

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

TAMARA ŠUTUŠ TEMOVSKI

**VLOGA GENETSKIH VARIANT
PROMOTORSKE REGIJE GENA *DEPTOR* PRI
RAZVOJU DEBELOSTI IN INZULINSKE
REZISTENCE**

MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM
LABORATORIJSKA BIOMEDICINA

Ljubljana, 2014

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

TAMARA ŠUTUŠ TEMOVSKI

**VLOGA GENETSKIH VARIANT PROMOTORSKE
REGIJE GENA *DEPTOR* PRI RAZVOJU DEBELOSTI
IN INZULINSKE REZISTENCE**

**THE ROLE OF GENETIC VARIANTS IN PROMOTER
REGION OF *DEPTOR* GENE IN OBESITY AND
INSULIN RESISTANCE DEVELOPMENT**

MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM LABORATORIJSKA
BIOMEDICINA

Ljubljana, 2014

Magistrsko nalogo sem opravljala na Pediatrični kliniki, Službi za specialno laboratorijsko diagnostiko, UKC Ljubljana, pod mentorstvom prof. dr. Darka Černeta, pod somentorstvom doc. dr. Katarine Trebušak Podkrajšek in s pomočjo delovnega mentorja dr. Jerneja Kovača.

Izjava o avtorstvu

Podpisana Tamara Štutuš Temovski izjavljam, da sem avtorica te magistrske naloge, izdelane pod mentorstvom prof. dr. Darka Černeta, somentorstvom doc.dr. Katarine Trebušak Podkrajšek in s pomočjo delovnega mentorja dr. Jerneja Kovača.

ZAHVALA

Prof. dr. Darko Černe, izrekam Vam zahvalo za vso pomoč in vodstvo pri izdelavi magistrske naloge.

Doc. dr. Katarina Trebušak Podkrajšek, iskreno hvala za Vaš optimizem, nesebično spodbudo in dragoceno pomoč, brez katerih bi težko prišla do cilja.

Dr. Jernej Kovač, hvala za vse nasvete, spodbude in prijetne pogovore. Hvala, da ste mi dali vedeti, da še vedno obstajajo ljudje, ki iskreno dajejo svoje srce znanosti.

Iskrena zahvala tudi predsedniku komisije **prof. dr. Janku Kosu** in članu komisije **as. dr. Juriju Trontlju**, za nasvete in podporo.

Doc. dr. Primož Kotnik, iskrena hvala za vso pomoč, spodbudo in strokovno podporo.

Gašper Klančar, hvala za potrpežljivost in za to, da sem se vedno lahko zanesla na tvojo pomoč.

Hvala tudi **vsem iz Službe za specialno laboratorijsko diagnostiko** na Pediatrični kliniki, UKC Ljubljana, za to, da sem se pri delu z vami počutila domače in prijetno.

Mama, oči, Erik... Moja zahvala je premalo, da lahko izrazim svojo hvaležnost, za vse kar ste storili zame. Hvala, da ste mi omogočili študij in mi z vso ljubeznijo in potrpljenjem stali ob strani v vseh lepih in malo manj lepih trenutkih. Hvala, da ste me naučili ceniti prave stvari v življenju...

Ivan, hvala da me ceniš, spoštuješ in ljubiš brezpogojno. Spodbujaš me k napredkom in verjameš vame, tudi ko sama ne. Ko me držiš za roko, vem, da ne obstaja ovira, ki jo skupaj ne bi uspela preskočiti.

Iskrena hvala tudi **vsem prijateljem**, za podporo in vero, da mi bo uspelo.

Anja Švigelj, hvala za nesebično pomoč.

Magistrsko nalogo posvečam svoji babici...

KAZALO

Izjava o avtorstvu	1
Zahvala	2
Kazalo	3
Povzetek	5
Seznam slik	7
Seznam tabel	8
Seznam kratic in okrajšav	9
Uvod	13
Debelost	13
Inzulinska rezistenca in inzulinsko signaliziranje	14
Tarča rapamicina pri sesalcih (mTOR)	15
Vpliv signalne poti mTOR pri patogenezi raka, staranju in metabolizmu	17
Prekomerna aktivacija signalne poti mTOR vodi do nastanka inzulinske rezistence in sladkorne bolezni tipa 2	19
Domeno DEP vsebujoči protein, ki deluje na mTOR (DEPTOR), inhibitor signalne poti mTOR	20
Namen dela in hipoteza	22
Preiskovanci in metode	23
Preiskovanci	23
Metode	23

Osamitev genomske DNA	23
Začetni oligonukleotidi	25
Analiza talilne krivulje DNA v visoki ločljivosti	26
Določanje nukleotidnega zaporedja DNA	28
Analiza genetskih variant	30
Izračun indeksov inzulinske občutljivosti	30
Statistična analiza	31
Rezultati	35
Varianta rs75781905	35
Varianta rs117543860	36
Varianta rs140142743	37
Varianta rs7840156	37
Razprava	41
Zaključek	45
Literatura	46

POVZETEK

Spremembe v signalni poti mTOR, tarče rapamicina pri sesalcih, povečujejo tveganje za razvoj debelosti, inzulinske rezistence in sladkorne bolezni tipa 2. Domeno DEP-vsebujoči protein, ki deluje na mTOR (DEPTOR), uravnava signaliziranje mTOR tako, da se veže na kompleks mTOR in zavira njegovo aktivnost, hkrati pa zmanjšuje tudi njegovo stabilnost. V kodirajoči ali promotorski regiji gena *DEPTOR* še ni bila opisana genetska sprememba, ki bi jo povezovali s predstopnjo sladkorne bolezni in/ali debelosti pri bolnikih.

Cilj te magistrske naloge je bil določiti genetske variante v promotorski regiji gena *DEPTOR*, ki so povezane z razvojem inzulinske rezistence in/ali debelosti.

V analizo je bilo vključenih 191 debelih otrok in mladostnikov (91 dečkov/100 deklic s povprečno starostjo $13,3 \pm 3,3$ let in s povprečnim številom standardnih odklonov indeksa telesne mase $2,82 \pm 0,66$). Pri vseh je bil opravljen standardni obremenitveni glukozni tolerančni test (OGTT). Inzulinska rezistenca je bila opredeljena po kriterijih HOMA-IR in WBISI po Madsudi. Genotipizacija promotorske regije gena *DEPTOR* je bila izvedena z analizo talilne krivulje DNA pri visoki ločljivosti (HRM) in sekvenciranjem po Sangerju. Za opredelitev statističnih parametrov posameznih genotipov smo uporabili test hi-kvadrat.

V promotorski regiji gena *DEPTOR* so bile prisotne štiri različice posameznih nukleotidov (SNP): rs7840156, rs75781905, rs117543860 in rs140142743. Varianta rs7840156 (g.120885944T> C) je bila povezana z nižanim tveganjem za inzulinsko rezistenco, določeno s kriteriji HOMA-IR in WBISI. Nosilci alela C so imeli OR 0,63 (95% IZ = 0,41-0,87, p = 0,038) v skladu s HOMA-IR in 0,58 (95% IZ = 0,38-0,90, p = 0,018) po WBISI. Ostale prisotne variante niso bile povezane s tveganjem za razvoj inzulinske rezistence v preučevani populaciji. Prav tako ni bilo statistično značilne povezave prepoznanih variant z razvojem debelosti. Varianta rs7840156 (g.120885944T> C) gena *DEPTOR* je v preiskovani populaciji bolnikov povezana z inzulinsko rezistenco. To nakazuje, da je gen *DEPTOR* morda vpleten v zgodnjo fazo razvoja sladkorne bolezni tipa 2 pri otrocih in mladostnikih, verjetno z inhibicijo znotrajceličnega signaliziranja preko inzulinskega receptorja in s tem občutljivostjo na inzulin.

Ključne besede: mTOR, *DEPTOR*, inzulinska rezistenca, debelost

ABSTRACT

Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) signaling deregulation leads to obesity, increased risk of IR (insulin resistance) and type 2 diabetes. DEP domain containing mTOR interacting protein (DEPTOR) regulates mTOR signaling by binding to mTOR complex, inhibiting its activity and compromising its stability. To date no mutation in the coding or promoter region of *DEPTOR* was associated with pre-diabetes and/or obesity.

Our aim was to determine gene variants in the promoter region of *DEPTOR* associated with development of pre-diabetes and/or obesity.

191 obese children and adolescents (91 males/100 females, mean age 13.3 ± 3.3 years, mean BMI-SDS 2.82 ± 0.66) were studied. A standard Oral Glucose Tolerance Test (OGTT) was performed for each individual. Insulin resistance was defined by HOMA-IR and WBISI according to Madsuda. Genotyping of *DEPTOR* promoter region was performed using High Resolution Melt (HRM) analysis and Sanger sequencing. Chi-square test was used to detect statistical significance in frequency of specific genotypes.

Four polymorphisms (SNP) were identified: rs7840156, rs75781905, rs117543860 and rs140142743. The SNP rs7840156 (g.120885944T>C) was associated with reduced risk of insulin resistance determined by HOMA-IR (>2.6 ; an upper half cut-off value for the analyzed population) and WBISI (<3). The carriers of C allele had OR for IR according to HOMA-IR 0.63 (95% CI= 0.41-0.87; $p=0.038$) and OR for IR 0.58 (95% CI= 0.38-0.90; $p=0.018$) according to WBISI. Other detected SNPs were not associated with insulin resistance in the analyzed population. We were not able to associate any of the identified polymorphisms with obesity. A polymorphism in the promoter region of *DEPTOR* is associated with insulin resistance determined by HOMA-IR and WBISI measures. This implicates that *DEPTOR* is a new gene involved in the early phases of type 2 diabetes development in children and adolescents, most likely by inhibition of intracellular signaling through the insulin receptor and consequentially by altering insulin sensitivity.

Keywords: mTOR, *DEPTOR*, insulin resistance, obesity

SEZNAM SLIK

Slika 1: Molekularna sestava mTORC1 in mTORC2

Slika 2: Inzulin aktivira IRS1/2 in poveča prevzem in presnovo glukoze. Inzulin, citokini, hranila in rastni dejavniki aktivirajo mTOR in njen substrat S6K. S6K povzroča degradacijo IRS1/2.

Slika 3: Shema delovanja *DEPTOR* znotraj signalizacije mTOR.

Slika 4: Prekomerno aktivirana mTOR aktivira S6K, kar poveča fosforilacijo in posledično degradacijo IRS1/2.

Slika 5: Predlagan mehanizem, po katerem genetska varianta rs7840156 deluje “zaščitno” pred nastankom inzulinske rezistence.

SEZNAM TABEL

Tabela 1: Uporabljeni oligonukleotidni začetniki in njihove specifikacije

Tabela 2: Vrednosti χ^2 - testa za preverjanje odstopanj od Hardy-Weinbergovega načela

Tabela 3: Povprečne vrednosti in standardni odkloni za ITM-SDS, HOMA-IR in WBISI pri nosilcih različnih genotipov (rs75781905)

Tabela 4: Povprečne vrednosti in standardni odkloni za ITM-SDS, HOMA-IR in WBISI pri nosilcih različnih genotipov (rs117543860)

Tabela 5: Delež posameznih genotipov (rs7840156) med skupinami preiskovancev z/brez inzulinske rezistence po kriterijih HOMA-IR in WBISI

Tabela 6: Povprečne vrednosti in standardni odkloni za ITM-SDS, HOMA-IR in WBISI pri nosilcih različnih genotipov (rs7840156)

Tabela 7: Število posameznih alelov v populaciji z inzulinsko rezistenco in brez inzulinske rezistence

Tabela 8: Rezultati ANOVA, za opredelitev razlik med vrednostmi HOMA-IR indeksa pri nosilcih različnih genotipov (rs7840156)

Tabela 9: Rezultati ANOVA, za opredelitev razlik med vrednostmi WBISI pri nosilcih različnih genotipov (rs7840156)

Tabela 10: Rezultati ANOVA, za opredelitev razlik med ITM-SDS vrednostmi pri nosilcih različnih genotipov (rs7840156)

SEZNAM KRATIC IN OKRAJŠAV

bp – bazni pari

°C – stopinj celzija

μL – mikroliter

4E-BP1 – reverzibilni zaviralec translacije, preprečuje vezavo evkariontskega inicijacijskega dejavnika 4E na mRNA

5'UTR – neprevedljiva regija na 5' koncu

ADA – ameriško združenje za diabetes

AgRP – agouti-sorodni protein

AKT – aktin

APOA – apolipoprotein A

APS – adapterski protein S

ITM – indeks telesne mase

cAMP – ciklični adenzin monofosfat

CBL – E3 ubikvitin protein ligaza

CBP80 – jedro-vezavni protein z Mr 80kDa

DEPTOR – domeno DEP-vsebujoči protein, ki deluje na mTOR

DNA – deoksiribonukleinska kislina

DOK – družina umestitvenih proteinov

eEF2K – evkariontski faktor podaljševanja 2

eIF4B – evkariontski inicijacijski dejavnik4B

FKBP – družina proteinov z prolil-izomerazno aktivnostjo

FTO – protein povezan z maščobno maso in debelostjo

GLUT4 - glukozni prenešalec 4

GRB – vezni receptor rastnega faktorja

GRp 58 – protein, Mr 58kDa, reguliran z glukozo

GWAS – asociacijske študije celotnega genoma

HDL – lipoprotein visoke gostote

HRM – analiza talilne krivulje DNA pri visoki ločljivosti

IR – inzulinska rezistenca

IRS – substrat inzulinskega receptorja

LDL – lipoprotein nizke gostote

LEP – leptin

LSO – lizosomu podoben organel za skladiščenje

MC4R – melanokortinski receptor 4

min – minuta

mL – mililiter

mLST8 – protein smrti pri sesalcih

mSin1 – s stresom aktiviran protein, ki interagira z proteinsko kinazo

mTOR – tarča rapamicina pri sesalcih

ng – nanogram

NPC1 – protein Niemann-Pick C1

OGTT – standardni oralni glukozno tolerančni test

P85 – fosfoinozimid-3-kinaza

PDCD – protein programirane celične smrti 4

PDK – piruvat-dehidrogenazna kinaza

PI – fosfatidilinozitol

PI3K – fosfoinozimid-3-kinaza

PIKK – fosfatidilinozitol-3 z kinazo povezana kinaza

PKB – protein B kinaza

PKC – protein C kinaza

POMC – propiomelanokortin

PPAR - receptor, aktiviran s proliferatorjem peroksisomov

PRAS – Pro-bogati Akt substrat

PROTOR – protein opažen pri RICOR

Rac1 – botulinum toksični substrat 1

RAPTOR – regulatorni mTOR protein

RICTOR – intenzivni mTOR spremljevalec rapamicina

RNA – ribonukleinska kislina

RND – permeaze, ki sodelujejo pri rezistenci, noduliranju in delitvi

rpS6 – ribosomski protein S6

S6K1 – S6 kinaza 1

SB – sladkorna bolezen

SDS – število standardnih odklonov

s – sekunda

Ser – serin

SGK – od glukokortikoidov odvisna kinaza 1

SIRP – signalno-regulatorni protein

SKAR – tarča S6 kinaze 1

Tel2 – protein, ki vzdržuje telomere 2

Thr – treonin

TT – telesna teža

Tti – protein, ki interagira z Tel2

TV – telesna višina

UKC – univerzitetni klinični center

α MSH – α melanocit-stimulirajoči hormon

UVOD

Debelost

Debelost je v zadnjem desetletju v svetu dosegla epidemične razsežnosti, kar predstavlja zelo velik in pomemben javno-zdravstveni in ekonomsko-socialni problem. Na razvoj debelosti močno vplivajo okoljski dejavniki, hkrati pa ima, kot je bilo dokazano s številnimi asociacijskimi raziskavami, zelo pomembno vlogo tudi posameznikovo genetsko ozadje (1).

Debelost pri otrocih je globalni problem in izziv 21. stoletja. Na svetovni ravni je bilo v letu 2010 več kot 42 milijonov debelih otrok, ki so mlajši od pet let. Skoraj 35 milijonov jih živi v državah v razvoju, večina v urbanih okoljih (2).

Po kriterijih Svetovne zdravstvene organizacije so otroci s prekomerno telesno težo tisti otroci, ki imajo glede na povprečje telesno težo višjo za en standardni odklon indeksa telesne mase za starost in spol. Debeli otroci pa so tisti otroci, ki imajo glede na povprečje telesno težo višjo za dva standardna odklona indeksa telesne mase za starost in spol (2).

Debelost je opredeljena kot pretirano kopičenje belega maščobnega tkiva in je pogosto imenovana "bolezen modernizacije". Okolijski vzroki tovrstnega kopičenja maščobnega tkiva so neustrezna in neredna prehrana (prehrana z visoko vsebnostjo enostavnih sladkorjev, sladke pijače, hrana, ki vsebuje dodatke in hormone, izpuščanje obrokov itd.) ter premajhna telesna aktivnosti. Prekomerna debelost je povezana s povečano umrljivostjo in številnimi kroničnimi boleznimi ter stanji kot so: inzulinska rezistenca, sladkorna bolezen tipa 2, srčno-žilne bolezni in rakava obolenja (3).

Splošno sprejeto je, da je približno 65% razlik v debelosti družinsko oz. genetsko pogojenih (4). Raziskave kažejo, da je debelost kompleksna multifaktorska bolezen, do katere pride zaradi interakcij med številnimi geni, ki povečujejo dovzetnost za debelost, in okoljskimi dejavniki, ki privedejo do povečanega vnosa energetske bogate hrane v povezavi s telesno neaktivnim življenjskim slogom (5). Pri otrocih brez genetske nagnjenosti lažja dostopnost

energetsko bogate hrane in hkratna telesna neaktivnost ne bosta imeli vpliva na tveganje za razvoj otroške debelosti (6).

Asociacijske študije celotnega genoma (GWAS), izvedene na evropski populaciji debelih oseb, so identificirale 35 genetskih lokusov, povezanih z indeksom telesne mase (ITM), tri lokuse, povezane z odstotkom telesne maščobe, pet lokusov z obsegom trebuha, 14 lokusov z razmerjem med obsegom pasu in obsegom bokov, tri lokuse z trebušno podkožno tkivo in visceralno maščobno tkivo, šest lokusov z ekstremno in zgodnjo-začetno debelost in devet lokusov povezanih z otroško debelost (7).

Novejše raziskave izpostavljajo tri gene (*FTO*, *MC4R* in *NPC1*), ki v povezavi z visoko energetsko prehrano spodbujajo zgodnjo začetno ali otroško debelost (5).

Inzulinska rezistenca in inzulinsko signaliziranje

Inzulinska rezistenca (IR) je klinično definirana kot nezmožnost znane koncentracije eksogenega ali endogenega inzulina, da poveča absorpcijo in izkoriščanje oz. uporabo glukoze pri posamezniku v taki meri, kot se to zgodi pri referenčni populaciji (8).

Inzulin je najmočnejši znan fiziološki anabolik, ki spodbuja shranjevanje in sintezo maščob, beljakovin, ogljikovih hidratov, hkrati pa zavira njihovo razgradnjo in sproščanje v krvni obtok (9). Inzulin poveča skladiščenje energije in energetske izrabe tako, da regulira prenos glukoze v celico preko glukoznega prenašalca GLUT4. Inzulin poveča koncentracijo GLUT4 prenašalcev na celični membrani in posledično privzem glukoze v celico (10).

Inzulinski receptor je bifunkcionalni heterotetramerni kompleks, sestavljen iz dveh zunajceličnih α podenot, kamor se veže inzulin, in dveh transmembranskih β podenot s tirozin kinazno aktivnostjo. Vezava inzulina na α podenoto povzroči transfosforilacijo β podenot, kar ima za posledico fosforilacijo specifičnih tirozinskih ostankov v aktivacijski zanki in povečanje kinazne katalitične aktivnosti β podenot (10).

Aktiviran inzulinski receptor nato fosforilira tirozinske ostanke znotrajceličnih substratov, kamor sodijo substrati družine inzulinskega receptorja (IRS1 do 4), IRS5/DOK4, IRS/DOK5,

GRB-1, CBL, APS, SHC izoforme in člani družine signalno-regulatornih proteinov (SIRP) (10).

Inzulinska stimulacija prevzema glukoze je lahko posredovana preko fosfatidilinozitol (PI) 3-kinazno odvisne poti ali preko fosfatidilinozitol (PI) 3-kinazno neodvisne poti (11). Po fosforilaciji tirozinskih ostankov IRS proteini interagirajo s p85 regulatorno podenoto PI 3-kinaze, kar aktivira encim. Aktivirana PI 3-kinaza rekrutira in aktivira nekatere encime, njihove substrate, adapterske molekule in beljakovine citoskeleta. Med njimi je Ser/Thr kinaza PDK1, ki fosforilira in s tem aktivira več drugih kinaz, med katerimi je tudi AKT1. PI 3-kinaza omogoča translokacijo AKT na celično membrano, kar poveča izražanje GLUT4 glukoznega prenašalca na površini celične membrane in s tem posledično poveča prevzem glukoze v celico (12).

Tarča rapamicina pri sesalcih (mTOR)

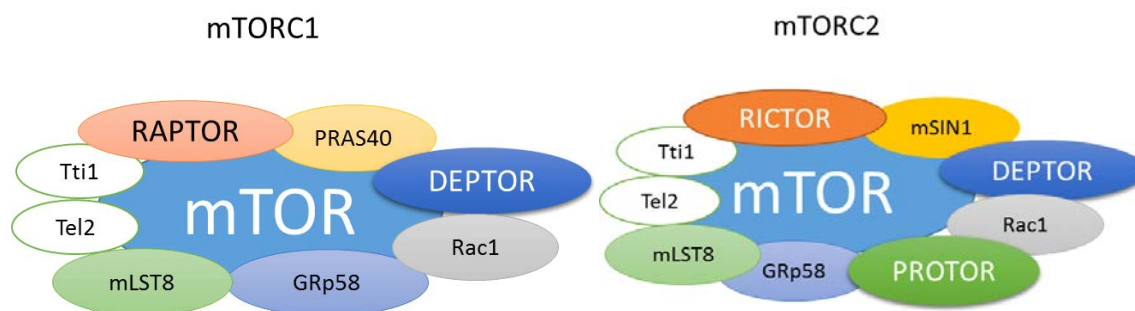
Tarča rapamicina pri sesalcih (mTOR), znana tudi kot FRAP, RAFT in RAPT, je konzervativna Ser/Thr proteinska kinaza. Sodi v družino proteinskih kinaz (PIKK), v katero spadajo veliki proteini, ki omogočajo organizmom spopadanje z metabolnim, okoljskim in genetskim stresom (13–15). Regulira celično rast, staranje in metabolizem v velikem številu različnih organizmov. mTOR tvori dva strukturno in funkcionalno različna kompleksa, mTOR kompleks 1 (mTORC1) in mTOR kompleks 2 (mTORC2) (16).

Oba kompleksa, mTORC1 in mTORC2, razlikujemo glede na njuno molekularno sestavo (Slika 1). Prisotnosti molekule RAPTOR (*ang. regulatory associated protein of mTOR*) je značilna za mTORC1. Prisotnost specifične molekule RICTOR (*ang. rapamycin-intensive companion of TOR*) v kompleksu pa opredeli mTORC2 (13,14). Molekuli RAPTOR in RICTOR določata substrate in regulatorne strukture, ki jih lahko veže določeni kompleks (17).

Oba kompleksa imata v svoji sestavi naslednje molekule: Tti1 (*ang. Tel2 interacting protein 1*), Tel2 (*ang. telomere maintenance 2*), mLST8 (*ang. mammalian ortholog of lethal*), GRp58 (*ang. for 58 Kda glucose-regulated protein*) in Rac1 (*ang. Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1*). V mTORC1 je prisoten negativni regulator PRAS 40 (*ang. for Pro-rich Akt*

substrate of 40 KDa), mTORC2 pa vsebuje PROTOR (*ang. for protein observed with Ricor*) in mSin1 (*ang. mammalian stress activated protein kinase interacting protein*). Domeno DEP vsebujoči protein, ki interagira z mTOR (DEPTOR) in deluje kot negativni regulator signalne poti, je prav tako prisoten v obeh kompleksih (13,14,18).

Rapamicin inhibira aktivnost mTORC1, na mTORC2 pa nima inhibitornega učinka. Rapamicin se veže na protein FKBP-12, kar povzroči disociacijo molekule RAPTOR iz kompleksa mTORC1 in privede do omejene razpoložljivosti mTORC1 za določene substrate (13).



Slika 1: Molekularna sestava mTORC1 in mTORC2. Povzeto po: Xie J, Herbert TP. The role of mammalian target of rapamycin (mTOR) in the regulation of pancreatic β -cell mass: implications in the development of type-2 diabetes. *Cell Mol Life Sci CMLS*. 2012; 69:1289–304.

Substrati mTORC1, S6 kinaza 1 (S6K1) in eIF-4E vezoči protein 1 (4E-BP1), regulirajo začetek in nadaljevanje prevajanja mRNA in s tem tudi proteinsko sintezo. 4E-BP1, ki je fosforiliran s strani mTORC1, deluje kot zaviralec prevajanja mRNA v protein (13).

Fosforilacija S6K1 povzroči njeno aktivacijo in posledično fosforilacijo številnih substratov, med katerimi so: rpS6 (*ang. ribosomal protein S6*), SKAR (*ang. S6K1 Aly/REF like target*), eIF-4B (*ang. eukaryotic initiation factor-4B*), PDCD4 (*ang. programmed cell death protein 4*), eEF-2K (*ang. eukaryotic elongation factor2*), CBP80 (*ang. 80 KDa nuclear cap-binding protein*). Aktivirana S6K1, prav tako fosforilira substrat inzulinskega receptorja 1 (IRS-1) na

serinih na aminokislinskih mestih 307 in 1101, kar privede do zmanjšanja inzulinskega signaliziranja (14).

mTORC2 deluje kot pozitivni regulator v organizaciji aktinskega citoskeleta, polarizaciji in celični migraciji. Mehanizem, ki privede do teh efektov, ni povsem pojasnjen, znano pa je, da mTORC2 fosforilira člane kinazne družine AGC (proteinske kinaze A, G in C). V to družino spadajo tudi PKB (*ang. protein kinase B isotypes*), SGK1 (*ang. serum/glucocorticoid-induced kinase 1*) in PKC (*ang. protein kinase C isotypes*), pri katerih fosforilacija povzroči stabilizacijo in aktivacijo. Aktivirane kinaze iz družine AGC uravnavajo celični cikel, celično preživetje in anabolizem in so vpletene v patogenezo raka in sladkorne bolezni (13,15,19,20).

Aktivnost mTORC1 je regulirana z razpoložljivostjo in količino hranil, rastnih dejavnikov, energije in stresa. Omenjeni regulatorji lahko sodelujejo ali si nasprotujejo med seboj, kar omogoča zelo natančno kontrolo aktivnosti (13,21,22).

Mehanizem regulacije aktivnosti mTORC2 še ni povsem raziskan. Do sedaj objavljeni rezultati nakazujejo na to, da samo rastni dejavniki lahko regulirajo aktivnost tega kompleksa (13).

Vpliv signalne poti mTOR pri patogenezi raka, staranju in metabolizmu

mTOR je pogosto aktivirana v človeškem rakavem tkivu. Kot kažejo raziskave, motnje v regulaciji signalne poti mTOR vplivajo na celični metabolizem in celično rast in s tem prispevajo k nastanku in napredovanju raka. Vzročne spremembe v metabolizmu pri nastanku raka so podprte z dokazi, da debelost in sladkorna bolezen delujeta kot dejavniki tveganja za razvoj raka ter, da ustrezna prehrana lahko pozitivno vpliva na tumorsko rast (16,23–25).

Staranje je posledica kopičenja celičnih poškodb s časom, kar spodbuja razvoj bolezni in smrt. Genetsko ali farmakološko inhibiranje signalizacije preko mTORC1 podaljšuje življenjsko dobo pri kvasovkah, črvih, miših in muhah. Rapamicin, znan inhibitor signalne poti mTOR, odloži nastanek s starostjo povezanih bolezni in podaljša življenjsko dobo tudi pri starejših

miših. Prehranska omejitev, kar pomeni omejevanje vnosa hranil brez nastanka podhranjenosti, prav tako upočasnjuje staranje. Na molekularnem nivoju je to najverjetneje posledica inhibicije signalizacije mTORC1 (26,27).

mTORC1 najverjetneje kontrolira staranje preko svojih substratov S6K in 4E-BP in preko regulacije proteinske sinteze. Še bolj pomembno, aktivacija 4E-BP vodi do aktivacije genov, odzivnih na stres in genov vpletenih v mitohondrijsko elektronsko transportno verigo, kar varuje celico pred poškodbami povezanimi s staranjem (28,29).

Vloga mTORC2 pri staranju je manj jasna, vendar je bilo dokazano podaljšanje življenjske dobe na modelu *C. elegans*, kot posledica inaktivacije TORC2 (16).

Signalna pot mTOR ima vpliv pri metabolizmu. Na tešče jetra proizvajajo glukozo v procesih glikogenolize (razgradnja glikogena) in glukoneogeneze (sinteza glukoze iz alternativnih virov) z namenom, da preprečijo nastanek hipoglikemije. Po obroku pride do dviga koncentracije glukoze in takrat se začne poraba (glikoliza) ter skladiščenje (glukogeneza in lipogeneza) odvečne glukoze z namenom, da se prepreči nastanek hiperglikemije. Gensko spremenjene miši z motnjo v signaliziranju mTOR v jetrih so glukozno intolerantne, hiperglikemične, hiperinzulinemične in kažejo zmanjšano vsebnost glikogena. To nakazuje pomembno vlogo signalizacije mTOR v vzdrževanju glukozne homeostaze (16,30).

mTOR ima pomembno vlogo tudi pri metabolizmu v skeletno-mišičnih celicah. Pri miših z izbitim specifičnim genom je opazna mišična atrofija, zmanjšana oksidativna kapaciteta in povečana vsebnost glikogena v skeletnih mišicah. Enako stanje je prisotno pri miših s zmanjšano aktivnostjo S6K1, kar nakazuje na to, da mTORC1 kontrolira mišično maso in mišično funkcijo, vsaj preko S6K1 (16,31).

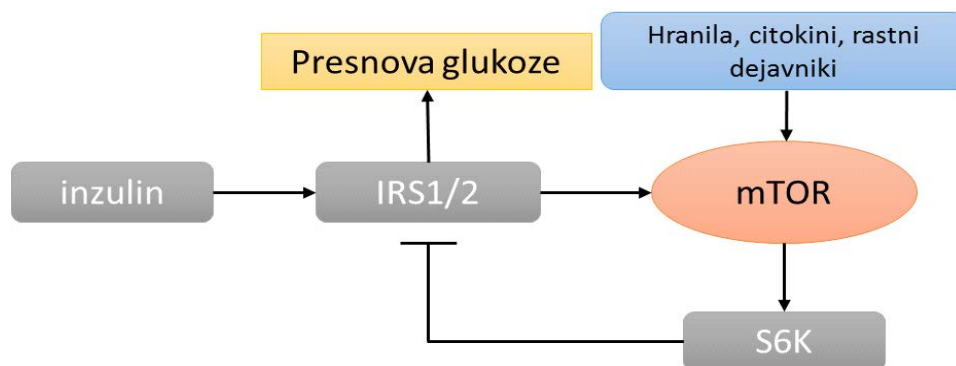
Pretirano kopičenje belega maščobnega tkiva poveča tveganje za nastanek inzulinske rezistence, sladkorne bolezni tipa 2, srčno-žilnih bolezni in raka. *In vivo* in *in vitro* študije potrjujejo, da ima hiperaktivacija mTORC1 za posledico povečano nastajanje maščobnih celic (16,32).

Prekomerna aktivacija signalne poti mTOR vodi do nastanka inzulinske rezistence in sladkorne bolezni tipa 2

Hranila, rastni dejavniki in citokini aktivirajo signalno pot mTOR/S6K, kar ovira inzulinsko signaliziranje in s tem povzroči inzulinsko rezistenco (33–35).

Prekomerno aktiviran mTOR aktivira S6K, kar poveča fosforilacijo in posledično razgradnjo IRS1/2, hkrati pa vpliva tudi na GRB10. Posledica je inzulinska rezistenca (Slika 2) (34,35).

Povečano proizvodnjo inzulina sprva kompenzira IR. Sledi porast koncentracije glukoze, ki spodbuja rast, proliferacijo in preživetje β -celic, kar vodi do celične hipertrofije in hiperplazije. Hiperfunkcija pa vodi do odpovedi delovanja β -celic in do nastanka SB tipa 2 (33,34).



Slika 2: Inzulín aktivira IRS1/2 in poveča prevzem in presnovo glukoze. Inzulín, citokini, hranila in rastni dejavniki aktivirajo mTOR in njen substrat S6K. S6K povzroča razgradnjo IRS1/2. Povzeto po: Blagosklonny MV. TOR-centric view on insulin resistance and diabetic complications: perspective for endocrinologists and gerontologists. Cell Death Dis. 2013;4:e964.

Novejša študija je dokazala, da je zmanjšano izražanje gena za RAPTOR povezano s povečano sekrecijo in znotrajcelično vsebnostjo inzulina. Zmanjšano izražanje gena za RICTOR pa nasprotno oslabi inzulinsko sekrecijo, ne da bi to vplivalo na znotrajcelično

vsebnost inzulina. To nakazuje na antagonistični vpliv mTORC1 in mTORC2 pri reguliranju inzulinske sekrecije, ter na to, da je samo RAPTOR oz. mTORC1 sposoben kontrolirati inzulinsko biosintezo (36).

Rezultati številnih študij potrjujejo pomembno vlogo signalne poti mTOR/S6K pri nastanku inzulinske neodzivnosti, kar uvrsti njene komponente med morebitne farmakološke tarče za preprečevanje in zdravljenje IR (37,38).

Domeno DEP vsebujoči protein, ki deluje na mTOR (DEPTOR), inhibitor signalne poti mTOR

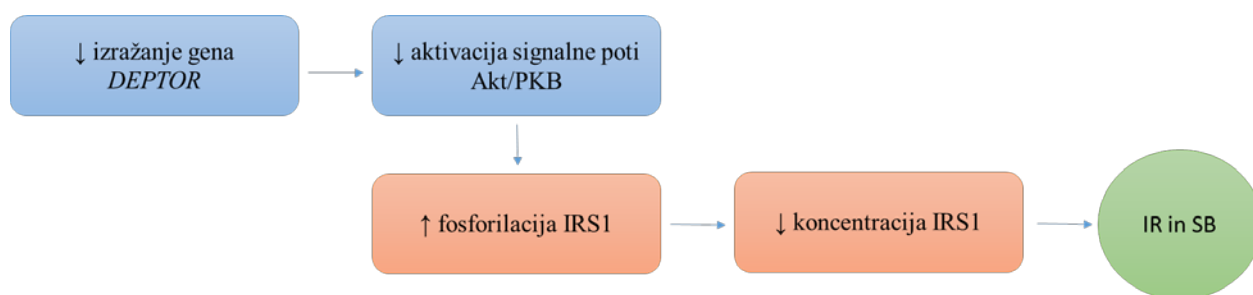
Domeno DEP vsebujoči protein, ki deluje na mTOR (DEPTOR), je bil nedavno prepoznan kot nov protein, ki zavira signaliziranje mTOR. DEPTOR se lahko veže na oba mTOR kompleksa, mTORC1 in mTORC2, in inhibira njuno aktivnost, hkrati pa zmanjšuje njuno stabilnost. Po drugi strani so koncentracije njegove mRNA in samega proteina regulirane s strani mTORC1 in mTORC2, kar nakazuje na prisotnost negativne povratne zanke (42).

Dosedanje raziskave, izvedene na živalskem modelu so pokazale, da je povečana stopnja izražanja gena *Deptor* povezana s povečano tvorbo belega maščobnega tkiva in celičnim preživetjem (40,41). Prav tako je bilo dokazano, da ima povečana stopnja izražanja gena *Deptor* zaščitno funkcijo pri razvoju nevrodegenerativnih bolezni (42).

Raziskave, izvedene pri človeku, so pokazale, da je stopnja izražanja gena *DEPTOR* direktno povezana s stopnjo debelosti, ter da povečano izražanje negativno korelira z stopnjo napredovanja kolorektalnega raka (40,43). Rezultati raziskave, izvedene na endotelijski celični kulturi, nakazujejo na vpletenost *DEPTOR*ja pri celični aktivaciji provnetnega in angiogenega celičnega odziva (44). Zanimivi so tudi rezultati študije, izvedene na humanih placentah, ki izpostavljajo, da stopnja izražanja gena *DEPTOR* označuje prisotnost stresa med nosečnostjo (45).

Izražanje gena *DEPTOR* je povečano pri debelih osebah in pozitivno korelira s stopnjo debelosti. DEPTOR spodbuja tvorbo maščobnega tkiva preko aktivacije celične signalizacije Akt/PKB in PPAR- γ (40).

Zmanjšano izražanje gena *DEPTOR* blokira aktivacijo signalne poti Akt/PKB. To privede do povečane fosforilacije IRS1 in posledično do zmanjšanja njegove koncentracije. IRS1 je ključen pri vzdrževanju glukozne homeostaze, njegovo pomanjkanje pa vodi do razvoja IR in SB (Slika 3) (40).



Slika 3: Shema delovanja *DEPTOR*-ja znotraj signalizacije mTOR. Povzeto po: Laplante M, Horvat S, Festuccia WT, Birsoy K, Prevorsek Z, Efeyan A, et al. DEPTOR cell-autonomously promotes adipogenesis, and its expression is associated with obesity. *Cell Metab.* 2012; 16:202–12.

NAMEN DELA IN HIPOTEZA

Z analizo genetskih sprememb v promotorski regiji gena *DEPTOR* v slovenski populaciji debelih otrok in mladostnikov smo želeli posredno opredeliti vpliv gena *DEPTOR* na razvoj debelosti in inzulinske rezistence.

S pomočjo analize talilne krivulje DNA v visoki ločljivosti (HRM) in določanja nukleotidnega zaporedja DNA s Sangerjevo reakcijo bomo dobili informacije o nukleotidnem zaporedju v promotorski regiji gena *DEPTOR*, kar bo omogočilo opredelitev prisotnih genetskih sprememb.

S pomočjo statističnih pristopov bomo poiskali povezavo med genotipi in razvojem debelosti in/ali inzulinske rezistence.

Predpostavljamo, da so genetske spremembe v promotorski regiji gena *DEPTOR* statistično značilno povezane z debelostjo in/ali s prisotnostjo inzulinske rezistence pri otrocih in mladostnikih.

PREISKOVANCI IN METODE

Preiskovanci

V raziskavo smo vključili 191 debelih otrok in mladostnikov, ki so bili spremljani na Kliničnem oddelku za endokrinologijo, diabetes in bolezni presnove Pediatrične klinike UKC Ljubljana. Povprečna starost preiskovancev je bila $13,3 \pm 3,3$ leta. Razmerje med spoloma je bilo 1,075:1 v prid ženskam. Povprečen ITM-SDS je bil $2,82 \pm 0,66$. Standardni OGTT je bil izveden za vsakega preiskovanca posebej. Odvzem vzorcev je potekal ob rednem zdravniškem pregledu. Starši oz. skrbniki so bili seznanjeni z namenom in potekom raziskave in so podali soglasje za odvzem in analizo vzorca.

Raziskava je bila odobrena s strani Komisije Republike Slovenije za medicinsko etiko (št. odobritve: #25/10/09).

Metode

Osamitev genomske DNA

Reagenti in raztopine:

- Komercialno dostopni pufer za lizo celic – FG1 (FlexiGene DNA isolation kit, Qiagen)
- Komercialno dostopni denaturacijski pufer – FG2 (FlexiGene DNA isolation kit, Qiagen)
- Izopropanol

- 70% etanol – pripravljen z didestilirano vodo
- Komerzialno dostopni hidracijski pufer – FG3 (FlexiGene DNA isolation kit, Qiagen)
- Didestilirana voda

Inštrumenti in aparature:

- Centrifuga
- Spektrofotometer - Lambda 25 (Perkin Elmer)
- Mikro kvarčne kivete, 10 mm (Helma)

Postopek

Genomsko DNA smo osamili iz levkocitov periferne krvi po ustaljenem in rutinskem laboratorijskem protokolu s kompletom reagentov FlexiGene DNA isolation kit (Qiagen, Nemčija). V 50 mL centrifugirko Falcon smo prenesli 5 mL periferne venske krvi, odvzete v epruveto z dodanim EDTA, dodali 12,5 mL pufera FG1, premešali in centrifugirali 5 min pri 2000 g. Supernatant smo zavrgli in oborini dodali 2,5 mL pufera FG2. Sledila je 10-minutna inkubacija pri 65 °C. Dodali smo 2,5 mL izopropanola in s tem oborili DNA. Po 5-minutnem centrifugiranju smo supernatant zavrgli in dodali 2,5 mL 70% etanola. Ponovno smo centrifugirali. Sledilo je sušenje preostale DNA in njeno raztapljanje v 0,5 mL pufera FG3.

Koncentracijo in čistost DNA smo določili z merjenjem absorbance pri valovnih dolžinah 260 nm in 280 nm. Sledila je priprava delovne založne raztopine vzorčne DNA s koncentracijo 100 ng/μL in priprava delovne raztopine s koncentracijo 5 ng/μL. Pri tem smo vzorčno DNA raztapljali v didestilirano vodo.

Začetni oligonukleotidi

Za pomnoževanje izbranih področij gena *DEPTOR*, in sicer področja, pomembnega za vezavo transkripcijskih faktorjev (TFBS), in 5' neprevedljivega področja (5'UTR), smo uporabili začetne oligonukleotide, ki so navedeni v Tabeli 1. Izbrali smo jih s programom Primer3 (v.0.4.0). V začetnih oligonukleotidih, ki jih je predlagal program, smo preverili prisotnost pogostih različic posameznih nukleotidov (SNP) s programom SNPCheck in izbrali tiste, kjer niso bile prisotni (46).

Tabela 1: Uporabljeni oligonukleotidni začetniki in njihove specifikacije

Ime	Sekvenca	Tm-temperatura prileganja (°C)
DEPTOR_TFBS_F	gggggtgtggaacgtacaataa	59,6
DEPTOR_TFBS_R	ccgctgctctgactggat	60,1
DEPTOR_5UTR_F	cccccaagctcaagttct	59,27
DEPTOR_5UTR_R	accaagacctcagccatgc	61,25

Pri pomnoževanju s parom začetnih oligonukleotidov DEPTOR_TFBS (*ang. Transcript Factor Binding Site*) smo zajeli zaporedje DNA dolžine 299 bp (Tabela 1), pri pomnoževanju s parom začetnih oligonukleotidoc DEPTOR_5UTR pa 307 bp (Tabela 1).

Analiza talilne krivulje DNA v visoki ločljivosti

Reagenti in raztopine:

- Komercialno dostopna reakcijska mešanica Type-IT HRM Mastermix (Qiagen)
- Komercialno dostopni začetni oligonukleotidi F in R
- Didestilirana voda

Inštrumenti in aparature:

- Aparat za kvantitativno verižno reakcijo s polimerazo v realnem času (qPCR) ABI 7500 Fast Real Time PCR System (Applied Biosystems)
- Reakcijska ploščica z 96 vdolbinicami – MicroAmp® Fast Optical 96-Well Reaction Plate (Applied Biosystems)

Postopek

Analiza talilne krivulje DNA v visoki ločljivosti (HRM) se uporablja za opredelitev prisotnosti genetskih sprememb v analiziranih amplikonih. Pri tem spremljamo proces razvijanja dvoverižne strukture DNA v odvisnosti od naraščanja temperature. Uporabljamo fluorescentna barvila, ki svetijo le, kadar so vezana na dvoverižno DNA. Tako merimo spreminjanje fluorescence v realnem času, ki je posledica razvijanja dvoverižne DNA molekule v odvisnosti od temperature. Spremembe v talilni krivulji posameznega amplikona so posledice razlik v nukleotidnem zaporedju. Boljšo kvaliteto in občutljivost same analize dosežemo z uporabo fluorescentnih barvil, ki ne vplivajo na verižno reakcijo s polimerazo (PCR) (47).

Analizo HRM lahko razdelimo v dve fazi:

- **Verižna reakcija s polimerazo:** V tej fazi pomnožimo odsek DNA, ki ga želimo analizirati.
- **Snemanje talilne krivulje:** Snemanje poteka kontinuirano v temperaturnem območju, ki ga opredelimo ob začetku analize. Temperatura se spreminja s hitrostjo med 0,5 in 1 °C/min. Ob tem detektor neprestano beleži intenziteto fluorescence.

Obe fazi smo izvedli na aparatu za kvantitativno verižno reakcijo s polimerazo v realnem času (qPCR) ABI 7500 Fast Real Time PCR System (Applied Biosystems, ZDA). Za izvedbo analize smo uporabili komercialno dostopno predpripravljeno reakcijsko mešanico Type-IT HRM Mastermix (Qiagen, Nemčija). V 5 µL osnovne zmesi smo dodali 2 µL vzorca genomske DNA, ustrezne kvalitete, s koncentracijo 5 ng/µL, po 0,2 µL začetnih oligonukleotidov F in R (smerni in protismerni) ter 2,6 µL vode. Vzorce in osnovno zmes smo razporedili po reakcijski ploščici z 96 vdolbinicami. Temperaturni profil analize je bil:

- Aktivacija polimeraze 95°C/5min
- 45 ciklov: 95°C/10s; 60°C/25s; 72°C/15s
- Snemanje talilne krivulje med 75°C in 95°C

Posnete talilne krivulje smo analizirali s programom HRM 2.0 (Applied Biosystems, ZDA). Analiza talilnih krivulj nam je podala podatek o razlikah in podobnostih med posameznimi amplikoni različnih preiskovancev. Brez referenčnih vzorcev z znanim oligonukleotidnim zaporedjem nismo mogli ugotoviti, za kakšno spremembo gre. Za pridobitev kvalitativne informacije o spremembah v nukleotidnem zaporedju preiskovancev z amplikoni, ki so imeli isto talilno krivuljo, smo izvedli sekvenciranje posameznih vzorcev z enako talilno krivuljo.

Določanje nukleotidnega zaporedja DNA

Reagenti in raztopine:

- Komercialno dostopna encimska mešanica - ExoSap-IT (Affymetrix)
- Komercialno dostopna osnovna mešanica za sekvenciranje - BigDye Terminator (Applied Biosystems)
- Komercialno dostopni začetni oligonukleotidi F
- 3M natrijev acetat (pH 4,8)
- 100% etanol
- 70% etanol – pripravljen z didestilirano vodo

Inštrumenti in aparature:

- Aparat za PCR, ABI 9700 (Applied Biosystems)
- Centrifuga
- Sekvenator ABI 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)

Postopek

Določanje nukleotidnega zaporedja izbranih vzorcev reakcij HRM smo izvedli s Sangerjevo reakcijo. V reakciji se uporablja pristop pomnoževanja PCR z različno označenimi dideoksinukleotidi in samo enim začetnim oligonukleotidom. Pri sintezi nove verige se vgrajujejo deoksinukleotidi, ki imajo na 3' položaju hidroksilno skupino, kar omogoča vezavo z naslednjim deoksinukleotidom. Kadar se vgradi dideoksinukleotid, ki na 3' položaju nima

hidroksilne skupine, vezava naslednjega deoksinukleotida ni možna in se sinteza specifične DNA verige ustavi. Dideoksinukleotidi se vgrajujejo naključno. Ta ciklični proces se večkrat ponovi, zato se dideoksinukleotid vgradi na vsakem mestu tarčne sekvence DNA. Sledi kapilarna elektroforeza, ki mešanico različno dolgih fragmentov loči po velikosti, ob tem pa detektor ob izhodu iz kapilare zaznava tudi barvni signal označenega dideoksinukleotida, vezanega na koncu zaporedja. Računalniški program iz podatkov o zaznanih barvnih signalih sestavi nukleotidno zaporedje.

Za pripravo sekvenčne reakcije smo najprej v izbranih vzorcih odstranili nevezane oligonukleotide, dNTP-je in ostanke reakcije HRM, ki bi motili nadaljnjo analizo. Uporabili smo 2 μL produkta reakcije HRM, ki smo mu dodali 1 μL encimske mešanice ExoSap-IT (Affymetrix, ZDA), ki vsebuje alkalno fosfatazo in eksonukleazo I, sledila je 15-minutna inkubacija pri 37°C. ExoSap-IT omogoči čiščenje produkta PCR tako, da encimsko odstrani nevezane oligonukleotidne začetnike in deoksinukleotide. Encime smo deaktivirali z inkubacijo pri 80°C 15 min. Posameznemu vzorcu smo nato dodali 16,2 μL osnovne mešanice za sekvenciranje BigDye Terminator (Applied Biosystems, ZDA) in 0,3 μL začetnega oligonukleotida. Tako pripravljene vzorce smo pomnoževali v aparatu za PCR, ABI 9700 (Applied Biosystems, ZDA) po naslednjem temperaturnem protokolu:

- 96°C/1min
- 25 ciklov 96 °C/10 s, 50 °C/5 s, 60 °C/4 min
- ohladitev reakcije na 4 °C

Po zaključeni sekvenčni reakciji smo nastale fragmente očistili z obarjanjem z natrijevim acetatom in etanolom in smo tako odstranili nevgrajene ddNTP-je. Reakcijski zmesi smo dodali 2 μL 3M natrijevega acetata (pH 4,8) in 50 μL 100-odstotnega etanola. Po 10-minutni inkubaciji na ledu je sledilo 45-minutno centrifugiranje pri 1500g. Supernatant smo takoj odstranili in nato dodali 70 μL 70-odstotnega etanola. Sledilo je 15 minutno centrifugiranje pri 1500g. Supernatant smo odstranili, oborino pa posušili pri sobni temperaturi.

Nukleotidno zaporedje smo določili s sekvenatorjem ABI 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, ZDA). Zaporedje smo analizirali z računalniškim programom Sequencing Analyses Software 5.4 (Applied Biosystems, ZDA).

Analiza genetskih variant

Za analizo nukleotidnih zaporedij in prepoznavanje prisotnih genetskih sprememb smo uporabljali algoritem BLAST, ki omogoča primerjavo izbranega zaporedja z referenčnimi zaporedji iz knjižnic oz. podatkovnih baz, v našem primeru z referenčno sekvenco gena *DEPTOR* (ENSG00000155792) (48).

Genetske variante, ki smo jih odkrili, smo analizirali s pomočjo orodij in podatkovnih baz projekta ENSEMBL (49).

Izračun indeksov inzulinske občutljivosti

Indeksi inzulinske občutljivosti nam podajo informacijo o delovanju β -celic trebušne slinavke na osnovi podatkov dobljenih iz meritev OGTT. S to informacijo predvidimo nastanek inzulinske rezistence, še preden jo lahko zaznamo s standardnimi krvnimi testi. Inzulinska rezistenca je posledica neodzivnosti na inzulin in je nedvomno predstopnja sladkorne bolezni (50).

Model za oceno homeostaze inzulina (HOMA-IR) in indeksa inzulinske občutljivosti po Matsudi (WBISI) smo izračunali s pomočjo spletnega kalkulatorja za izračun inzulinske občutljivosti. Vrednost WBISI pod 2,5 nakazuje prisotnost inzulinske rezistence pri preiskovancu. Vrednost HOMA-IR, ki je presegala 2,5, je pomenila prisotnost jetrne inzulinske rezistence (51).

Statistična analiza

Statistično analizo smo opravili v statističnem programskem okolju GraphPad Prism 6. Izračunano p-vrednost, nižjo od 0,05, smo prevzeli kot statistično značilno. Za kvantitavni opis demografskih in kliničnih značilnosti analizirane skupine smo uporabili pristope deskriptivne statistike. Opredelili smo velikost vzorca, povprečno starost, razmerje med spoloma, povprečne vrednosti telesne teže (TT), povprečne vrednosti telesne višine (TV), povprečne vrednosti indeksa telesne mase (ITM) in pripadajoče standardne odklone od povprečja. Opredelili smo kako se te vrednosti porazdeljujejo v našem vzorcu.

Z uporabo Z-testa, smo izračunali število standardnih odklonov (SDS) za telesno višino, telesno težo in indeksa telesne mase.

SDS (*ang. Standard Deviation Score*) je število standardnih odklonov nekega podatka glede na povprečno vrednost vzorca. Pozitivni SDS je vrednost, ki se nahaja nad povprečjem vzorca, negativni SDS pa je vrednost, ki se nahaja pod povprečjem vzorca. Izračun SDS vrednosti omogoča standardizacijo in/ali normalizacijo porazdeljevanja opazovanega vzorca. SDS vrednost se imenuje tudi z-vrednost, zaradi tega, ker je normalna statistična porazdelitev včasih imenovana tudi "Z-porazdelitev".

Za izračun SDS vrednosti se uporablja Z-test. Z-test je uporaben le v primeru, ko je prisotna normalna porazdelitev v populaciji, ter ko je znana njena varianca. Za izračun z-vrednosti se uporabi naslednja formula:

$$SDS = z = \frac{x - \mu}{\sigma}$$

Pri tem je x fizična meritev, μ srednja vrednost populacije in σ je standardni odklon populacije.

Težava se je pojavila pri stratificiranju otroške in mladostniške populacije v skupinah glede na debelost. Široko sprejet kriterij porazdelitve glede na odstotek telesne maščobe je sprejemljiv

le za odraslo populacijo. Pri otrocih in mladostnikih se vrednosti odstotka telesne maščobe nezvezno spreminjajo med odraščanjem, kar nakazuje na potrebo, da se meje postavijo glede na starost. Zato smo za uvrstitev preiskovancev v skupine glede na debelost uporabljali centilne krivulje. Centilne krivulje za ITM prikazujejo nabor podatkov po spolu in so konstruirane po metodi LMS, kar pomeni, da vsebujejo tri starostno specifične krivulje, imenovane L-lambda, M-mu in S-sigma. Krivulje M in S sta skladne s povprečjem in koeficientom variacije ITM, krivulja L pa predstavlja starostno specifično asimetrijo porazdelitve ITM. Za izračun z-vrednosti in ustreznega percentila za dano meritev (X), smo uporabili naslednjo formulo (52):

$$SDS = Z = \frac{\left(\left(\frac{X}{M}\right)^L\right) - 1}{LS}, L \neq 0$$

Pri tem je X fizična meritev (ITM) in S, M in L so tabelirane starostno specifične vrednosti.

Za opredelitev razlik med skupinami genotipskih nosilcev določenega polimorfizma smo uporabili t-test z Welchovo korekcijo. T-test z Welchovo korekcijo predpostavlja, da sta obe skupini normalno porazdeljeni, vendar ne predpostavlja, da imata obe skupini enak standardni odklon. Za izračun Welchovega t-testa smo uporabili naslednjo formulo:

$$t = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{\sqrt{\frac{s_1^2}{N_1} + \frac{s_2^2}{N_2}}}$$

Pri tem je \bar{X}_i povprečje vzorca, s_i^2 varianca vzorca in N_i je velikost vzorca.

Za opredelitev preferenčnih skupin smo uporabili izračun razmerja obetov (OR), ki temelji na principu χ^2 - testa. Poslužili smo se statističnih orodij z uporabo 2x2 kontingenčne tabele, s katero smo podali odnos med frekvenco genotipa in frekvenco fenotipa oz. IR:

	Genotip 1	Genotip 2
IR - prisotna	a	b
IR - ni prisotna	c	d

Razmerje obetov predstavlja verjetnost za določen izid v dani situaciji. V našem primeru je to verjetnost za pojav inzulinske rezistence ob prisotnosti določenega genotipa. Za izračun uporabimo naslednjo formulo (53):

$$OR = \frac{a/c}{b/d} = \frac{ad}{bc}$$

Rezultat smo podali tudi v obliki p-vrednosti in 95% intervalom zaupanja (IZ). 95% interval zaupanja je območje, znotraj katerega lahko z 95% zanesljivostjo trdimo, da leži naša vrednost. (53).

Ustreznost populacije za genetsko populacijsko študijo, smo preverili z uporabo testa Hardy-Weinbergovega načela. Hardy-Weinbergovo načelo je temelj sodobne populacijske genetike, ki pravi, da je razmerje med frekvenco alelov in genotipov konstantno med generacijami, pod pogojem, da so odsotni evolucionjski vplivi. Torej, če evolucionjski mehanizmi ne delujejo na populacijo, frekvence genskega nabora ostajajo nespremenjene med generacijami. Načelo predpostavlja, da ne prihaja do mutacij, da je populacija zaprta, da naravna selekcija ne vpliva različno na nosilce različnih alelov, da je parjenje popolnoma naključno in da je populacija neskončno velika (54).

Hardy-Weinbergovo načelo je teoretična osnova za vrednotenje odstopanj, saj v naravi nikoli niso izpolnjene vse zgoraj naštet predpostavke. Odstopanja vrednotimo z uporabo χ^2 - testa ali

Fisherjevega eksaktnega testa, v primerih, kadar je analizirana populacija številjsko manjša. (54).

Z uporabo kalkulatorja po Michael H. Courtu smo preverili odstopanja od Hardy-Weinbergovega načela (55). P-vrednost, višja od 0,05, je pomenila, da je preiskovana populacija v skladu z Hardy-Weinbergovim načelom in da zadošča osnovnim pogojem za genetsko populacijsko študijo (Tabela 2).

Tabela 2: Vrednosti χ^2 - testa za preverjanje odstopanj od Hardy-Weinbergovega načela (55)

<i>Genetska varianta</i>	<i>χ^2 - vrednost</i>	<i>p-vrednost</i>
<i>rs75781905</i>	1,076	0,299
<i>rs117543860</i>	0,138	0,710
<i>rs140142743</i>	opredeljena le pri eni osebi v našem vzorcu	
<i>rs7840156</i>	0,032	0,857

REZULTATI

Z analizo HRM smo v 5'UTR regiji gena *DEPTOR* v skupini 191 debelih otrok in mladostnikov opredelili prisotnost štirih različic posameznih nukleotidov (SNP), ki so že imeli dodeljeno kodo rs: rs75781905, rs117543860, rs140142743 in rs7840156.

Varianta rs75781905

Pri genetski varianti rs75781905 gre za spremembo c.-33 C>A, ki se nahaja v 5'UTR regiji gena *DEPTOR*. Varianta se pojavlja pri 9% zdrave evropske populacije (MAF) in 5% zdrave svetovne populacije (56). MAF variante rs75781905 je bil v naši analizirani populaciji 7,9% (Tabela 3).

Tabela 3: Povprečne vrednosti in standardni odkloni za ITM-SDS, HOMA-IR in WBISI pri nosilcih različnih genotipov variante c.-33 C>A (rs75781905)

	<i>Število posameznih genotipov</i>	<i>ITM-SDS povprečje</i>	<i>ITM-SDS standardni odklon</i>	<i>HOMA-IR povprečje</i>	<i>HOMA-IR standardni odklon</i>	<i>WBISI povprečje</i>	<i>WBISI standardni odklon</i>
CC	165	2,843	0,652	3,185	2,337	4,171	3,070
CA	24	2,669	0,739	2,929	2,597	4,924	3,015
AA	2	2,506	0,730	1,392	0,310	5,922	0,143

Statistična analiza genetske variante rs75781905 v preiskovanem vzorcu ni pokazala statistično značilne povezave z razvojem inzulinske rezistence in/ali debelosti.

Varianta rs117543860

Pri genetski varianti rs117543860 gre za spremembo c.-12 G>A, ki se nahaja v 5'UTR regiji gena *DEPTOR*. Varianta se pojavlja pri 2% zdrave evropske populacije in v enakem odstotku zdrave svetovne populacije (57). MAF variante rs117543860 je bil v naši populaciji 2,7% (Tabela 4).

Tabela 4: Povprečne vrednosti in standardni odkloni za ITM-SDS, HOMA-IR in WBISI pri nosilcih različnih genotipov variante c.-12 G>A (rs117543860)

	<i>Število posameznih genotipov</i>	<i>ITM-SDS povprečje</i>	<i>ITM-SDS standardni odklon</i>	<i>HOMA-IR povprečje</i>	<i>HOMA-IR standardni odklon</i>	<i>WBISI povprečje</i>	<i>WBISI standardni odklon</i>
GG	181	2,793	0,663	3,049	2,283	4,360	3,072
GA	10	3,265	0,515	4,662	3,258	2,920	2,463

Statistična analiza genetske variante rs117543860 v preiskovanem vzorcu ni pokazala statistično značilne povezave z razvojem inzulinske rezistence in/ali debelosti.

Varianta rs140142743

Pri genetski varianti rs140142743 gre za spremembo c.-36 C>T, ki se nahaja v 5'UTR regiji gena *DEPTOR*. Ta varianta je prisotna pri manj kot 1% zdrave evropske oziroma svetovne populacije (58). Genetska varianta rs140142743 je bila opredeljena le pri enem bolniku analizirane skupine in sicer v heterozigotni obliki.

Statistična analiza genetske variante rs140142743 v preiskovanem vzorcu ni pokazala statistično značilne povezave z razvojem inzulinske rezistence in/ali debelosti.

Varianta rs7840156

Pri genetski varianti rs7840156 gre za spremembo c.-143 T>C, ki se nahaja v TFBS regiji gena *DEPTOR*. Pojavnost tega polimorfizma v evropski zdravi populaciji je 32% , v svetovni zdravi populaciji pa 27% (59). MAF variante rs7840156 je bil v naši populaciji 32,7% (Tabela 5).

Tabela 5: Povprečne vrednosti in standardni odkloni za ITM-SDS, HOMA in ISI pri nosilcih različnih genotipov variante c.-143 T>C (rs7840156)

	<i>Število posameznih genotipov</i>	<i>ITM-SDS povprečje</i>	<i>ITM-SDS standardni odklon</i>	<i>HOMA-IR povprečje</i>	<i>HOMA-IR standardni odklon</i>	<i>WBISI povprečje</i>	<i>WBISI standardni odklon</i>
CC	21	2,732	0,663	2,625	3,042	5,247	2,632
CT	83	2,825	0,628	3,240	2,391	4,252	3,017
TT	87	2,831	0,702	3,155	2,152	4,082	3,170

Tabela 6: Delež posameznih genotipov (rs7840156) med skupinami preiskovancev z/brez inzulinske rezistence po kriterijih HOMA-IR in WBISI

	<i>IR po HOMA-IR</i>	<i>ni IR po HOMA-IR</i>	<i>IR po WBISI</i>	<i>ni IR po WBISI</i>
TT%	0.49	0.33	0.53	0.32
TC%	0.44	0.37	0.39	0.41
CC%	0.08	0.17	0.07	0.15

Ugotovili smo statistično značilno povezanost genetska variante rs7840156 z zmanjšanim tveganjem za razvoj inzulinske rezistence, določene s HOMA-IR in WBISI. Nosilci alela C so imeli razmerje obetov (OR) 0,63 (95% IZ = 0,41-0,87, p = 0,038) v skladu s HOMA-IR in 0,58 (95% IZ = 0,38-0,90, p = 0,018) po WBISI (Tabela 6, 7 in 8).

Tabela 7: Število posameznih alelov v skupini bolnikov z inzulinsko rezistenco in brez inzulinske rezistence

	<i>Inzulinska rezistenca</i>	<i>Ni inzulinske rezistence</i>
<i>Alel C</i>	44	85
<i>Alel T</i>	118	125

Tabela 8: Rezultati ANOVA pri opredelitvi razlik med vrednostmi HOMA-IR indeksa pri nosilcih različnih genotipov variante c.-143 T>C (rs7840156).

	<i>Povprečje</i> <i>1</i>	<i>Povprečje</i> <i>2</i>	<i>Razlika med</i> <i>povprečji</i>	<i>t-vrednost</i>	<i>p-vrednost</i>
HOMA-IR (CC) vs. HOMA-IR (TC)	2,734	3,113	-0,379	0,716	0,855
HOMA-IR (CC) vs. HOMA-IR (TT)	2,734	3,109	-0,375	0,713	0,855
HOMA-IR (TC) vs. HOMA-IR (TT)	3,113	3,109	0,004	0,012	0,990

Tabela 9: Rezultati ANOVA pri opredelitvi razlik med vrednostmi WBISI pri nosilcih različnih genotipov variante c.-143 T>C (rs7840156).

	<i>Povprečje</i> <i>1</i>	<i>Povprečje</i> <i>2</i>	<i>Razlika med</i> <i>povprečji</i>	<i>t-vrednost</i>	<i>p-vrednost</i>
WBISI (CC) vs. WBISI (TC)	5,375	4,359	1,016	1,688	0,458
WBISI (CC) vs. WBISI (TT)	5,375	4,747	0,628	1,050	0,739
WBISI (TC) vs. WBISI (TT)	4,359	4,747	-0,388	0,9778	0,769

Statistična analiza genetske variante rs7840156 v preiskovanem vzorcu ni pokazala statistično značilne povezave z razvojem debelosti (Tabela 10).

Tabela 10: Rezultati ANOVA pri opredelitvi razlik med ITM-SDS vrednostmi pri nosilcih različnih genotipov variante c.-143 T>C (rs7840156)

	<i>Povprečje 1</i>	<i>Povprečje 2</i>	<i>Razlika med povprečji</i>	<i>t-vrednost</i>	<i>p-vrednost</i>
ITM-SDS (CC) vs. ITM-SDS (TC)	2,718	2,825	-0,107	0,723	0,851
ITM-SDS (CC) vs. ITM-SDS (TT)	2,718	2,818	-0,010	0,675	0,851
ITM-SDS (TC) vs. ITM-SDS (TT)	2,825	2,818	0,007	0,078	0,938

RAZPRAVA

Z analizo prisotnosti genetskih variant v promotorski regiji gena *DEPTOR* in njihovo pojavnostjo v populaciji otrok in mladostnikov smo želeli posredno opredeliti njihovo vlogo pri razvoju debelosti in inzulinske rezistence. Vloga teh sprememb pri bolnikih do sedaj še ni bila ovrednotena.

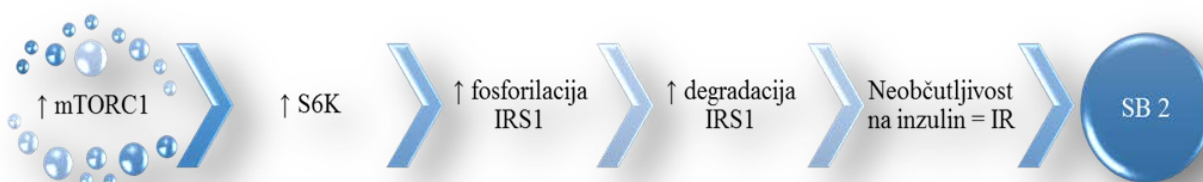
Nedavno je bila opredeljena vloga proteina DEPTOR v signalizaciji mTOR signalnih poti. DEPTOR se veže na mTOR in deluje kot endogeni zaviralec signalnih poti mTORC1 in mTORC2, ki regulirajo celično rast, razmnoževanje in preživetje (60). Nadaljne raziskave so potrdile vlogo proteina DEPTOR pri nastanku in razvoju debelosti. Prekomerno izražanje gena *DEPTOR* aktivira pro-adipogene dejavnike in promovira adipogenezo. Izražanje tega gena je povečano v populaciji debelih in pozitivno korelira s stopnjo debelosti. Izražanje tega gena spodbujajo glikokortikoidi in stresni hormoni (40). To je nakazovalo na možnost, da bi variante v genu *DEPTOR* lahko spremenile njegovo izražanje in s tem vplivale na razvoj debelosti pri človeku, vendar v okviru te raziskave v preiskovani skupini debelih otrok in mladostnikov nismo ugotovili statistično značilne povezave med prisotnimi genetskimi variantami v promotorskem področju gena *DEPTOR* in stopnjo debelosti. Na promotorsko področje smo se osredotočili, ker so na tem področju nahajajo številni regulatorni elementi genske transkripcije in posledično ima promotorsko področje ključno vlogo pri genskem izražanju. Stopnja izražanja gena *DEPTOR* je sicer direktno povezana s stopnjo debelosti, zato je malo verjetno, da se spremembe, ki bi lahko vplivale na razvoj debelosti, nahajajo v predelih gena, ki jih v okviru te raziskave nismo analizirali.

Prav tako smo ugotavljali povezavo med prisotnimi genetskimi variantami v promotorskem področju gena *DEPTOR* in razvojem inzulinske rezistence kot predstopnjo sladkorne bolezni. Pri genetskih variantah rs75781905, rs117543860, rs140142743 v 5'UTR področju gena *DEPTOR* statistično značilne povezave z razvojem inzulinske rezistence nismo dokazali.

Statistično značilno povezavo s tveganjem za razvoj inzulinske rezistence smo ugotovili le pri genetski varianti rs7840156. Gre za varianto, ki leži v TFBS regiji in je verjetno povezana z uravnavanjem izražanja gena *DEPTOR*. V preiskovani skupini je genetska varianta rs7840156

povezana z zmanjšanim tveganjem za razvoj inzulinske rezistence oz. deluje “zaščitno” pred nastankom inzulinske rezistence. Takšna povezava do sedaj v literaturi še ni bila opisana.

Omenjena genetska varianta verjetno poveča izražanje gena *DEPTOR*. Posledica povečanega izražanja je obsežnejše zaviranje mTOR signalne poti. Zmanjšana aktivacija signalne poti mTOR negativno vpliva na aktivacijo S6K, kar privede do zmanjšanega obsega fosforilacije in degradacije IRS1 ter s tem preprečuje inzulinsko rezistenco (Slika 4 in 5).



Slika 4: Prekomerno aktivirana mTOR aktivira S6K, kar poveča fosforilacijo in posledično degradacijo IRS1/2. To je molekularni mehanizem, pri katerem pride do nastanka inzulinske rezistence, kot predstopnje SB tipa 2 (33). Povzeto po: Blagosklonny MV. Rapamycin-induced glucose intolerance: hunger or starvation diabetes. *Cell Cycle* Georget Tex. 2011; 10:4217–24.



Slika 5: Predlagan mehanizem po katerem genetska varianta rs7840156 deluje “zaščitno” pred nastankom inzulinske rezistence.

Natančnejše razumevanje vpliva omenjene variante na raven izražanja gena *DEPTOR* in s tem na razvoj inzulinske rezistence bi lahko podale ekspresijske študije. Smiselno bi bilo opraviti

tkivno specifično ekspresijsko študijo na adipocitnih celičnih linijah, pri čemer bi uporabili reporterski gen, povezan z regulatorno regijo gena *DEPTOR*. Uporaba reporterskega gena bi omogočila merjenje količine nastalega produkta in posredno določitev stopnje izražanja gena *DEPTOR*. V tem primeru bi poleg ustrezne celične linije morali pripraviti tudi ustrezen genetski konstrukt, s katerim bi v celico vnesli ustrezno modificiran gen *DEPTOR*.

Za določanje vzorca ekspresije gena *DEPTOR* se lahko uporabijo tudi številne druge tehnike, kot so hibridizacijske tehnike, kvantitativni PCR itd. Tako bi lahko opredelili, v katerem tkivu in v kakšni količini nastaja mRNA tega gena in s tem določili njegovo stopnjo izražanja. Razlike v izražanju gena *DEPTOR* bi lahko določili tudi neposredno v adipocitnem tkivu skupin posameznikov z različnim genotipom za polimorfizem rs7840156.

V primeru, da bi ekspresijske študije potrdile, da alel C variante rs7840156 spremeni stopnjo izražanja gena *DEPTOR* in posledično deluje zaščitno pred nastankom inzulinske rezistence, bi bilo smiselno obravnavati ta gen kot morebitno farmacevtsko tarčo za zdravila za preprečevanje razvoja inzulinske rezistence in posledično sladkorne bolezni tipa 2. Če bi pri bolnikih, ki imajo večjo dovzetnost za razvoj IR in SB, kot so npr. prekomerno debeli, uvedli farmacevtski pripravek, ki bi povečal izražanje gena *DEPTOR* oz. bi vplival na signaliziranje mTOR signalne poti, bi morda zmanjšali tveganje za razvoj inzulinske rezistence in s tem tudi pojavnost sladkorne bolezni tipa 2 v tej rizični populaciji.

Stopnja izražanja gena *DEPTOR* bi bila lahko tudi laboratorijski prognostični označevalec, saj bi z merjenjem stopnje izražanja gena lahko ocenili tveganje, da bo prišlo do razvoja inzulinske rezistence, še preden se ta pojavi. Prednost takega laboratorijskega prognostičnega označevalca v primerjavi s trenutno upabljanimi HOMA-IR in ISI je ta, da stopnja izražanja gena ne poda le ocene trenutnega stanja pankreasa, ampak opredeli genetsko nagnjenost posameznika za razvoj IR v prihodnosti. To bi lahko pomembno vplivalo na odločitev glede preventivnega ukrepanja pri posamezniku.

Zaradi majhne frekvence opredeljenih genetskih variant v populaciji je v prihodnosti smiselno raziskavo razširiti in vključiti večje število preiskovancev. S tem bi povečali statistično moč, kar pomeni, da bi povečali verjetnost, da zavrnilo ničelno hipotezo. Analiza večjega števila preiskovancev bi omogočila, da s še večjo zanesljivostjo potrdimo naše ugotovitve.

V okviru te raziskave smo prvič opisali povezavo med genetsko varianto gena *DEPTOR* in razvojem inzulinske rezistence, ne pa z razvojem debelosti. To kaže na vlogo gena *DEPTOR* pri razvoju sladkorne bolezni tipa 2. S temi ugotovitvami odpiramo vrata za nadaljnja raziskovanja na tem področju in prispevamo k boljšemu razumevanju patofiziološkega ozadja sladkorne bolezni tipa 2.

ZAKLJUČEK

Rezultati naše raziskave prvič opisujejo povezavo variante gena *DEPTOR* z inzulinsko rezistenco pri otrocih in mladostnikih. To kaže na vlogo gena *DEPTOR* pri razvoju sladkorne bolezni tipa 2.

- Genetska varianta rs7840156 je statistično značilno povezana z zmanjšanim tveganjem za razvoj inzulinske rezistence (HOMA-IR: OR= 0,63 ; p = 0,038 ; WBISI: OR= 0,58 ; p = 0,018). Otroci in mladostniki, ki so nosilci genetske variante rs7840156 v TFBS regiji gena *DEPTOR*, imajo manjše tveganje za razvoj IR v primerjavi s tistimi, ki imajo enak SDS-ITM, vendar niso nosilci te genetske variante.
- Naša raziskava ni pokazala statistično značilne povezave med genetsko varianto rs7840156 in razvojem debelosti.
- Naša raziskava ni pokazala statistično značilne povezave med genetskimi variantami rs75781905, rs117543860, rs140142743 in tveganjem za razvoj debelosti in/ali inzulinske rezistence.

Za dokončno opredelitev vpliva genetske variante rs7840156 na izražanje gena *DEPTOR* in s tem tudi na mehanizem delovanja proteina DEPTOR pri inzulinski rezistenci, bi bilo potrebno izvesti dodatne (tkivno specifične) ekspresijske študije.

Zaradi majhne frekvence opredeljenih genetskih variant v populaciji je v prihodnosti smiselno raziskavo razširiti in vključiti večje število preiskovancev

Literatura

1. Winter Y, Sankowski R, Back T. Genetic determinants of obesity and related vascular diseases. *Vitam Horm.* 2013;91:29–48.
2. Alwan AD, Galea G, Stuckler D. Development at risk: addressing noncommunicable diseases at the United Nations high-level meeting. *Bull World Health Organ.* 2011; 89:546–546A.
3. Flegal KM, Graubard BI, Williamson DF, Gail MH. Cause-specific excess deaths associated with underweight, overweight, and obesity. *JAMA J Am Med Assoc.* 2007; 298:2028–37.
4. Drummond EM, Gibney ER. Epigenetic regulation in obesity. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2013; 16:392–7.
5. Garver WS. Gene-diet interactions in childhood obesity. *Curr Genomics.* 2011; 12:180–9.
6. Tounian P. Programming towards childhood obesity. *Ann Nutr Metab.* 2011; 58:30–41.
7. Lu Y, Loos RJ. Obesity genomics: assessing the transferability of susceptibility loci across diverse populations. *Genome Med.* 2013; 5:55.
8. Lebovitz HE. Insulin resistance: definition and consequences. *Exp Clin Endocrinol Diabetes Off J Ger Soc Endocrinol Ger Diabetes Assoc.* 2001; 109:S135–148.
9. Saltiel AR, Kahn CR. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature.* 2001; 414:799–806.
10. Chang L, Chiang S-H, Saltiel AR. Insulin signaling and the regulation of glucose transport. *Mol Med Camb Mass.* 2004; 10:65–71.
11. Watson RT, Kanzaki M, Pessin JE. Regulated membrane trafficking of the insulin-responsive glucose transporter 4 in adipocytes. *Endocr Rev.* 2004; 25:177–204.
12. Shepherd PR. Mechanisms regulating phosphoinositide 3-kinase signalling in insulin-sensitive tissues. *Acta Physiol Scand.* 2005; 183:3–12.
13. Zoncu R, Efeyan A, Sabatini DM. mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2011; 12:21–35.

14. Xie J, Herbert TP. The role of mammalian target of rapamycin (mTOR) in the regulation of pancreatic β -cell mass: implications in the development of type-2 diabetes. *Cell Mol Life Sci CMLS*. 2012; 69:1289–304.
15. Oh WJ, Jacinto E. mTOR complex 2 signaling and functions. *Cell Cycle Georget Tex*. 2011; 10:2305–16.
16. Cornu M, Albert V, Hall MN. mTOR in aging, metabolism, and cancer. *Curr Opin Genet Dev*. 2013; 23:53–62.
17. Hara K, Maruki Y, Long X, Yoshino K, Oshiro N, Hidayat S, et al. Raptor, a binding partner of target of rapamycin (TOR), mediates TOR action. *Cell*. 2002; 110:177–89.
18. Pearce LR, Huang X, Boudeau J, Pawłowski R, Wullschleger S, Deak M, et al. Identification of Protor as a novel Rictor-binding component of mTOR complex-2. *Biochem J*. 2007; 405:513–22.
19. García-Martínez JM, Alessi DR. mTOR complex 2 (mTORC2) controls hydrophobic motif phosphorylation and activation of serum- and glucocorticoid-induced protein kinase 1 (SGK1). *Biochem J*. 2008; 416:375–85.
20. Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science*. 2005; 307:1098–101.
21. Sancak Y, Peterson TR, Shaul YD, Lindquist RA, Thoreen CC, Bar-Peled L, et al. The Rag GTPases bind raptor and mediate amino acid signaling to mTORC1. *Science*. 2008; 320:1496–501.
22. Sancak Y, Thoreen CC, Peterson TR, Lindquist RA, Kang SA, Spooner E, et al. PRAS40 is an insulin-regulated inhibitor of the mTORC1 protein kinase. *Mol Cell*. 2007; 25:903–15.
23. Dazert E, Hall MN. mTOR signaling in disease. *Curr Opin Cell Biol*. 2011; 23:744–55.
24. Yecies JL, Manning BD. mTOR links oncogenic signaling to tumor cell metabolism. *J Mol Med Berl Ger*. 2011; 89:221–8.
25. Laplante M, Sabatini DM. mTOR signaling in growth control and disease. *Cell*. 2012; 149:274–93.
26. Powers RW 3rd, Kaeberlein M, Caldwell SD, Kennedy BK, Fields S. Extension of chronological life span in yeast by decreased TOR pathway signaling. *Genes Dev*. 2006; 20:174–84.

27. Robida-Stubbs S, Glover-Cutter K, Lamming DW, Mizunuma M, Narasimhan SD, Neumann-Haefelin E, et al. TOR signaling and rapamycin influence longevity by regulating SKN-1/Nrf and DAF-16/FoxO. *Cell Metab.* 2012; 15:713–24.
28. Selman C, Tullet JMA, Wieser D, Irvine E, Lingard SJ, Choudhury AI, et al. Ribosomal protein S6 kinase 1 signaling regulates mammalian life span. *Science.* 2009; 326:140–4.
29. Zid BM, Rogers AN, Katewa SD, Vargas MA, Kolipinski MC, Lu TA, et al. 4E-BP extends lifespan upon dietary restriction by enhancing mitochondrial activity in *Drosophila*. *Cell.* 2009; 139:149–60.
30. Hagiwara A, Cornu M, Cybulski N, Polak P, Betz C, Trapani F, et al. Hepatic mTORC2 activates glycolysis and lipogenesis through Akt, glucokinase, and SREBP1c. *Cell Metab.* 2012; 15:725–38.
31. Bentzinger CF, Lin S, Romanino K, Castets P, Guridi M, Summermatter S, et al. Differential response of skeletal muscles to mTORC1 signaling during atrophy and hypertrophy. *Skelet Muscle.* 2013; 3:6.
32. Kim JE, Chen J. regulation of peroxisome proliferator-activated receptor- γ activity by mammalian target of rapamycin and amino acids in adipogenesis. *Diabetes.* 2004; 53:2748–56.
33. Blagosklonny MV. Rapamycin-induced glucose intolerance: hunger or starvation diabetes. *Cell Cycle Georget Tex.* 2011; 10:4217–24.
34. Blagosklonny MV. TOR-centric view on insulin resistance and diabetic complications: perspective for endocrinologists and gerontologists. *Cell Death Dis.* 2013; 4:e964.
35. Korshennikova E, van der Zon GCM, Voshol PJ, Janssen GM, Havekes LM, Grefhorst A, et al. Sustained activation of the mammalian target of rapamycin nutrient sensing pathway is associated with hepatic insulin resistance, but not with steatosis, in mice. *Diabetologia.* 2006; 49:3049–57.
36. Le Bacquer O, Queniat G, Gmyr V, Kerr-Conte J, Lefebvre B, Pattou F. mTORC1 and mTORC2 regulate insulin secretion through Akt in INS-1 cells. *J Endocrinol.* 2013; 216:21–9.
37. Krebs M, Brunmair B, Brehm A, Artwohl M, Szendroedi J, Nowotny P, et al. The Mammalian target of rapamycin pathway regulates nutrient-sensitive glucose uptake in man. *Diabetes.* 2007; 56:1600–7.

38. Fraenkel M, Ketzinil-Gilad M, Ariav Y, Pappo O, Karaca M, Castel J, et al. mTOR inhibition by rapamycin prevents beta-cell adaptation to hyperglycemia and exacerbates the metabolic state in type 2 diabetes. *Diabetes*. 2008; 57:945–57.
39. Zhao Y, Sun Y. Targeting the mTOR-DEPTOR pathway by CRL E3 ubiquitin ligases: therapeutic application. *Neoplasia N Y N*. 2012; 14:360–7.
40. Laplante M, Horvat S, Festuccia WT, Birsoy K, Prevorsek Z, Efeyan A, et al. DEPTOR cell-autonomously promotes adipogenesis, and its expression is associated with obesity. *Cell Metab*. 2012; 16:202–12.
41. Zhao Y, Xiong X, Sun Y. DEPTOR, an mTOR inhibitor, is a physiological substrate of SCF(β TrCP) E3 ubiquitin ligase and regulates survival and autophagy. *Mol Cell*. 2011; 44:304–16.
42. Davies J, Zachariades E, Rogers-Broadway K-R, Karteris E. Elucidating the role of DEPTOR in Alzheimer's disease. *Int J Mol Med*. 2014 Aug 12;
43. Lai E-Y, Chen Z-G, Zhou X, Fan X-R, Wang H, Lai P-L, et al. DEPTOR expression negatively correlates with mTORC1 activity and tumor progression in colorectal cancer. *Asian Pac J Cancer Prev APJCP*. 2014; 15:4589–94.
44. Bruneau S, Nakayama H, Woda CB, Flynn EA, Briscoe DM. DEPTOR regulates vascular endothelial cell activation and proinflammatory and angiogenic responses. *Blood*. 2013; 122:1833–42.
45. Mparmpakas D, Zachariades E, Goumenou A, Gidron Y, Karteris E. Placental DEPTOR as a stress sensor during pregnancy. *Clin Sci Lond Engl 1979*. 2012; 122:349–59.
46. <https://secure.ngri.org.uk/SNPCheck/>. (dostopano: 22.7.2014)
47. Vossen RHAM, Aten E, Roos A, den Dunnen JT. High-resolution melting analysis (HRMA): more than just sequence variant screening. *Hum Mutat*. 2009; 30:860–6.
48. www.blast.ncbi.nlm.nih.gov. (dostopano: 22.7.2014)
49. www.ensembl.org. (dostopano: 22.7.2014)
50. Utzschneider KM, Prigeon RL, Faulenbach MV, Tong J, Carr DB, Boyko EJ, et al. Oral disposition index predicts the development of future diabetes above and beyond fasting and 2-h glucose levels. *Diabetes Care*. 2009; 32:335–41.
51. <http://mmatsuda.diabetes-smc.jp/MIndex.html>. (dostopano: 22.7.2014)

52. Cole TJ, Bellizzi MC, Flegal KM, Dietz WH. Establishing a standard definition for child overweight and obesity worldwide: international survey. *BMJ*. 2000; 320:1240–3.
53. Szumilas M. Explaining Odds Ratios. *J Can Acad Child Adolesc Psychiatry*. 2010; 19:227–9.
54. Crow JF. Hardy, Weinberg and language impediments. *Genetics*. 1999; 152:821–5.
55. www.coursehero.com/file/8442058/Court-lab-HW-calculator-1/ (dostopano: 22.7.2014)
56. www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=75781905. (dostopano: 22.7.2014)
57. www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=117543860. (dostopano: 22.7.2014)
58. www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=140142743. (dostopano: 22.7.2014)
59. www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=7840156. (dostopano: 22.7.2014)
60. Peterson TR, Laplante M, Thoreen CC, Sancak Y, Kang SA, Kuehl WM, et al. DEPTOR is an mTOR inhibitor frequently overexpressed in multiple myeloma cells and required for their survival. *Cell*. 2009; 137:873–86.