 16:2065-76, 2002
9. Ourlin JC, Lasserre F, Pineau T, Fabre JM, Sa-Cunha A, Maurel P, Vilarem MJ, Pascucci JM: *The small heterodimer partner interacts with the pregnane X receptor and represses its transcriptional activity. Mol Endocrinol* 17:1693-703, 2003
10. Yeo MG, Yoo YG, Choi HS, Pak YK, Lee MO: *Negative cross-talk between Nur77 and small heterodimer partner and its role in apoptotic cell death of hepatoma cells. Mol Endocrinol* 19:950-63, 2005
11. Jung D, Kullak-Ublick GA: *Hepatocyte nuclear factor 1 alpha: a key mediator of the effect of bile acids on gene expression. Hepatology* 37:622-31, 2003
12. Goodwin B, Jones SA, Price RR, Watson MA, McKee DD, Moore LB, Galardi C, Wilson JG, Lewis MC, Roth ME, Maloney PR, Willson TM, Kliewer SA: *A regulatory cascade of the nuclear receptors FXR, SHP-1, and LRH-1 represses bile acid biosynthesis. Mol Cell* 6:517-26, 2000
13. Kim HJ, Kim JY, Kim JY, Park SK, Seo JH, Kim JB, Lee IK, Kim KS, Choi HS: *Differential*

- regulation of human and mouse orphan nuclear receptor small heterodimer partner promoter by sterol regulatory element binding protein-1. J Biol Chem* 279:28122-31, 2004
14. Kim JY, Kim HJ, Kim KT, Park YY, Seong HA, Park KC, Lee IK, Ha H, Shong M, Park SC, Choi HS: Orphan nuclear receptor small heterodimer partner represses hepatocyte nuclear factor 3/Foxa transactivation via inhibition of its DNA binding. *Mol Endocrinol* 18:2880-94, 2004
15. Kim JY, Chu K, Kim HJ, Seong HA, Park KC, Sanyal S, Takeda J, Ha H, Shong M, Tsai MJ, Choi HS: Orphan nuclear receptor small heterodimer partner, a novel corepressor for a basic helix-loop-helix transcription factor BETA2/neuroD. *Mol Endocrinol* 18:776-90, 2004
16. Nishigori H, Tomura H, Tonooka N, Kanamori M, Yamada S, Sho K, Inoue I, Kikuchi N, Onigata K, Kojima I, Kohama T, Yamagata K, Yang Q, Matsuzawa Y, Miki T, Seino S, Kim MY, Choi HS, Lee YK, Moore DD, Takeda J: Mutations in the small heterodimer partner gene are associated with mild obesity in Japanese subjects. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:575-80, 2001
17. Mitchell SM, Weedon MN, Owen KR, Shields B, Wilkins-Wall B, Walker M, McCarthy MI, Frayling TM, Hattersley AT: Genetic variation in the small heterodimer partner gene and young-onset type 2 diabetes, obesity, and birth weight in U.K. subjects. *Diabetes* 52:1276-9, 2003
18. He TC, Zhou S, da Costa LT, Yu J, Kinzler KW, Vogelstein B: A simplified system for generating recombinant adenoviruses. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:2509-14, 1998
19. Livak KJ, Schmittgen TD: Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-DDCt} method. *Methods* 25:402-8, 2001
20. Roche E, Buteau J, Aniento I, Reig JA, Soria B, Prentki M: Palmitate and oleate induce the immediate-early response genes *c-fos* and *nur-77* in the pancreatic beta-cell line INS-1. *Diabetes* 48:2007-14, 1999
21. Yew KH, Prasad KL, Preuett BL, Hembree MJ, McFall CR, Benjes CL, Crowley AR, Sharp SL, Li Z, Tulachan SS, Mehta SS, Gittes GK: Interplay of glucagon-like peptide-1 and transforming growth factor-beta signaling in insulin-positive differentiation of AR42J cells. *Diabetes* 53:2824-35, 2004
22. Yagi N, Yokono K, Amano K, Nagata M, Tsukamoto K, Hasegawa Y, Yoneda R, Okamoto N, Moriyama H, Miki M: Expression of intercellular adhesion molecule 1 on pancreatic beta-cells accelerates beta-cell destruction by cytotoxic T-cells in murine autoimmune diabetes. *Diabetes* 44:744-52, 1995
23. Toivonen A, Kulmala P, Rahko J, Ilonen J, Knip M: Soluble adhesion molecules in Finnish schoolchildren with signs of preclinical type 1 diabetes. *Diabetes Metab Res Rev* 20:48-54, 2004
24. Lu Y, Herrera PL, Guo Y, Sun D, Tang Z, LeRoith D, Liu JL: Pancreatic-specific inactivation of IGF-I gene causes enlarged pancreatic islets and significant resistance to diabetes. *Diabetes* 53:3131-41, 2004
25. Srinivasan S, Ohsugi M, Liu Z, Fatrai S, Bernal-Mizrachi E, Permutt MA: Endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis is partly mediated by reduced insulin signaling through phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and increased glycogen synthase kinase-3beta in mouse insulinoma cells. *Diabetes* 54:968-75, 2005
26. Yew KH, Hembree M, Prasad K, Preuett B, McFall C, Benjes C, Crowley A, Sharp S, Tulachan S, Mehta S, Tei E, Gittes G: Cross-talk between bone morphogenetic protein and transforming growth factor-beta signaling is essential for exendin-4-induced insulin-positive differentiation of AR42J cells. *J Biol Chem* 280:32209-17, 2005
27. Ma K, Saha PK, Chan L, Moore DD: Farnesoid X receptor is essential for normal glucose homeostasis. *J Clin Invest* 116:1102-9, 2006
28. Boulias K, Katrakili N, Bamberg K, Underhill P, Greenfield A, Talianidis I: Regulation of hepatic metabolic pathways by the orphan nuclear receptor SHP. *EMBO J* 24:2624-33, 2005
29. Yamagata K, Daitoku H, Shimamoto Y, Matsuzaki H, Hirota K, Ishida J, Fukamizu A: Bile acids regulate gluconeogenic gene expression via small heterodimer partner-mediated repression of hepatocyte nuclear factor 4 and Foxo1. *J Biol Chem* 279:23158-65, 2004
30. Wang L, Liu J, Saha P, Huang J, Chan L, Spiegelman B, Moore DD: The orphan nuclear receptor SHP regulates PGC-1alpha expression and energy production in brown adipocytes. *Cell Metab* 2:227-38, 2005