

Predlog projekta

Ta trenutek bi naj bilo svetovno okoli 200 milijonov bolnikov s sladkorno boleznijo tipa 2 (SB2), pri kateri ima večina (80-90% bolnikov) metabolni sindrom (hiperglikemija, trebušna debelost, aterogena dislipidemija in hipertenzija). Glavno vlogo pri razvoju bolezni imata zmanjšana odzivnost tarčnih celic na inzulin in okvarjeno izločanje inzulina. Večina teh bolnikov v končni fazi potrebuje inzulinsko terapijo. Za razliko od SB2 so bolniki s sladkorno boleznijo tip 1 (SB1) doživljenjsko odvisni od inzulina dovajanega z inzulinsko črpalko.

Genetsko kodirani nanodelci (Stanley & Friedman, 2015), razcepljene protein kinaze (Camacho-Soto, 2014), CC proteini (Shakhawat & Ghosh, 2011) ter kontrolirana agregacija eksocitozi namenjenih proteinov (Rivera & Clackson, 2000) razviti pri zadnjih raziskavah na področju sintezne biologije omogočajo hitro spreminjanje aktivnosti in vivo signalizacijskega procesa. V pravilno organizirano mrežo bi razcepljeni proteini razviti v sklopu različnih študij lahko predstavljali podlago za razvoj nadzorovane sintezne negativne povratne zanke. V človeškem organizmu ima vrsta negativnih povratnih zvez ključno vlogo pri vzdrževanju homeostaze notranjega okolja, njena porušitev pa se izrazi v patološkem stanju. Moj predlog je zasnova sintezno zasnovane hitro odzivne negativne povratne zanke, sposobne zaznave spremembe, odločanja kaj storiti glede na dane pogoje, ki vladajo v organizmu in izvedbe za dan trenutek primernega odziva. Predlagam gradnjo na ideji: in vivo hitro odzivni inzulinski črpalki prikazani na Sliki 1.

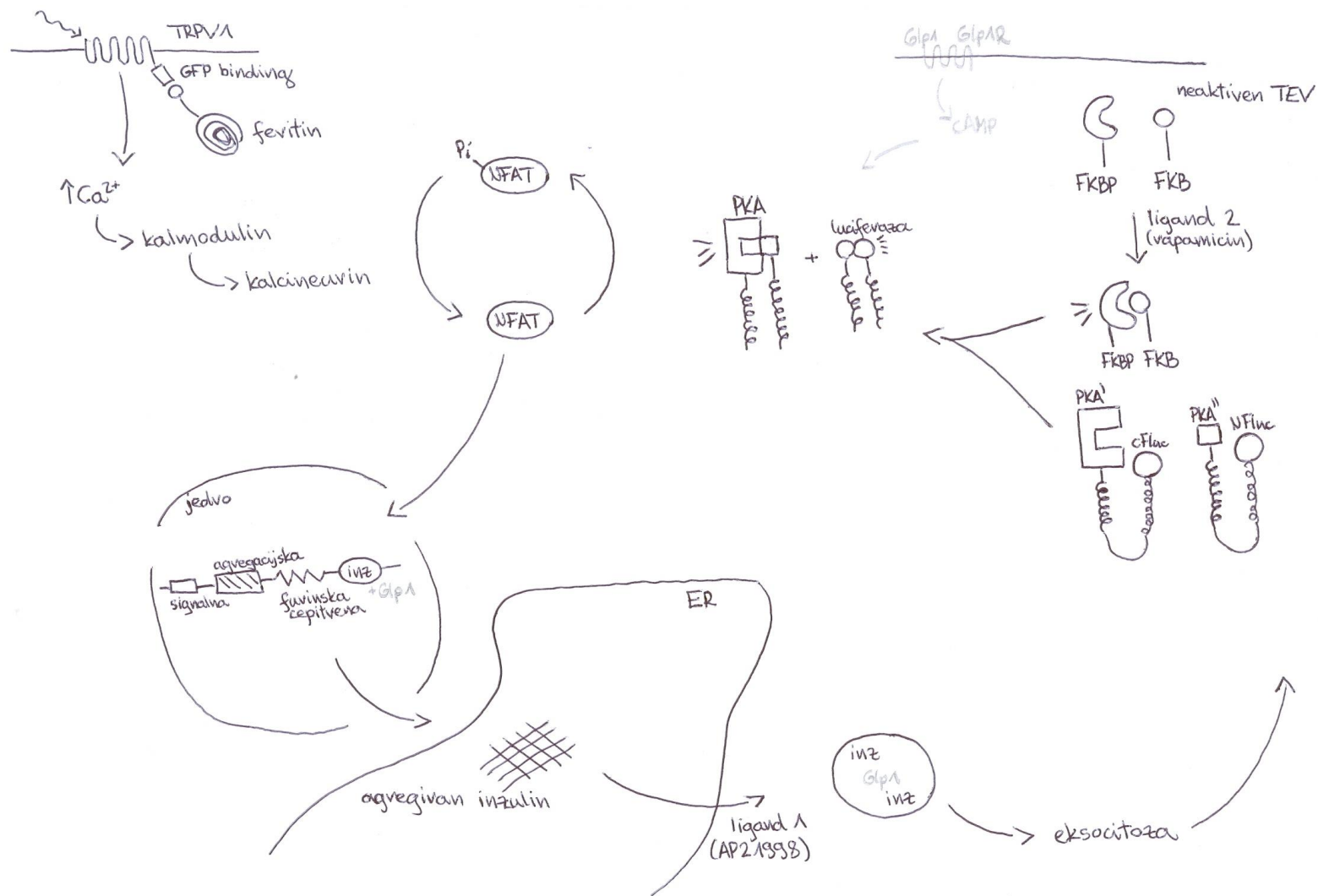
Glavni problem svetlobe je velika absorpcija v tkivih in zato slabo prodiranje v globlja tkiva. Ultrazvok ima dobro prodornost v globoka tkiva, vendar njegova slabost možen pojav kavitacij, prekinitev integritete celične membrane in tako potencialna nevarnost za propad tkiva. Do danes nisem zasledil podatka o negativnih vplivih elektromagnetnega polja na človeški organizem, zato sem za senzor v naši negativni povratni zanki izbral na elektromagnetno indukcijo občutljiv TRPV1-GFP-feritin sestavljen receptor. Predpostavljam, da bi nenehna izpostavljenost telesa elektromagnetnim valovom v naši okolici lahko zadostovala za zadostno produkcijo inzulina v in vivo inzulinski črpalki. Med obdobji stradanja med obroki bi bilo nastalemu inzulinu preprečeno sproščanje v ekstracelular z agregacijo v ER, saj bi inzulin pripel v rekombinantni protein FKBP(36Phe->Met)-furinska cepitvena-inzulin in na ta način bi bil preprečen pojav za sladkornega bolnika smrtno nevaren akutni zaplet s hipoglikemijo. Zraven inzulina bi lahko razmislili tudi o dodatni vključitvi GLP1, ki v zadnjem času izkazuje pozitivne terapevtske učinke. Z obrokom bi moral pacient zaužiti določeno količino liganda AP21998, ki bi sprožil deagregacijo inzulina in njegovo eksocitozo v kri. Na ta način bi znižali z zaužitjem obroka povišan nivo glukoze. Tudi na tej točki je možnost pojava hipoglikemije zaradi prevelike količine izločenega inzulina, kar bi sicer lahko do določene mere uravnavali s prilagajanjem količine zaužitega AP21998 glede na glikemični indeks obroka. Kot povratni signal negativne povratne zveze bi za prekinitev sprožilnega signala z zaužitjem rapamicina aktivirali razcepljen TEV-FKBP/FKB proteinski sistem, ta pa bi sprožil aktivacijo razcepljene PKA-CC sistema. PKA bi kot eksportna kinaza fosforilirala NFAT in prekinila začetni signal za sintezo inzulina.

Glavna prednost sistema sintezno biološke inzulinske črpalke v obliki podkožno nameščenega depoja celic glede na terapijo po trenutni medicinski doktrini bi bilo predvsem, da pri SB2 bolnikih ne bi bilo več potrebe po vsakodnevni aplikaciji inzulina v podkožje, SB1 pa več ne bi potrebovali inzulinske črpalke in potencialno zmanjšali možnost infekcij na mestu prekinjenega kožnega pokrova. V obeh skupinah bi zaradi dovajanja inzulina po potrebi glede na plazemski nivo glukoze upočasnili razvoj kroničnih zapletov sladkorne bolezni, ki trenutno v svetu predstavljajo glavni vzrok smrti sladkornih bolnikov.

Kot kritične točke, na katerih bi pri razvoju mojega predloga znale nastati težave, bi izpostavil štiri stvari. Prvič, sklopitev NFAT z ekspresijo gena s proinzulinom povezanim z agregacijsko domeno, predvsem kakšna bi bila učinkovitost prepisovanja in procesiranja ali bi bila sploh zadovoljiva, saj že avtorji v svoji objavi navajajo zgolj 50% učinkovitost. Drugič, v nobenem članku nisem zasledil konjugacije razcepljene-PKA s CC in hkrati še vezavo razcepljene-luciferaze, tako da obstaja nevarnost, da sistem v takšni zamisli ne bi deloval. Tretjič, pri izvedbi bi znal biti problem kopičenje velike količine za pogon signalne poti dizajniranih proteinov v celicah, kar bi lahko aktiviralo apoptozo. To težavo bi lahko odpravili s prikloplitvijo razcepljenega proteinskega sistema rekrutiranja ubikvitin ligaze na način kot v objavi poročja Wandless, 2014. Četrtič, delovanje črpalke bi bilo odvisno od p. o. aplikacije snovi kot je rapamicin, ki deluje kot imunosupresant, ima pa tudi antiproliferativni učinek. Sicer se uporablja za preprečevanje zavrnitve transplantiranih organov, vendar imunosupresija pomeni povečano tveganje za razvoj oportunističnih okužb ter razvoj raka pri bolniku. Tudi sama p. o. aplikacija ima v tem primeru slabost, saj bi bilo potrebno upoštevati procese absorpcije in distribucije liganda, kar bi zahtevalo veliko dela za primerno časovno uskladitev procesov.

Glede na vse sem prepričan, da je zasnova moje ideje daleč od optimalne za implementacijo v človeški organizem. Menim, da bi bilo z njo mogoče nakazati princip za razvoj neinvazivnih, pametnih, visoko učinkovitih in za bolnika malo obremenjujočih oblik terapije nenalezljivih kroničnih bolezni (s ponovnim vzpostavljanjem porušeni negativnih povratnih zank z uporabo hitro odzivnih razcepljenih proteinov) po principu z razcepljenimi proteini ustvarjene negativne povratne zanka v dani signalni kaskadi. Z dodatkom ustreznih CC-razcepljen protein sistemov bi lahko konstruirali sistem sposoben integracije signalov in odločanja na molekularni/supramolekularni ravni.

Dokaz uspešnosti in učinkovitosti hitrega odzivanja in vivo inzulinske črpalke na celični liniji bi zagotovo na področju sintezne biologije odprla področje ciljanega proženja hitrega in kratkotrajnega odziva, česar modifikacije na nivoju vplivanja na ekspresijo genov niso bile zmožne. Podala bi idejo novega pristopa reševanja vzdrževanja porušene homeostaze z uporabo sintezno zasnovane hitro odzivne negativne povratne zanke, sposobne zaznave spremembe, odločanja kaj storiti glede na dane pogoje, ki vladajo v organizmu in izvedbe za dan trenutek primerne odziva.



Slika 1 - Shema ideje

Tehnična izvedba

Grobo opisano bi za pot do končnega rezultata bilo potrebno narediti:

1. Dizajn fuzijskih proteinov ter dizajn oligonukleotidnih začetnikov
 - potrebni konstrukti:
 - 5'- GFP α -TRPV1-2A-GFP-feritin-3';
 - 5'-signalna-agregacijska-furinska cepitvena-proinzulin-3'; tukaj bi lahko poskusili tudi z GLP1 ali amilinom
 - 5'-FRB-linker-N-TEV(1-118)-3'; 5'-FKBP-linker-C-TEV(119-219)-3'; linker=(GGGGS)₂
 - 5'-PKA(1-192)-25AK loop-CC domena-C-Fluc-3'; 5'-N-Fluc-CC domena - 25AK loop - PKA(193-351)-3'
2. PCR-ligacija, da bi pridobili potrebne rekombinante gene
3. Restrikcija s PCR pomnoženih genov in ligacija v plazmidni vektor; predlagal bi uporabo inducibilnega sistema npr.: Tet3G, katerega aktivnost bi lahko umetno nadzorovali z dodajanjem liganda kot je doksiciklin
4. Pridobitev zadostne količine plazmida za transfekcijo (pomnoževanje ligiranega plazmida v kompetentnih celicah)
5. Transfekcija v HEK celice, za začetek bi mogoče poskusili z lipofektaminom, sicer pa bi izvedli retovirusno transfekcijo
 - v tej stopnji bi bilo potrebno razmisliti o potrebnih kontrolah; za pokazati princip bi najbrž bilo dovolj transficirati troje celic: geni prvih dveh konstruktov v ene, drugih dveh v druge in potem še celice z vsemi konstrukti
6. Selekcija transfeciranih celic
7. Izvedba eksperimentov na celičnih linijah:
 - Izražanje posamezne komponente: prisotnost posameznega proteina bi lahko prikazali z WB; lokalizacijo membranskega sensorja si bi lahko ogledali s fluorescenčno mikroskopijo, količino nastale PKA pa ocenili z merjenjem luciferazne aktivnosti, lokalizacijo inzulinskih agregatov pa prikazali z imunohistokemijo
 - Izločanje inzulina glede na količino sprožitvenega signala bi lahko količinsko pomerili s komercialno dostopnim ELISA kitom in izvedli WB (western blot); procesiranje inzulina bi lahko okvirno ocenili iz razmerja koncentracij C-peptid : inzulin; pravilno konformacijo samega proteina po sekreciji pa bi lahko pomerili s CD (circular dichroism)
 - Optimizacija stimulacije eksocitoze inzulina z dodajanjem AP21998: celice stimulirane različne časovne intervale z različnimi količinami liganda in potem bi z ELISA določali količino izločenega inzulina
 - Optimizacija aktivacije PKA-CC sistema za prekinitev sinteze inzulina: dodajal bi pri dani količini AP21998 različne količine eritromicina v različnih časovnih intervalih in poiskali točko, v kateri bi popolnoma inhibirali izločanje inzulina
 - Optimizacija sistema eksocitoze in prekinitve sinteze inzulina za vzdrževanje normalnega nivoja glukoze v supernatantu

Osebna predstavitev

Trenutno sem študent tretjega letnika medicine na Medicinski fakulteti Univerze v Ljubljani. Ko se uzrem nazaj, sem hvaležen svojim srednješolskim učiteljem kemije, biologije in fizike na II. gimnaziji Maribor, ki so me navdušili nad naravoslovjem, mi pomagali vzpostaviti stik z mentorji ter mi omogočili spoznati čar raziskovalnega dela. Najprej sem z Rokom Tkavcem proučeval z molekularnimi metodami kroženje dušika v petoli. Ko je odšel v tujino, sem vstopil v stik z Aljošo Košakom in sva sodelovala dokler nisem odšel v Ljubljano. V 4. letniku srednje šole sem z raziskavo supereparamagnetnih maghemitnih nanodelcev zmagal na državnem srečanju mladih raziskovalcev na področju kemija in kemijska tehnologija. Istega leta sem se kot član slovenske ekipe udeležil 45. Mednarodne kemijske olimpijade v Moskvi. Sedaj v Ljubljani pa delam z Ivo na inflamasonu.

Ravno želja po povezovanju znanj z različnih področij in navdušenost tako nad kemijo, biologijo in fiziko je botrovala, da se nisem mogel odločiti za eno in sem za študij izbral medicino. Takrat sem bil prepričan, da bom tukaj dobil najširše znanje in bom nekoč v svoji profesionalni karieri predstavljal most med potrebami bolnika ter razvojem stvari v laboratoriju. Nekoč bi želel ravno takšne stvari kot se in se bodo razvijale, bomo razvijali v sklopu KI implementirati v zdravljenje bolnika bodisi kot pomočnik pri razvoju, bodisi kot sodelavec pri kliničnem poskusu.

Raziskovanje ima zame poseben čar, kjer je možno preizkusiti svoje ideje, kar je v medicini veliko težje, tako da sem prepričan, da dokler bom v Ljubljani, bom zagotovo del svojega časa posvetil raziskavam. Nasploh mi veliko pomeni imeti širši pregled nad določenim področjem in pri tem biti kar se da natančen in izčrpen, da bi na koncu stvar izpadla perfektno. Prav zato da bo zagotovo narejeno popolno, pogosto raje naredim stvar sam, kot da bi jo prepustil v dokončanje sošolcu. Morda je prav obsežnost projekta iGEM in sodelovanje najbolj motiviranih, natančnih in inovativnih študentov mesto, kjer spoznam, da vsega preprosto ne zmoreš sam. Ampak lahko zanesljivi kolegi z dodatkom njihovih idej ustvarijo popolnejšo stvar, kot bi jo sicer uspel skonstruirati sam.

Glede na izkušnje povezovanja zastavljenih visokih standardov pri svojih študijskih obveznostih na medicini (povprečna ocena 9.89) in raziskovalnega dela, lahko rečem, da bi lahko začel z gojenjem celic (za pripravljanje konstruktov in kloniranje, ki ne terja vsakodnevne, po uri določene skrbi, bi lahko kot je bilo sprva napisano že od 1.5.) drugo polovico junija, ko bom pod streho pospravil še svoj zadnji izpit. Potem bi se lahko 100% posvetil delu v laboratoriju in razvoju skupnega projekta. Glede nadaljnjega sodelovanja pa le to, da ne glede na kakršnikoli izid bom zagotovo tudi v prihodnje sodeloval pri raziskovanju na KI z Ivo. Seveda sem zraven inflamasona pripravljen tudi pomagati pri dokončanju post-iGEM projekta.