

한국인에서 PSMA6 (rs1048990)와 PSMB5 (rs2230087) 유전자 다형성과 제2형 당뇨병과의 연관성

경북대학교 의과대학 내과학교실, 경북대학교병원 의료전문서비스 인력양성사업원¹, 계명대학교 의과대학 내과학교실², 서울대학교 의과대학 내과학교실³, 계명대학교 자연과학대학 생물학과⁴

김희경 · 김수원¹ · 도윤정 · 김새롬 · 김미경² · 박근규² · 김혜순² · 박경수³ · 유 민⁴ · 김정국 · 김보완 · 이인규

Association of the Polymorphisms in the PSMA6 (rs1048990) and PSMB5 (rs2230087) Genes with Type 2 Diabetes in Korean Subjects

Hee Kyoung Kim, Su Won Kim¹, Yun Jeong Doh, Sae Rom Kim, Mi Kyung Kim², Keun Gyu Park², Hye Soon Kim², Kyong Soo Park³, Min Yoo⁴, Jung Guk Kim, Bo Wan Kim, In Kyu Lee

Department of Internal Medicine, Kyungpook National University School of Medicine;

Medical Education Program For Human Resources¹, Kyungpook National University;

Department of Internal Medicine², Keimyung University School of Medicine;

Department of Internal Medicine³, Seoul National University School of Medicine; and

Department of Biology⁴, College of Nature Science, Keimyung University

Abstract

Background: The 26S ubiquitin-proteasome system (UPS) is a principal proteolytic pathway of intracellular molecules regulating apoptosis, cell cycle, cell proliferation or differentiation, inflammation and etc. The recent study suggests that the rs1048990 (C/G) polymorphism of the proteasome subunit α type 6 (PSMA6) gene is associated with the increase of the risk of myocardial infarction by the dysregulation of I κ B degradation. We hypothesized that 26S UPS is important in the development of insulin resistance and type 2 diabetes (T2DM) by controlling the degradation of I κ B and insulin receptor substances as a substrate. We therefore investigated whether the rs1048990 (C/G) polymorphism of PSMA6 gene and the rs2230087 (G/A) polymorphism of proteasome subunit β type 5 gene (PSMB5), that is chymotrypsin-like protease determining the rate of proteolysis, are associated with susceptibility to T2DM in Korean subjects.

Methods: We examined the polymorphisms of these genes in 309 diabetic subjects and 170 non-diabetic controls. The polymorphisms of rs1048990 (C/G) and rs2230087 (G/A) were genotyped by real-time PCR.

Results: The frequency of the G allele of rs1048990 (C/G) and the A allele of rs2230087 (G/A) polymorphisms was significantly higher in diabetic patients (28% and 13%) compared to that in controls (13% and 1%; $P = 0.000$ and $P = 0.000$, respectively). Logistic regression analysis of the rs1048990 (C/G) polymorphism showed that the odds ratio (OR) (adjusted for age, smoking, waist circumference, fasting plasma glucose, systolic blood pressure, HDL-C, triglyceride, and total cholesterol) was 3.93 (95% confidence interval [CI], 2.35-6.59; $P = 0.000$) for the G allele and 5.09 (95% CI, 2.71-9.57; $P = 0.000$) for CG and GG genotype when compared with the CC genotype. Logistic regression analysis of the rs2230087 (G/A) polymorphism showed

접수일자: 2008년 2월 28일, 통과일자: 2008년 5월 15일, 책임저자: 이인규, 경북대학교 의과대학 내과학교실

* 본 연구는 한국 과학재단의 국가지정연구실사업(No. ROA-2006-000-10271-02007)과 2007년도 산업자원부와 한국산업기술재단의 지역혁신인력양성사업으로 수행된 연구이며, 두뇌한국21사업의 지원으로 수행되었음.

that the adjusted OR was 5.70 (95% CI, 1.63-19.98; $P = 0.007$) for the A allele and 6.08 (95% CI, 1.66-22.29; $P = 0.006$) for GA and AA genotype when compared with the GG genotype. In multiple logistic regression analysis with T2DM as the independent Variable rs1048990 (C/G) and rs2230087 (G/A) polymorphisms were the predictor for T2DM.

Conclusion: We suggest that the G allele of rs1048990 (C/G) polymorphism and the A allele of rs2230087 (G/A) polymorphism may be genetic risk factor to type 2 diabetes mellitus in Korean subjects. (KOREAN DIABETES J 32:204-214, 2008)

Key Words: Polymorphism, Proteasome subunit α type 6, Proteasome subunit β type 5 gene, Type 2 diabetes, Ubiquitin-proteasome system

서 론

26S 유비퀴틴-프로테아좀 시스템 (ubiquitin-proteasome system, UPS)은 진핵세포 내 존재하는 주요 단백질 분해 경로로서 세포사멸, 세포주기, 세포분화 및 증식과 염증에 관련하여 단백질 분해를 선택적으로 중재함으로써 세포의 생리적 기능을 조절하는 것으로 알려졌다¹⁾. UPS에 의한 단백질 분해는 비폴딩 단백질, 손상된 단백질로 인해 세포의 기능과 생존에 해를 미치는 단백질을 빠르게 제거하는 작용을 하여 세포 내 생리조절을 함으로써 암의 발생, 알츠하이머병 (Alzheimer disease)이나 파킨슨병 (Parkinson's disease)과 같은 신경 무력증 그리고 헌팅턴질환 (Huntington's disease)와 같은 유전성 신경질환들과 관련되어 있는 것으로 보고되고 있다²⁾.

UPS는 세 가지 효소의 연속적인 반응을 통해 분해될 기질 단백질이 유비퀴틴화 과정을 거친 후 26S 프로테아좀이 유비퀴틴으로 표지된 기질단백질을 인지하여 분해하게 된다³⁾. 26S 프로테아좀은 약 2.5 MDa의 거대한 다촉매 효소 (multicatalytic protease)로써 세포질 및 핵에 존재하며 촉매 활성을 가진 20S 아단위와 조절자인 2개의 19S로 구성된다. 또한 20S 아단위는 구조적 역할을 하는 7개의 알파 아단위와 촉매활성에서 핵심적 역할을 하는 7개의 베타 아단위로 구성되어 있다²⁾.

최근 일본에서 심근경색 환자들을 대상으로 시행한 연구에서는 염색체 14q13.2에 위치한 프로테아좀 아단위 알파 6 (PSMA6) 유전자의 엑손 1에서 발견된 rs1048990 (C/G) 유전자 다형성에서 G 대립형질 (allele)의 빈도가 심근경색증 환자에서 높았으며, 이는 대립형질 G의 빈도가 Nuclear factor- κ B (NF- κ B)의 활성에 영향을 미쳐 심근경색증의 위험을 증가시킴을 보여주었다⁴⁾. NF- κ B는 세포질 내에서

I- κ B와 복합체를 이루어 그 활성이 억제되며, UPS에 의해 기질단백질인 I- κ B가 분해됨으로써 NF- κ B의 활성이 증가되어 인슐린저항성에 영향을 미칠 것으로 알려져 있다^{5,6)}. Insulin receptor substrate (IRS) 또한 인슐린 신호전달 과정에서 중요한 역할을 하는 기질단백질로써 유비퀴틴화 후 26S에 의해 IRS 단백질이 분해됨으로써 인슐린저항성에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다⁷⁻⁹⁾.

프로테아좀 알파 아단위뿐만 아니라 프로테아좀 베타 아단위는 촉매활성을 가지고 있어 유전자 변이가 있을 때 UPS 활성에 영향을 줄 것으로 보이며, 베타 아단위 중에도 가장 핵심적인 촉매활성인 키모트립신-유사 프로테아제 (chymotrypsin-like protease) 활성을 가진 프로테아좀 아단위 베타 5 (PSMB 5) 유전자가 중요할 것으로 생각된다¹⁰⁾. 그러나 지금까지 프로테아좀 아단위 베타 5 (PSMB 5) 유전자에 대한 유전자 다형성 연구가 보고된 적이 없다.

본 연구에서는 PSMA 6 유전자의 rs1048990 (C/G) 유전자 다형성이 한국인에서 제2형 당뇨병에 미치는 영향을 알아보고자 하였으며, 그 뿐 아니라 염색체 14q11.2에 위치한 PSMB 5 유전자의 유전자 다형성과 제2형 당뇨병과의 연관성을 알아보고자 한다.

대상 및 방법

1. 연구 대상

본 연구는 2006년 1월부터 2007년 8월까지 경북대학교 병원과 계명대학교병원을 방문한 제2형 당뇨병환자 309명을 대상으로 하였고, 남자 152명, 여자 157명이었으며, 평균 연령은 59.5세였다. 제2형 당뇨병환자군은 혈액검사상 공복 혈당이 126 mg/dL 이상이거나 제2형 당뇨병의 병력이 있는 자로 정하였다. 대조군은 2006년 6월부터 11월까지 울진

군 주민들을 대상으로 실시한 건강검진 결과 나이 60세 이상, 당화혈색소가 5.8% 이하, 공복혈당이 100 mg/dL 이하, 당뇨병의 과거력이 없으며, 직계 가족 중 당뇨병의 가족력이 없는 170명을 선정하였다. 그 중에 남자 75명, 여자 95명이었으며, 평균연령은 64.2세였다. 대상자에게 시행된 모든 검사들은 임상시험 심사위원회(IRB)의 기준에 맞게 한 자들의 자발적인 동의 하에 이루어졌다.

2. 연구방법

1) 신체 계측 및 혈액검사

대상자는 검사 전날 밤부터 최소한 10시간 이상 금식한 공복 상태에서 가벼운 의복을 착용하고 신장과 체중 측정하였으며 바른 자세로 시선은 앞으로 향하게 한 후 신장과 체중을 동시에 잴 수 있는 자동신장체중계를 이용하여 측정하였다. 또한 허리둘레, 수축기와 이완기 혈압을 측정하였고, 두 번 이상 측정하여 평균값을 계산하였고, 체질량지수(body mass index, BMI = kg/m²)는 측정된 기본 신체 계측치로부터 산출하였다.

혈액 검사는 최소한 10시간 이상 금식한 공복 상태에서 시행되었으며, 공복혈장 포도당은 Modular Analytics SWA (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany)를 이용하여 측정하였고, 당화혈색소, 총 콜레스테롤, 고밀도지단백 콜레스테롤, 저밀도지단백 콜레스테롤, 중성지방은 Histachi Modular D2400 (Roche, Tokyo, Japan)를 이용하여 측정하였다. 공복혈장 포도당은 헥소카이네이즈법으로 측정하였고, 당화혈색소는 흡착 크로마토그래피 방법으로 측정하였다. 혈청에서 총 콜레스테롤과 중성지방, 고밀도지단백 콜레스테롤, 저밀도지단백 콜레스테롤을 측정하였다. 총 콜레스테롤은 enzymatic calorimetric assay로 측정하였고, 중성지방은 enzymatic assay without glycerol blank로 측정하였고, 고밀도지단백 콜레스테롤과 저밀도지단백 콜레스테롤은 enzymatic selective protection 방법으로 측정하였다.

2) Genomic DNA 분리

대상자의 상완정맥에서 채혈하였고 채혈된 혈액은 EDTA (ethylenediamine tetra acetic acid) 처리된 진공채혈관(vacutainer tube)에 넣어 냉장 보관하였다가 실험실로 운반하여 DNA를 분리하였다. DNA 분리는 Genomic DNA purification kit (Gentra)를 이용하였다. 혈액 2 mL에 6 mL의 RBC 용해용액을 넣은 후 5분간 잘 흔들어 준 다음 4℃에서 2,500 rpm의 속도로 5분간 원심분리하고 원심분리 후 상등액은 따라버리고 보텍스(vortex)로 세포 침전물을 잘 풀어준 후 2 mL의 세포용해 용액을 넣은 후 10초간 보텍스

로 잘 섞어준 후 실온에서 10분 이상 방치하였다. 0.7 mL의 단백질을 침전용액을 넣고 충분히 보텍스 시행 후 4℃에서 2,500 rpm으로 10분간 원심분리하여 상등액을 덜어내고 2 mL의 100% 이소프로필알코올 용액을 첨가하여 전화(inverting)하였다. 2,500 rpm으로 5분 동안 원심분리 한 후 상등액은 버리고, 70% 에탄올로 탈수시켰다. DNA hydration 용액 150 µL을 넣어 말린 후, 사용할 때까지 -70℃에서 보관하였다.

3) 중합효소 연쇄반응 (Real-time polymerase chain reaction, RT-PCR)을 이용한 유전자형 분석

건조시킨 DNA를 TE 완충용액 (10 mM Tris HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA)에 녹여, 농도를 분광 광도계로 측정 한 후 -70℃에 보관하였다. 중합효소 연쇄반응을 위한 primer 염기서열은 rs1048990 (C/G) 경우는 sense primer, 5'-GGGCCCAGGGATTGTGTT-3', antisense primer, 5'-AATGGTAATGTGG CGGTCAAA-3'였고, rs2230087 (G/A) 경우는 sense primer, 5'-TGCCTACTCAGGAGGTGCAG-3'와 antisense primer, 5'-CTTTCAGGGGGT AGAGCCAC-3'였다.

중합효소 연쇄반응 용액은 PCR tube에 추출한 유전자 DNA 400 ng, sense primer 10 pM, antisense primer 10 pM, dNTP 2.5 mM, 2 unit의 Taq polymerase, 중합효소 연쇄반응 완충용액 (10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 0.1% Triton X-100)을 넣어 총 반응액이 20 µL가 되도록 하였다. DNA 증폭을 위한 중합효소 연쇄반응은 rs1048990 (C/G)의 PCR 반응 조건은 변성전 (pre-denaturation) 단계에서는 95℃에서 3분, 변성 (denaturation)으로 95℃에서 30초, 결합 (annealing) 단계로 60℃에서 30초, 신장 (extension) 단계로 72℃에서 30초를 35회 반복하였고, rs2230087 (C/A)의 PCR 반응 조건은 95℃에서 3분, 변성으로 95℃에서 30초, 결합 단계로 56℃에서 30초, 72℃에서 30초를 35회 반복하고, 모두 마지막 신장을 72℃에서 10분간 유지하였다. 이후 반응이 끝난 용액을 1.0% 아가로스겔을 이용하여 100 V에서 30여 분 전기영동을 시행하여 유전자를 확인하였으며 Applied Biosystems 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems)을 이용하여 rs1048990 (C/G)과 rs2230087 (G/A)의 유전자 다형성을 판독하였다.

4) 통계학적 분석

제2형 당뇨병환자군과 대조군 사이의 대립형질의 빈도와 유전자형 (genotype) 빈도의 차이에 대한 통계분석은 SPSS version 12를 사용하였다. 변수는 평균 ± 표준편차로 나타내었고 각각의 유전자 다형성이 Hardy-Weinberg 평형을 따

르는지를 알아보기 위해 카이제곱 검정 (chi-square (χ^2) test) 을 이용하였다 ($P < 0.05$). 환자군과 대조군 간의 비연속변수들의 분석은 피어슨 카이제곱 검정 (Pearson's chi-square test) 또는 피셔의 정확성 검정 (Fisher's exact test)을 이용하였고, 연속변수의 분석은 스튜던트 t 검정 (Student t-test) 를 이용하였다. 로지스틱 회귀분석을 이용하여 우도비 (Odds Ratio, OR)와 신뢰구간 (95% Confidence Interval: CI)을 구하였고, 연령, 성별, 허리둘레 등의 교란변수들을 보정하였다. 통계적 유의수준은 $P < 0.05$ 로 하였다.

결 과

1. 대상 환자의 임상적 특징

제2형 당뇨병환자군과 대조군의 평균 연령은 각각 59.5

세 (26~81세), 64.2세 (60~70세)로 대조군이 환자군보다 통계적으로 의미있게 연령이 높았으며, 두 군 간 성별의 차이는 없었다.

환자군은 나이별로 20대 후반 2명 (0.6%), 30대 8명 (2.6%), 40대 37명 (12.0%), 50대 104명 (33.7%), 60대 110명 (35.6%), 70대 46명 (14.9%), 80대 초반 2명 (0.6%)였으며, 50~70대가 4분의 3 이상이었다.

흡연의 상태는 환자군에서 의미있게 현재 또는 과거의 흡연율이 높았고, 체질량지수와 엉덩이둘레는 유의한 차이가 없었으나, 허리둘레가 환자군에서 의미있게 컸다. 수축기 혈압과 총 콜레스테롤은 대조군에서 의미있게 높았으며, 고밀도지단백 콜레스테롤과 중성지방은 환자군에서 의미있게 높았고, 이완기 혈압과 저밀도지단백 콜레스테롤은 유의한 차이가 없었다 (Table 1).

Table 1. Clinical and metabolic characteristics of study subjects

	Control (n = 170)	DM (n = 309)	P value
Age (yers)	64.21 ± 2.75	59.52 ± 9.83	0.000
Sex : Male (%)	75 (44.1%)	152 (42.9%)	0.295
Smoking (current or previous, %)	42 (24.7%)	103 (33.9%)	0.038
BMI (kg/m ²)	23.80 ± 3.07	23.77 ± 3.67	0.937
Waist (cm)	82.55 ± 8.79	87.40 ± 9.49	0.000
Hip (cm)	93.02 ± 5.94	93.02 ± 7.70	0.993
Systolic BP (mmHg)	128.25 ± 16.77	124.25 ± 13.58	0.008
Diastolic BP (mmHg)	76.39 ± 9.36	75.13 ± 8.88	0.150
FBS (mmol/L)	4.83 ± 0.40	7.21 ± 3.21	0.000
HBA1c (%)	5.24 ± 0.33	8.93 ± 2.38	0.000
s-Cr (mg/dL)	0.94 ± 0.20	1.18 ± 3.07	0.183
LDL-C (mmol/L)	3.14 ± 0.70	3.07 ± 1.00	0.071
HDL-C (mmol/L)	1.24 ± 0.30	1.31 ± 0.48	0.039
TG (mmol/L)	2.85 ± 1.38	3.77 ± 2.46	0.000
T-chol (mmol/L)	4.94 ± 0.76	4.72 ± 1.14	0.011

Values are presented as mean ± SD. BP, blood pressure; BMI, body mass index; FBS, fasting blood glucose; HBA1c glycosylated hemoglobin A1c; HDL-C, high-density lipoprotein cholesterol; LDL-C, low-density lipoprotein cholesterol; s-Cr serum creatinine; T-chol, total cholesterol; TG, triglyceride; WHR waist-hip ratio.

Table 2. Genotype distribution of rs1048990 and rs2230087 polymorphisms in controls and diabetic patients

Genotype distribution	Control (n = 170)	DM (n = 309)	P value
PSMA6 rs1048990			
C/C	132 (77.6%)	166 (53.7%)	0.000
C/G	33 (19.4%)	112 (36.2%)	
G/G	5 (2.9%)	31 (10.0%)	
PSMB5 rs2230087			
G/G	166 (97.6%)	264 (85.4%)	0.000
A/G	4 (2.4%)	41 (13.3%)	
A/A	0 (0.0%)	4 (1.3%)	

Genotype distributions are shown as number (%). Comparisons were performed by Fisher's exact test.

2. PSMA6 유전자의 rs1048990 (C/G) 유전자 다형성과 제2형 당뇨병과의 관계

제2형 당뇨병환자군과 대조군에서 유전형의 분포는 Hardy-Weinberg equilibrium을 잘 만족하였다. 연구 대상자에서 rs1048990 (C/G)의 유전자형의 빈도는 CC는 298명

(62.2%), CG는 145명 (30.3%), GG는 36명 (7.5%)였고, 대조군과 제2형 당뇨병환자군 간에 유의한 차이가 있었다 ($P = 0.000$, Table 2). 환자군에서 대조군에 비해 CG + GG 유전자형의 빈도가 유의하게 높게 나왔으며 (46.3% vs 22.4%, $P = 0.000$), 우도비가 2.99 (95% CI: 1.96-4.58, $P = 0.000$)로 의미있게 높았다. G 대립형질의 빈도 또한 환자군에서

Table 3. Genotype distribution and allele frequency of rs1048990 and rs2230087 polymorphisms in controls and diabetic patients

	Control (n = 170)	DM (n = 309)	P value	Crude OR (95% CI)
PSMA6 rs1048990				
Genotype distribution				
C/C	132 (77.6%)	166 (53.7%)	0.000	1
C/G + G/G	38 (22.4%)	143 (46.3%)		2.99 (1.96~4.58)
Allele frequency				
C	0.87	0.72	0.000	1
G	0.13	0.28		2.71 (1.88~3.90)
PSMB5 rs2230087				
Genotype distribution			0.000	
G/G	166 (97.6%)	264 (85.4%)		1
A/G + A/A	4 (2.4%)	45 (14.6%)		7.07 (2.5~20.03)
Allele frequency			0.000	
G	0.99	0.92		1
A	0.01	0.08		7.23 (2.59~20.22)

Genotype distributions are shown as number (%). Comparisons were performed by Fisher's exact test. CI, confidence interval; OR, Odds ratio.

Table 4. Age- and sex- adjusted or multivariate-adjusted ORs and 95% CIs of rs1048990 (A) and rs2230087 (B) polymorphisms in controls and diabetic patients

(A)

	PSMA6 rs1048990 genotype		P value	PSMA6 rs1048990 allele		P
	CC	CG + GG		C	G	
Control (n)	132	38		297	43	
Diabetic patient (n)	166	143		444	175	
Age-and sex-adjusted OR (95% CI)	1 (referent)	2.81 (1.72~4.61)	0.000	1 (referent)	2.84 (1.88~4.30)	0.000
Multivariate-adjusted OR* (95% CI)	1 (referent)	5.09 (2.71~9.57)	0.000	2 (referent)	3.93 (2.35~6.59)	0.000

(B)

	PSMB5 rs2230087 genotype		P value	PSMB5 rs2230087 allele		P
	GG	GA + AA		G	A	
Control (n)	166	4		336	4	
Diabetic patient (n)	264	45		569	49	
Age-and sex-adjusted OR (95% CI)	1 (referent)	7.70 (2.55~23.20)	0.000	1 (referent)	7.10 (2.40~21.01)	0.000
Multivariate-adjusted OR* (95% CI)	1 (referent)	6.08 (1.66~22.29)	0.006	1 (referent)	5.70 (1.63~19.98)	0.007

* Odds ratio adjusted for age, fasting plasma glucose, HDL-cholesterol, smoking, systolic blood pressure, total cholesterol, triglyceride, waist circumference by logistic regression analysis. CI, confidence interval; OR, Odds ratio.

대조군에 비해 유의하게 높았으며 (28% vs 13%, $P = 0.000$), 우도비가 2.71 (95% CI: 1.88-3.90, $P = 0.000$)였다 (Table 3). 이들 CG + GG 유전자형과 G 대립형질은 나이, 흡연율 (현재 또는 과거 흡연율), 허리둘레, 공복혈당 포도당, 수축기 혈압, 고밀도지단백 콜레스테롤, 중성지방, 총 콜레스테롤을 보정한 후에도 대조군에 비해 환자군에서 우도비가 각각 5.09 (95% CI: 2.71-9.57, $P = 0.000$), 3.93 (95% CI: 2.35-6.59, $P = 0.000$)로 유의하게 높게 나왔다 (Table 4). 유전형을 우성모델 (dominant model), 부가모델 (additive model), 열성모델 (recessive model)의 가정하에 표현형과 연관시켜 로지스틱 회귀분석을 시행한 결과 우도비가 동일하지는 않았지만, 환자군에서 대조군에 비해 통계학적으로 유의하게 높았다 (Table 5).

3. PSMB5 유전자의 rs2230087 (G/A) 유전자 다형성과 제2형 당뇨병과의 관계

제2형 당뇨병환자군과 대조군에서 유전형의 분포는 Hardy-Weinberg equilibrium을 잘 만족하였다. 연구 대상자에서 rs2230087 (G/A)의 유전자형의 빈도는 GG는 430명 (89.8%), GA는 45명 (9.4%), AA는 4명 (0.8%)였고, 대조군과 제2형 당뇨병환자군 간에 유의한 차이가 있었다 ($P = 0.000$, Table 2). 환자군에서 대조군에 비해 GA + AA 유전자형의 빈도가 유의하게 높게 나왔으며 (14.6% vs 2.4%, $P = 0.000$), 우도비가 7.07 (95% CI: 2.50-20.03, $P = 0.000$)로 의미있게 높았다. A 대립형질의 빈도 또한 환자군

에서 대조군에 비해 유의하게 높았으며 (8% vs 1%, $P = 0.000$), 우도비가 7.23 (95% CI: 2.59-20.22, $P = 0.000$)였다 (Table 3). 이들 GA + AA 유전자형과 A 대립형질은 나이, 흡연율 (현재 또는 과거 흡연율), 허리둘레, 공복혈당 포도당, 수축기 혈압, 고밀도지단백 콜레스테롤, 중성지방, 총 콜레스테롤을 보정한 후에도 대조군에 비해 환자군에서 우도비가 각각 6.08 (95% CI: 1.66-22.29, $P = 0.006$), 5.70 (95% CI: 1.63-19.98, $P = 0.007$)로 유의하게 높게 나왔다 (Table 4). 유전형을 우성모델, 부가모델, 열성모델의 가정하에 표현형과 연관시켜 로지스틱 회귀분석을 시행한 결과 우도비가 동일하지는 않았지만, 환자군에서 대조군에 비해 통계학적으로 유의하게 높았다 (Table 5).

4. rs1048990 (C/G)와 rs2230087 (G/A) 유전자 다형성의 유전형에 따른 임상적 특징

두 유전자 다형성에서 우성모델의 유전형에 따라 임상적 특징을 알아본 결과, CG + GG 유전형과 GA + AA 유전형이 GG 유전형과 AA 유전형에 비해 남성의 비율이 높았고 또한 당화혈색소와 제2형 당뇨병 이환율이 높았다 ($P < 0.05$). 그러나 로지스틱 회귀분석을 시행 후에는 당화혈색소와 제2형 당뇨병환자만이 유의하게 높게 나왔으며 ($P < 0.05$), 그 외 다른 변수들의 유의한 차이는 없었다 (Table 6).

5. 종속변수들의 로지스틱 회귀분석

제2형 당뇨병의 발병률을 예측하기 위해 여러 종속변수

Table 5. Associations between rs1048990 and rs2230087 polymorphisms and the risk of type 2 diabetes

Loci	Model	Genotype	Control (n = 170)	DM (n = 309)	OR (95% CI)	P value
PSMA6 rs1048990	Dominant	C/C	132 (77.6%)	166 (53.7%)	1.0	0.000
		C/G + G/G	38 (22.4%)	143 (46.3%)	2.99 (1.96~4.58)	
	Additive	C/C	132 (77.6%)	166 (53.7%)	1.0	0.000
		C/G	33 (19.4%)	112 (36.2%)	2.70 (1.72~4.24)	
		G/G	5 (2.9%)	31 (10.0%)	4.93 (1.78~13.03)	
		C/C + C/G	165 (97.1%)	278 (90.0%)	1.0	0.008
PSMB5 rs2230087	Dominant	G/G	5 (2.9%)	31 (10.0%)	3.68 (1.40~9.65)	
		G/G	166 (97.6%)	264 (85.4)	1	0.000
	Additive	G/A + A/A	4 (2.4%)	45 (14.6%)	7.07 (2.50~20.03)	
		G/G	166 (97.6%)	264 (85.4%)	1.0	0.000
		G/A	4 (2.4%)	41 (13.3%)	6.45 (2.27~18.32)	
		A/A	0 (0.0%)	4 (1.3%)	N/A*	
	Recessive	G/G + G/A	170 (100%)	0 (0%)	1	N/A*
		A/A	0 (0%)	4 (100%)	N/A*	

Genotype distributions are shown as number (%). Odds ratio (OR), 95% CI and P values were from logistic regression analyses with the dominant, Additive and recessive models. * N/A, Not applicable.

들을 로지스틱 회귀분석을 시행하였다. 연령, 이상지질혈증, 고혈압, 허리둘레는 제2형 당뇨병의 중요한 예측인자였으며, rs1048990의 G 대립형질과 rs2230087의 A 대립형질 또한 예측인자로서 통계학적으로 의미가 있었다 ($P = 0.000$ and $P = 0.002$, Table 7).

6. rs1048990 (C/G)와 rs2230087 (G/A) 유전자 다형성의 상호작용과 제2형 당뇨병의 위험성

rs1048990의 C, G 대립형질과 rs2230087의 G, A 대립형질의 상호분포가 제2형 당뇨병환자군과 대조군 사이에 의미있는 차이를 보였다 ($P = 0.000$). rs1048990의 G 대립형질과 rs2230087의 A 대립형질을 가진 조합의 경우 대조군에 비해 환자군에서 그 빈도가 의미있게 증가되어 있었고, 우도비가 변수들을 보정 후에도 G_G 대립형질 조합의 경우

3.44 (95% CI: 2.03-5.84), C_A 대립형질 조합의 경우 2.43 (95% CI: 0.57-10.32)로 증가되어 있었다. 특히 G_A 대립형질 조합인 경우에는 당뇨병환자군에만 32명 (5.2%)이 발견되었다 (Table 8).

고 찰

본 연구는 PSMA6 유전자와 PSMB5 유전자의 유전자 다형성이 당뇨병 발생에 미치는 영향을 알아보았다. PSMA6 유전자의 rs1048990 (C/G) 유전자 다형성에서 당뇨병환자군의 G 대립형질을 포함한 유전자형 (CG + GG)과 G 대립형질의 빈도가 대조군에 비해 유의하게 높았다. G 대립형질을 포함한 유전자형과 G 대립형질의 우도비는 대조군에 비해 환자군에서 의미있게 높았고, 이는 임상적 특성 중에서

Table 6. Clinical and metabolic characteristics according to genotypes

Variables	PSMA6 rs1048990		PSMB5 rs2230087	
	C/C (n = 298)	CG + GG (n = 181)	GG (n = 430)	GA + AA (n = 49)
Age (years)	61.28 ± 7.685	61.03 ± 9.41	61.30 ± 7.81	60.14 ± 12.26
Sex : Male (%) [*]	128 (43%)	99 (54.7%)	197 (45.8%)	30 (61.2%)
Smoking (%) [‡]	81 (27.4)	64 (36%)	125 (29.3)	20 (41.7%)
BMI (kg/m ²)	23.81 ± 3.36	23.73 ± 3.63	23.74 ± 3.45	24.16 ± 3.58
WHR	0.92 ± 0.07	0.93 ± 0.07	0.92 ± 0.07	0.93 ± 0.05
Waist (cm)	85.35 ± 9.06	86.18 ± 10.25	82.45 ± 9.51	87.54 ± 9.53
Hip (cm)	93.03 ± 7.04	93.01 ± 7.26	92.90 ± 7.04	94.11 ± 7.74
Systolic BP (mmHg)	125.94 ± 15.88	125.26 ± 13.17	125.82 ± 14.91	124.45 ± 15.00
Diastolic BP (mmHg)	75.43 ± 8.89	75.82 ± 9.36	75.60 ± 9.12	75.41 ± 8.67
FBS (mmol/L)	6.19 ± 2.84	6.59 ± 2.74	6.27 ± 2.80	6.91 ± 2.85
HBA1c (%) [†]	7.35 ± 2.65	8.10 ± 2.52	7.51 ± 2.62	8.63 ± 2.44
s-Cr (mg/dL)	0.95 ± 0.59	1.32 ± 3.93	1.10 ± 2.59	1.02 ± 0.60
LDL-C (mmol/L)	3.06 ± 0.85	3.14 ± 0.98	3.09 ± 0.91	3.12 ± 0.85
HDL-C (mmol/L)	1.29 ± 0.41	1.28 ± 0.44	1.27 ± 0.41	1.39 ± 0.50
TG (mmol/L)	3.31 ± 1.85	3.66 ± 2.62	3.42 ± 2.06	3.63 ± 3.03
T-chol (mmol/L)	4.77 ± 0.97	4.86 ± 1.12	4.80 ± 1.04	4.82 ± 0.93
Diabetes [†]	166 (55.7%)	143 (79.0%)	264 (61.4%)	45 (91.8%)

Values are presented as mean ± SD. * $P < 0.05$. † $P < 0.05$, Significant even after adjustment for sex by binary logistic regression analysis. ‡ Smoking: current or previous history of smoking. Other abbreviations see in Table 1.

Table 7. Multiple logistic regression analysis with T2DM as the dependent variables

Variable	OR (95% CI)	P value
Age	0.90 (0.88-0.93)	0.000
Smoking	1.14 (0.81-1.60)	0.467
Dyslipidemia	1.65 (1.21-2.25)	0.002
Hypertension	2.04 (1.47-2.83)	0.000
Waist circumference	1.06 (1.04-1.08)	0.000
PSMA6 rs1048990 (G allele)	2.83 (1.88-4.26)	0.000
PSMB5 rs2230085 (A allele)	5.91 (1.96-17.84)	0.002

CI, confidence interval; OR, Odds ratio.

Table 8. The distribution of the genotype combination of the rs1048990 and rs2230087 and the risk of type 2 DM

rs1048990_rs2230087 C/G_G/A	Control n (%)	DM n (%)	Crude OR (95% CI)	Adjusted OR* (95% CI)
C_G	294 (86.2%)	426 (68.9%)	1 (referent)	1 (referent)
G_G	43 (12.6%)	142 (23.0%)	2.27 (1.57~3.30)	3.44 (2.03~5.84)
C_A	4 (1.2%)	18 (2.9%)	3.10 (1.04~9.24)	2.43 (0.57~10.32)
G_A	0 (0%)	32 (5.2%)	NA [†]	NA [†]
<i>P</i> value		0.000		

* Odds ratio adjusted for age, fasting plasma glucose, HDL-cholesterol, smoking, systolic blood pressure, total cholesterol, triglyceride, waist circumference by logistic regression analysis. † N/A: Not applicable. CI, confidence interval; OR, Odds ratio.

유의한 차이가 있던 변수들을 보정한 후에도 지속적으로 의미있게 높게 나타났다(Table 4). 또한 PSMB5 유전자의 rs2230087 (G/A) 유전자 다형성에서도 당뇨병환자군의 A 대립형질을 포함한 유전자형 (GA + AA)과 A 대립형질의 빈도와 우도비가 대조군에 비해 유의하게 높았으며, 변수들을 보정한 후에도 지속적으로 의미있게 높게 나타났다(Table 4). 두 유전자 다형성에 대한 이러한 결과들은 유전 모형별 유전형 빈도 검사에서도 유의한 의미를 가졌다(Table 5). 또한 rs1048990 (C/G) 유전자 다형성의 G 대립형질과 rs2230087 (G/A) 유전자 다형성의 A 대립형질이 다중 로지스틱 회귀분석을 시행하였을 때 고혈압, 이상지질혈증, 허리둘레 보다 의미있게 나왔는데(Table 7), 이 두 유전자 다형성 부위는 약한 연관 불균형에 관계에 있었다($r^2 = 0.028$).

최근 일본에서 PSMA6 유전자의 rs1048990 (C/G) 유전자 다형성에 관한 연구를 발표하였다. 심근경색증환자들을 대상으로 시행한 연구로 G 대립형질의 빈도가 심근경색증환자에서 유의하게 높았으며, 이는 G 대립형질의 변이가 NF- κ B의 활성화에 영향을 미쳐 심근경색증의 발생위험이 증가됨을 보여주었다⁴⁾. 또한 라트비아인과 핀란드인을 대상으로 PSMA6 유전자와 제2형 당뇨병과의 관계를 알아본 연구가 발표되었으며, 당뇨병환자군에서 G 대립형질의 변이 빈도가 증가되어 있었다¹¹⁾. 본 연구에서는 한국인 제2형 당뇨병환자들을 대상으로 rs1048990 (C/G)의 유전자 다형성이 미치는 영향을 알아보았으며, 위의 연구결과와 동일하게 G 대립형질의 변이가 제2형 당뇨병환자군에서 의미있게 증가되어 있었다.

20S 아단위 중에 베타 아단위는 3가지의 단백분해효소인 키모트립신-유사 프로테아제 (chymotrypsin-like protease),

트립신-유사 프로테아제 (trypsin-like protease), 포스트-글루타밀 프로테아제 (post-glutamyl protease)의 활성을 가진다. 이 단백분해효소 중 키모트립신-유사 프로테아제는 단백분해속도 조절효소로서, 이를 억제하면 프로테아좀의 거의 모든 활성을 억제할 수 있다¹⁰⁾. 키모트립신-유사 프로테아제는 베타 아단위 중에 PSMB5가 가진 활성이며, PSMB5에 가역적으로 결합하여 키모트립신-유사 프로테아제의 활성을 억제하는 Bortezomib이 NF- κ B에 결합해 있는 I- κ B의 분해를 억제하여 NF- κ B의 활성을 감소시킨다는 연구가 있다^{12,13)}. 그러므로 키모트립신-유사 프로테아제의 활성을 가진 PSMB5 유전자의 유전자 다형성이 제2형 당뇨병 발생에 영향을 미칠 것으로 생각되나 아직 이에 대한 연구가 발표된 적이 없었다.

본 연구에서는 PSMB5 유전자의 유전자 다형성과 제2형 당뇨병의 연관성을 알아보기 위해 National Center for Biotechnology Information (NCBI, www.ncbi.nlm.nih.gov/)에 정보를 얻었으며, 소 대립형질 (minor allele)이 10% 이상인 유전자 다형성들을 순차적으로 연구하던 중 3'-비해독 부위 (3'-URT)인 엑손 3에 위치한 rs2230087 (G/A)의 유전자 다형성이 제2형 당뇨병과 연관이 있음을 알게 되었다. 연구결과 rs1048990 (C/G)의 유전자 다형성 결과처럼 rs2230087 유전자 다형성에서 A 대립형질이 제2형 당뇨병 발생의 위험증가와 관련이 있었다. 특히 Table 8에서 보면 두 유전자 다형성의 조합에서 G_A 대립형질의 조합은 당뇨병환자군에만 발견이 되어 이들 유전자 다형성이 당뇨병 발생에 중요한 영향을 미칠 것으로 생각된다.

rs1048990의 G 대립형질과 rs2230087의 A 대립형질이 제2형 당뇨병 발생에 영향을 미치는 기전으로 이전에 보고되었던 NF- κ B 활성이 관여할 것으로 생각된다. NF- κ B는

많은 세포에서 존재하며, 고혈당과 사이토카인 및 활성산소 등에 의해 활성화되는 전사인자로서 염증과 면역과정에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다¹⁴⁻¹⁶. 또한 NF- κ B는 사이토카인, 화학동성(chemokines), 유착분자(adhesion molecules), 집락형성촉진인자(colony stimulating factors), 염증성 효소 및 세포사멸과 관련된 인자들을 조절함으로써 제1형 및 제2형 당뇨병과 관련이 있을 것으로 알려져 있다¹⁴⁻¹⁷. 이러한 NF- κ B는 주로 세포질 내에서 억제자인 I- κ B와 복합체를 형성하여 비활성 상태로 존재하는데, 여러 가지 세포외부 자극들에 노출되면 I- κ B가 인산화되어 26S 프로테아좀에 의해 유비퀴틴 의존적 분해가 일어나게 되고, 그 결과 NF- κ B가 활성화되어 핵 내로 이동하여 유전자 발현에 관여한다^{5,17}. Ozaki K. 등⁴의 연구에서 siRNA (short interfering RNA)를 이용하여 PSMA6 유전자 발현을 억제하였을 때 세포질 내 안정화된 I- κ B가 증가하여 NF- κ B의 활성이 감소됨을 보여 주었다. 실제로 제2형 당뇨병환자의 근육세포에서 I- κ B가 감소되면서 NF- κ B의 활성이 과도하게 증가되어 있음이 보고되었고¹⁸, 이를 통해 26S 프로테아좀이 I- κ B 분해를 조절함으로써 당뇨병 발생에 중요한 영향을 미칠 것으로 생각된다.

26S 프로테아좀이 당뇨병에 영향 미치는 또 하나의 기전으로 IRS 단백질이 있다. IRS는 인슐린수용체의 활성을 조절하는 단백질로서 IRS-1과 IRS-2가 특히 중요하다^{7,8}. 사람과 동물실험에서 IRS-1과 IRS-2의 감소가 인슐린저항성과 관련 있음이 밝혀지고 있으며, 쥐 실험에서 IRS-1 또는 IRS-2의 유전적 제거로 인슐린 작용이 손상됨이 밝혀 졌다. 이를 통해 IRS 단백질이 인슐린 대사과정에 중요한 역할을 가짐을 알 수 있다¹⁹⁻²³. IRS는 인슐린수용체나 인슐린 유사 성장인자-1 (Insulin-like growth factor-1) 수용체의 티로신 키나제(tyrosine kinases)를 통해 인산화되어 포스파티딜이노시톨 3-키나제(phosphatidylinositol 3-kinase) 활성화 시킴으로써 혈당의 항상성 유지에 관여한다. 그러나 IRS에 사이토카인신호억제 단백질(suppressor of cytokine signaling, SOCS)가 결합하여 유비퀴틴화 되면 IRS가 26S 프로테아좀에 의해 분해되어 인슐린저항성에 관여함이 밝혀지고 있다⁹. 그러므로 rs1048990와 rs2230087의 유전자 다형성이 26S 프로테아좀의 활성을 조절하여 제2형 당뇨병 발생의 위험을 증가시킬 것으로 생각된다.

이상을 요약하면 309명의 당뇨병환자와 170명의 대조군을 대상으로 기존에 알려진 PSMA6 유전자의 rs1048990 (C/G) 유전자 다형성이 한국인에서 당뇨병 발생에 미치는 영향과 PSMB5 유전자 중 새로운 rs2230087 (G/A) 유전자

다형성이 제2형 당뇨병 발생에 미치는 영향을 알아보기 위해 각각의 유전자들을 분석하였다. 그 결과 제2형 당뇨병에서 rs1048990 (C/G)와 rs2230087 (G/A)의 유전자 다형성이 중요한 유전적 위험소인이 될 수 있음을 알 수 있었으며, 특히 본 연구에서 rs1048990의 G 대립형질과 rs2230087의 A 대립형질 둘 다를 가진 경우 모두 당뇨병환자군으로 분류되어 이들 유전자 다형성의 조합이 당뇨병 선별을 위한 유전적 지표로서 더 중요한 의미를 가질 것으로 생각된다. 그러나 본 연구는 연구 대상자의 약물투약 상태나 대혈관 합병증의 동반 유무 등을 고려하지 않은 소규모의 연구로써, 이를 검증하기 위해서는 향후 대규모의 한국인을 대상으로 한 추가적인 연구 및 이들 유전자 다형성이 유전자 발현에 미치는 영향을 알아보기 위한 기능연구가 동반되어야 할 것이다.

요 약

연구배경: 26S 유비퀴틴-프로테아좀 시스템 (ubiquitin-proteasome system, UPS)은 세포사멸, 세포주기, 세포증식 및 분화와 염증에 관련하는 세포 내 분자들의 주요 단백질 분해 경로이다. 최근 PSMA6 유전자의 rs1048990 (C/G) 유전자 다형성이 I- κ B 단백질 분해에 영향을 미쳐 심근경색증의 발생위험 증가와 관련있음이 보고되었다. 그러므로 26S UPS가 기질 단백질로써 I- κ B와 insulin receptor substances의 분해를 조절함으로써 인슐린 저항성과 제2형 당뇨병의 발생에 중요할 것이라 가정하였다. 본 연구에서는 PSMA6 유전자의 rs1048990 (C/G) 유전자 다형성 뿐 만 아니라 단백질 분해속도 조절효소인 키모트립신-유사 프로테아제(chymotrypsin-like protease)의 활성을 지닌 PSMB5 유전자의 rs2230087 (G/A) 유전자 다형성이 제2형 당뇨병의 유전적 소인에 미치는 영향을 알아보려고 하였다.

방법: 환자군은 제2형 당뇨병환자 309명과 대조군은 당뇨병이 없는 올진군 주민 170명을 선정하였다. 유전자 다형성 검사는 real-time PCR을 이용하였다.

결과: rs1048990 (C/G) 유전자 다형성의 G 대립형질과 rs2230087 (G/A) 유전자 다형성의 A 대립형질의 빈도는 당뇨병환자군에서 (28% and 13%) 대조군에 (13% and 1% $P = 0.000$ and $P = 0.000$, respectively) 비해 의미있게 높았다. 로지스틱 회귀분석 결과 rs1048990 (C/G) 유전자 다형성에서 G 대립형질의 변수들(나이, 흡연, 허리둘레, 공복혈당, 수축기혈압, 고밀도지단백 콜레스테롤, 중성지방, 총콜레스테롤)을 보정한 우도비는 3.93 (95% CI, 2.35-6.59 $P = 0.000$)였고, CC 유전자형에 대한 CG와 GG 유전자형의 보정 우도

비는 5.09 (95% CI, 2.71-9.57; $P = 0.000$)였다. 유전자 다형성에서는 A 대립형질에 대한 보정 우도비가 5.70 (95% CI, 1.63-19.98; $P = 0.007$)였고, GG 유전자형에 대한 GA와 AA 유전자형의 우도비가 6.08 (95% CI, 1.66-22.29; $P = 0.006$)였다. 다중회귀분석에서 rs1048990 (C/G)과 rs2230087 (G/A) 유전자 다형성은 제2형 당뇨병의 독립적인 영향인자였다.

결론: 본 연구는 PSMA6 유전자의 rs1048990 (C/G) 유전자 다형성과 PSMB5 유전자의 rs2230087 (G/A) 유전자 다형성이 한국인에서 제2형 당뇨병 발생에 영향을 미치는 유전적 위험요인일 수 있음을 보였다.

참 고 문 헌

- Pickart CM: *Back to the future with ubiquitin*. *Cell* 116:181-90, 2004
- Jiang Y, Beaudet AL: *Human disorders of ubiquitination and proteasomal degradation*. *Curr Opin Pediatr* 16:419-26, 2004
- Hershko A, Ciechnover A: *The Ubiquitin System*. *Annu Rev Biochem* 67:425-79, 1998
- Ozaki K, Sato H, Iida A, Mizuno H, Nakamura T, Miyamoto Y, Takahashi A, Tsunoda T, Ikegawa S, Kamatani N, Hori M, Nakamura Y, Tanaka T: *A functional SNP in PSMA6 confers risk of myocardial infarction in the Japanese population*. *Nat Genet* 38:921-5, 2006
- Yamamoto Y, Gaynor RB: *IkappaB kinases: key regulators of the NFkappaB pathway*. *Trends Biochem Sci* 29:72-9, 2004
- Yuan M, Konstantopoulos N, Lee J, Hansen L, Li ZW, Karin M, Shoelson SE: *Reversal of obesity- and diet-induced insulin resistance with salicylates or targeted disruption of Ikkbeta*. *Science* 293:1673-7, 2001
- White MF: *The insulin signalling system and the IRS proteins*. *Diabetologia* 40(Suppl. 2):S2-17, 1997
- White MF: *The IRS-signaling system: a network of docking proteins that mediate insulin and cytokine action*. *Recent Prog Hormone Res* 53:119-38, 1998
- Rome S, Meugnier E, Vidal H: *The ubiquitin-proteasome pathway is a new partner for the control of insulin signaling*. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 7:249-54, 2004
- Kisselev AF, Akopian TN, Castillo V, Goldberg AL: *Proteasome active sites allosterically regulate each other, suggesting a cyclical bite-chew mechanism for protein breakdown*. *Mol Cell* 4:395-402, 1999
- Sjakste T, Kalis M, Poudziunas I, Pirags V, Lazdins M, Groop L, Sjakste N: *Association of microsatellite polymorphisms of the human 14q13.2 region with type 2 diabetes mellitus in Latvian and Finnish populations*. *Ann Hum Genet* 71:772-6, 2007
- Lightcap ES, McCormack TA, Pien CS, Chau V, Adams J, Elliott PJ: *Proteasome inhibition measurements: clinical application*. *Clin Chem* 46:673-83, 2000
- Hideshima T, Mitsiades C, Akiyama M, Hayashi T, Chauhan D, Richardson P, Schlossman R, Podar K, Munshi NC, Mitsiades N, Anderson KC: *Molecular mechanisms mediating antimyeloma activity of proteasome inhibitor PS-341*. *Blood* 101:1530-4, 2003
- Ha H, Yu MR, Choi YJ, Kitamura M, Lee HB: *Role of high glucose-induced nuclear factor-B activation in monocyte chemoattractant protein-1 expression by mesangial cells*. *J Am Soc Nephrol* 13:894-902, 2002
- Bierhaus A, Schiefoer S, Schwaninger M, Andrassy M, Humpert PM, Chen J, Hong M, Luther T, Henle T, Kloting I, Morcos M, Hofmann M, Tritschler H, Weigle B, Kasper M, Smith M, Perry G, Schmidt AM, Stern DM, Haring HU, Schleicher E, Nawroth PP: *Diabetes-associated sustained activation of the transcription factor nuclear factor-B*. *Diabetes* 50:2792-808, 2001
- Emilo Ho, Tammy MT: *Antioxidants, NF-kB activation and, diabetogenesis*. *Proc Soc Exp Biol Med* 222:205-13, 1999
- Karin M, Delhase M: *The I kappa B kinase (IKK) and NF-kappa B: key elements of proinflammatory signalling*. *Semin Immunol* 12:85-98, 2000
- Sriwijitkamol A, Christ-Roberts C, Berria R, Eagan P, Pratipanawatr T, DeFronzo RA, Mandarino LJ, Musi N: *Reduced skeletal muscle inhibitor of kappaB beta content is associated with insulin resistance in subjects with type 2 diabetes: reversal by exercise training*. *Diabetes* 55:760-7, 2006

19. Araki E, Lipes MA, Patti ME, Brning JC, Haag B 3rd, Johnson RS, Kahn CR: *Alternative pathway of insulin signalling in mice with targeted disruption of the IRS-1 gene. Nature 372:186-90, 1994*
20. Brüning JC, Winnay J, Bonner-Weir S, Taylor SI, Accili D, Kahn CR: *Development of a novel polygenic model of NIDDM in mice heterozygous for IR and IRS-1 null alleles. Cell 88:561-72, 1997*
21. Tamemoto H, Kadowaki T, Tobe K, Yagi T, Sakura H, Hayakawa T, Terauchi Y, Ueki K, Kaburagi Y, Satoh S, Sekihara H, Yoshioka S, Horikoshi H, Furuta Y, IkawaY, Kasuga M, Yazaki Y, Aizawa S: *Insulin resistance and growth retardation in mice lacking insulin receptor substrate-1. Nature 372:182-6, 1994*
22. Withers DJ, Burks DJ, Towery HH, Altamuro SL, Flint CL, White MF: *Irs-2 coordinates Igf-1 receptor-mediated beta-cell development and peripheral insulin signalling. Nat Genet 23:32-40, 1999*
23. Withers DJ, Gutierrez JS, Towery H, Burks DJ, Ren JM, Previs S, Zhang Y, Bernal D, Pons S, Shulman GI, Bonner-Weir S, White MF: *Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice. Nature 391:900-4, 1998*