

**“ΣΥΣΤΗΜΙΚΗ & ΣΥΝΘΕΤΙΚΗ  
ΒΙΟΛΟΓΙΑ: Σύγχρονες προσεγγίσεις στη  
Βιολογική, Βιοϊατρική και  
Βιοτεχνολογική Έρευνα ”**

**Φραγκίσκος Ν. Κολίσης**

Δ/ΝΤΗΣ ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟΥ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ  
ΕΡΕΥΝΩΝ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ, ΕΙΕ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ, ΕΜΠ

**Εθνικό Μετσόβειο Πολυτεχνείο**  
*Ηρώων Πολυτεχνείου 5,*  
*Πολυτεχνειούπολη, Ζωγράφου, Αθήνα*



**Ινστιτούτο Βιολογικών Ερευνών & Βιοτεχνολογίας (IBEB)**

*Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών (ΕΙΕ)*  
*Λεωφ. Βασ. Κωνσταντίνου 48, Αθήνα*

# **ΕΙΣΑΓΩΓΗ: ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ**

# First Genome Sequenced 1995

25 thousand sequences

$6.25 \times 10^8$  pair wise comparisons





## The Dog Genome: Survey Sequencing and Comparative Analysis

Ewen F. Kirkness,<sup>1</sup> Vineet Bafna,<sup>2\*</sup> Aaron L. Halpern,<sup>2\*</sup> Samuel Levy,<sup>2\*</sup> Karin Remington,<sup>2\*</sup> Douglas B. Rusch,<sup>2\*</sup> Arthur L. Delcher,<sup>1</sup> Mihai Pop,<sup>1</sup> Wei Wang,<sup>1</sup> Claire M. Fraser,<sup>1</sup> J. Craig Venter<sup>2</sup>

A survey of the dog genome sequence (6.22 million sequence reads, 25% of genome coverage) demonstrates that dogs share a common ancestor with humans and other mammals.

## A Comparison of Whole-Genome Shotgun-Derived Mouse Chromosome 16 and the Human Genome

Richard J. Mural,<sup>1\*</sup> Mark D. Adams,<sup>1</sup> Eugene W. Myers,<sup>1</sup> Hamilton O. Smith,<sup>1</sup> George L. Caboy Miklos,<sup>2</sup> ...

Mouse chromosome 16 is a highly repetitive region of the genome. We have sequenced the mouse chromosome 16 region (approximately 150 Mb) using whole-genome shotgun sequencing. This region is highly repetitive, with approximately 50% of the sequence being composed of repetitive elements. The mouse chromosome 16 region is highly similar to the human genome, with approximately 90% of the sequence being shared with the human genome. This suggests that the mouse chromosome 16 region is a highly conserved region of the genome.

## Science

4 October 2002 Vol. 298 No. 5591 Pages 1-310 \$9

### THE MOSQUITO GENOME

#### Anopheles gambiae

Hydrogen N delivers  
Arctic ice flow reversals  
Antigen presentation: A customizing protease

AMERICAN ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF SCIENCE

## Science

16 February 2001 Vol. 291 No. 5507 Pages 1145-1434 \$9

### modium genomics

Genomics and proteomics pave way for controlling malaria

hydrogen N delivers  
Arctic ice flow reversals  
Antigen presentation: A customizing protease

naturejobs genomics & parasitology

## Science

16 February 2001 Vol. 291 No. 5507 Pages 1145-1434 \$9

### THE HUMAN GENOME

AMERICAN ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF SCIENCE

## Science

10 March 2000 Vol. 287 No. 5449 Pages 1-1876 \$9

### Sequence Analysis of the Malaria Parasite Plasmodium falciparum

Sequence Analysis of the Malaria Parasite Plasmodium falciparum

Sequence Analysis of the Malaria Parasite Plasmodium falciparum

# *Τι είναι το Human Genome Project?*

- Το ανθρώπινο γονιδίωμα περιέχει περίπου 3 δις ζευγάρια βάσεων (A,T, C, G) που βρίσκονται στα 23 ζευγάρια χρωματοσωμάτων στο πυρήνα του κυττάρου. Κάθε χρωματόσωμα περιέχει εκατοντάδες έως χιλιάδες γονιδίων που μεταφέρουν τις οδηγίες για τη σύνθεση των πρωτεϊνών. Το ανθρώπινο γονιδίωμα υπολογίζεται ότι έχει **30 000 γονίδια**.
- Καθορισμός αλληλουχίας είναι ο προσδιορισμός της ακριβούς σειράς των βάσεων.
- Χαρτογράφηση είναι ο ακριβής προσδιορισμός της θέσης του κάθε γονιδίου στο χρωματόσωμα.
- Δεν είναι γνωστοί οι εθελοντές που έδωσαν τα δείγματα DNA για την αλληλούχηση. Έδωσαν 5-10 φορές περισσότεροι από τα δείγματα που τελικά επελέγησαν και όλες οι ετικέτες απομακρύνθηκαν πριν από την επιλογή.
- Στις 23 Απριλίου του 2003 ανακοινώθηκε η τελική έκδοση η οποία είναι ελεύθερη για το κοινό και παρέχει πληροφορίες απαραίτητες για την έρευνα (καλύπτεται το 99% του γενώματος, υπάρχουν λιγότερα από 400 κενά και έχει ακρίβεια 1 λάθος ανά 10 000 βάσεις)

# The International Human Genome Sequencing Consortium

- **The Whitehead Institute/MIT Center for Genome Research, Cambridge, Mass., U.S.**
- **The Wellcome Trust Sanger Institute, The Wellcome Trust Genome Campus, Hinxton, Cambridgeshire, U. K.**
- **Washington University School of Medicine Genome Sequencing Center, St. Louis, Mo., U.S.**
- **United States DOE Joint Genome Institute, Walnut Creek, Calif., U.S.**
- **Baylor College of Medicine Human Genome Sequencing Center, Department of Molecular and Human Genetics, Houston, Tex., U.S.**
- **RIKEN Genomic Sciences Center, Yokohama, Japan**
- **Genoscope and CNRS UMR-8030, Evry, France**
- **GTC Sequencing Center, Genome Therapeutics Corporation, Waltham, Mass., USA**
- **Department of Genome Analysis, Institute of Molecular Biotechnology, Jena, Germany**
- **Beijing Genomics Institute/Human Genome Center, Institute of Genetics, Chinese Academy of Sciences, Beijing, China**
- **Multimegabase Sequencing Center, The Institute for Systems Biology, Seattle, Wash.**
- **Stanford Genome Technology Center, Stanford, Calif., U.S.**
- **Stanford Human Genome Center and Department of Genetics, Stanford University School of Medicine, Stanford, Calif., U.S.**
- **University of Washington Genome Center, Seattle, Wash., U.S.**
- **Department of Molecular Biology, Keio University School of Medicine, Tokyo, Japan**
- **University of Texas Southwestern Medical Center at Dallas, Dallas, Tex., U.S.**
- **University of Oklahoma's Advanced Center for Genome Technology, Dept. of Chemistry and Biochemistry, University of Oklahoma, Norman, Okla., U.S.**
- **Max Planck Institute for Molecular Genetics, Berlin, Germany**
- **Cold Spring Harbor Laboratory, Lita Annenberg Hazen Genome Center, Cold Spring Harbor, N.Y., U.S.**
- **GBF - German Research Centre for Biotechnology, Braunschweig, Germany**

# Βιολογία των Συστημάτων

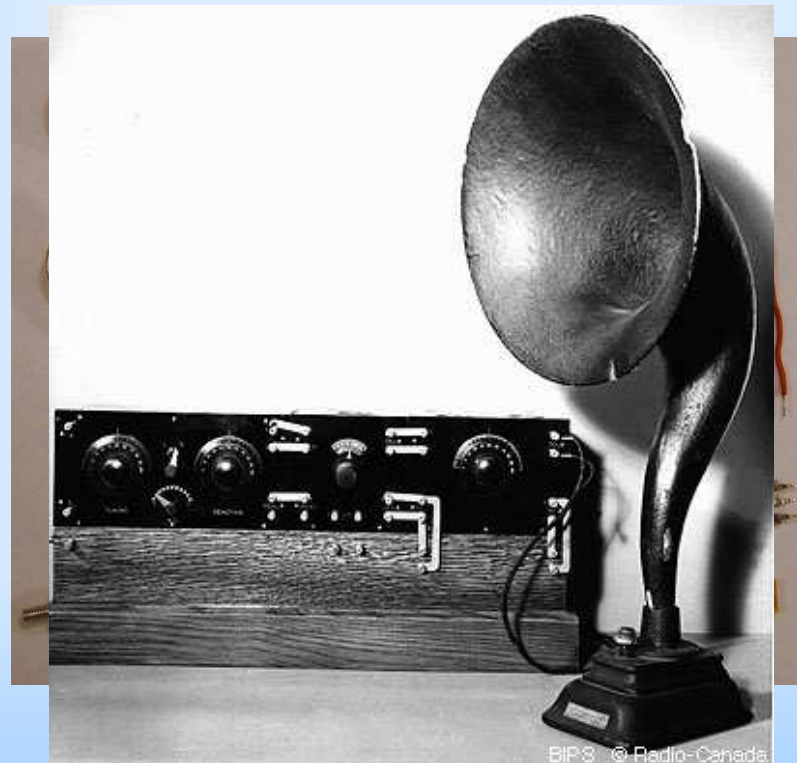
*Είναι η μελέτη των ζωντανών οργανισμών, υπό το πρίσμα των υποκείμενων δικτυώσεων που συνιστούν τη δομή τους, αντί της εξατομικευμένης μελέτης των μοριακών τους μερών. «Σύστημα» μπορεί να θεωρηθεί οτιδήποτε από ένα γονιδιακό ρυθμιστικό δίκτυο μέχρι ένα κύτταρο, ιστό ή κι έναν ολόκληρο οργανισμό. Υπολογιστικές μέθοδοι απαιτούνται για τη διαχείριση και ερμηνεία των απαραίτητων δεδομένων, για την κατανόηση των πολύπλοκων βιολογικών συστημάτων.*

*H. Kitano -2002-a Science 295,1662-1664, b Nature 420,206-210*

study of living organisms in terms of their underlying network structure rather than simply their individual molecular components. A "system" can be anything from a gene regulatory network to a cell, a tissue, or an entire organism. Computational approaches are required to handle and interpret the data necessary to understand complex biological systems.

# The Combinatorial Advantage

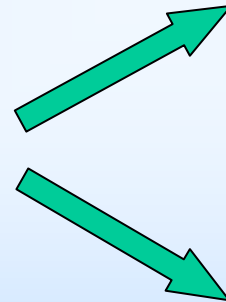
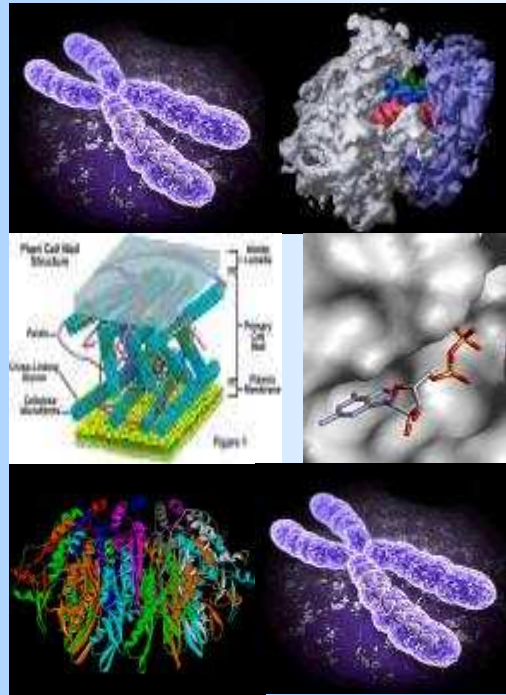
Not only the parts are important, but also the way they are connected





# Systems Biology

Not only the parts are important, but also the way they are connected



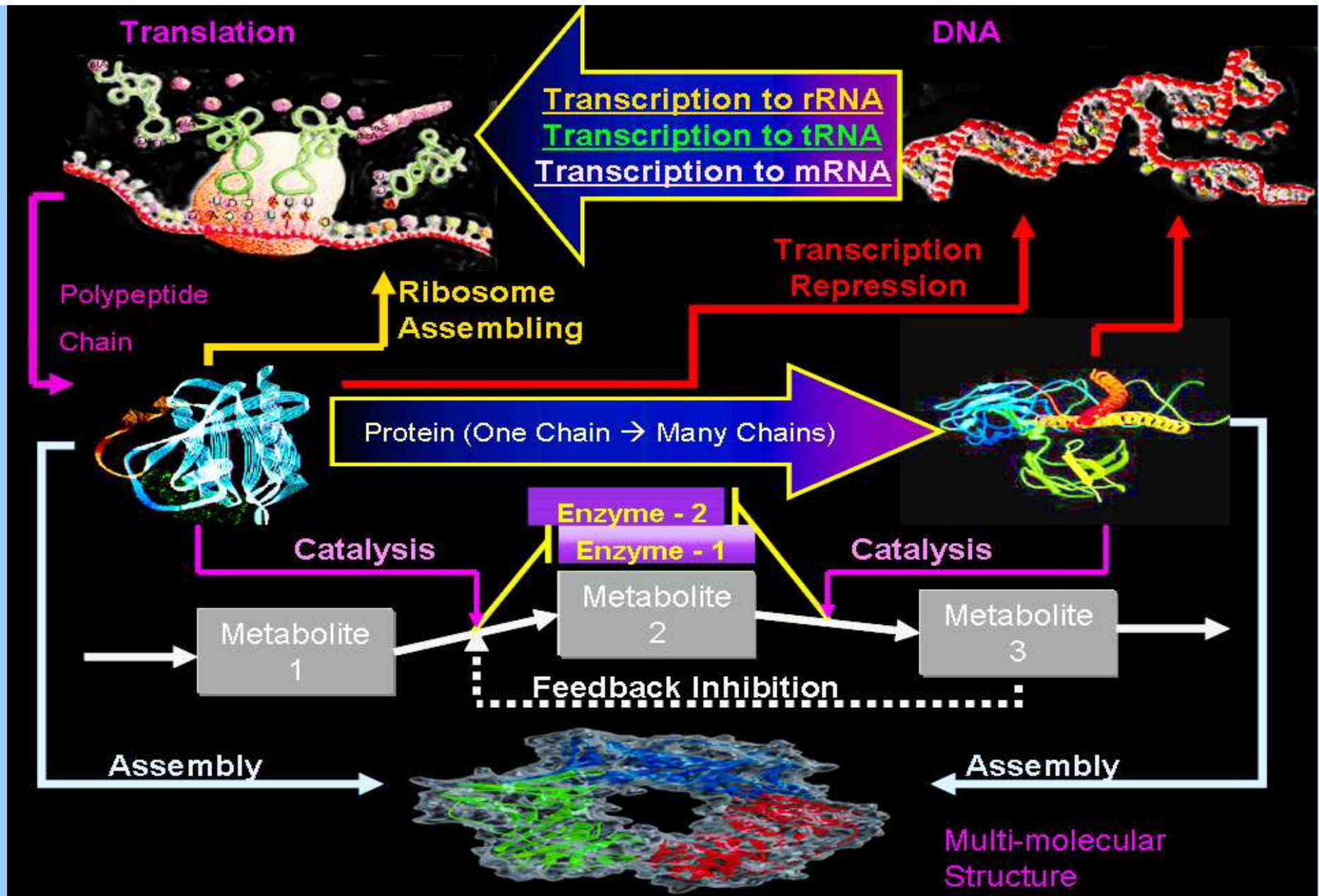
# Looking at the whole system

Elephant and blind men- Old Indian story

## Systems Biology

- Analyzing the biological systems as a whole
- **Computer models** are used to integrate information at different levels
- Connectivity in the network plays a central role in Systems Biology, but quantitative description of the connections is equally important

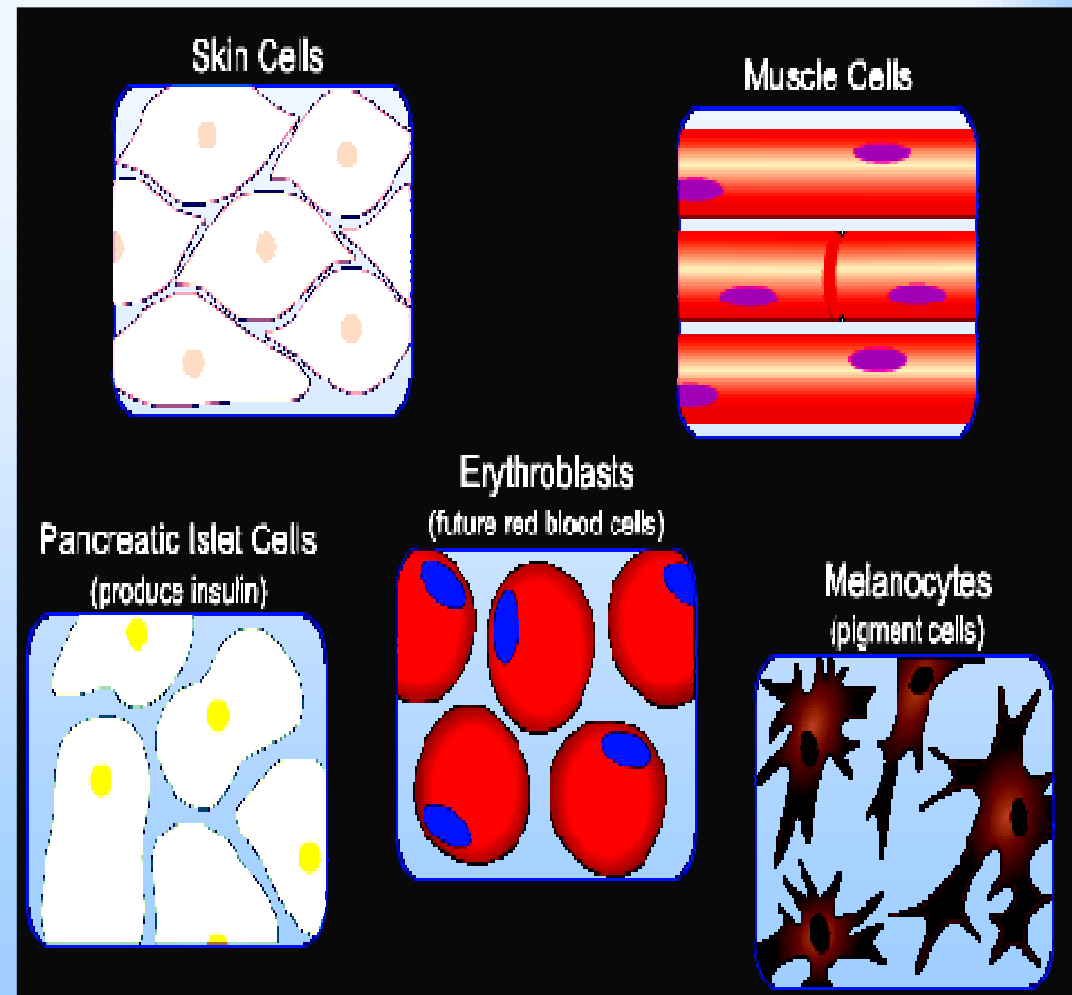




# GENOMICS

## Gene Expression

- The differential in each cell type comes from genes that are **ON** or **OFF**.

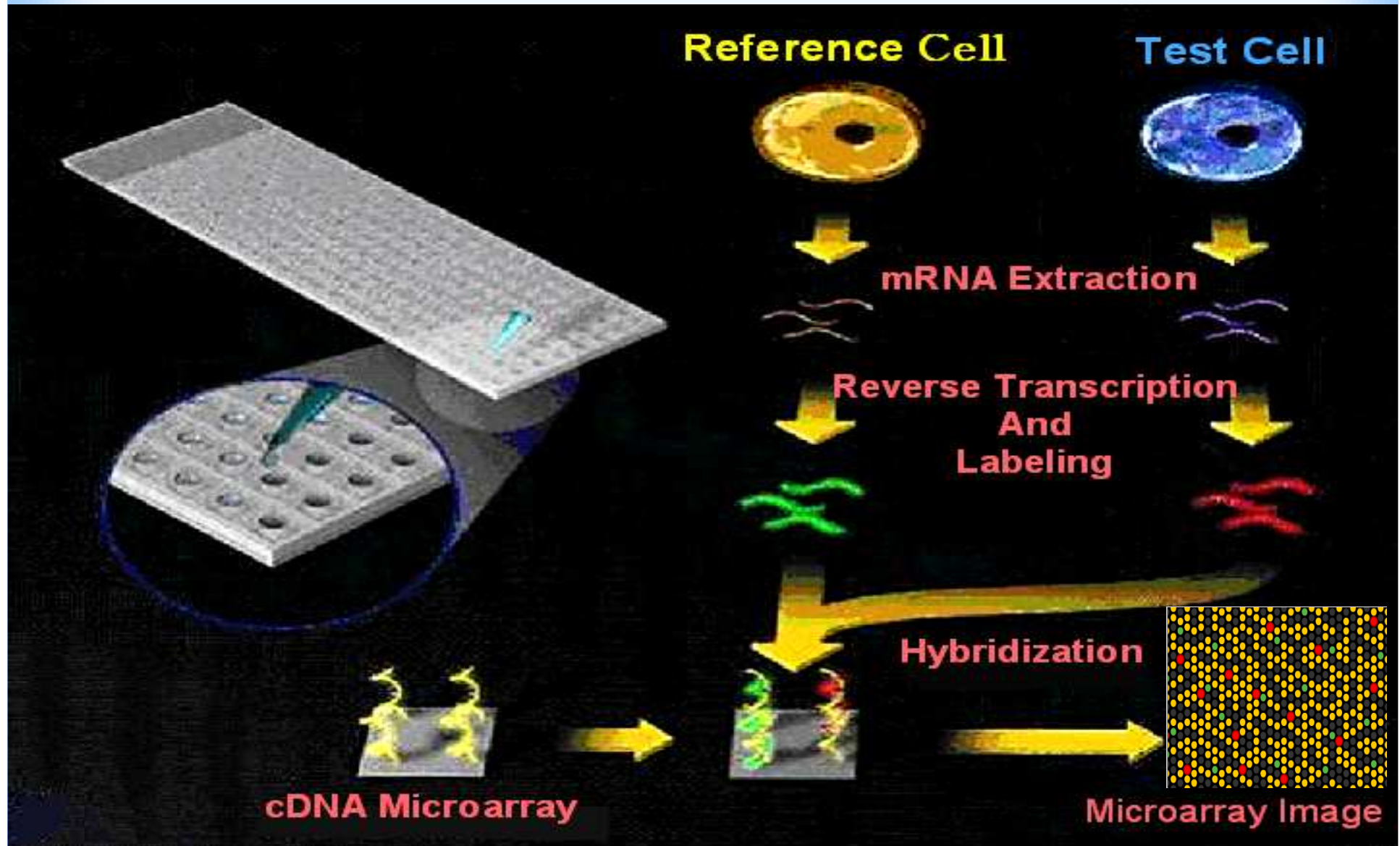


# Genetics → Genomics

- A few years ago scientists applied to genes studies like mapping, mutations, cloning, sequencing on one or few genes at a time.
- Wouldn't be great if we could study many or all genes in **ONE SINGLE EXPERIMENT** ?

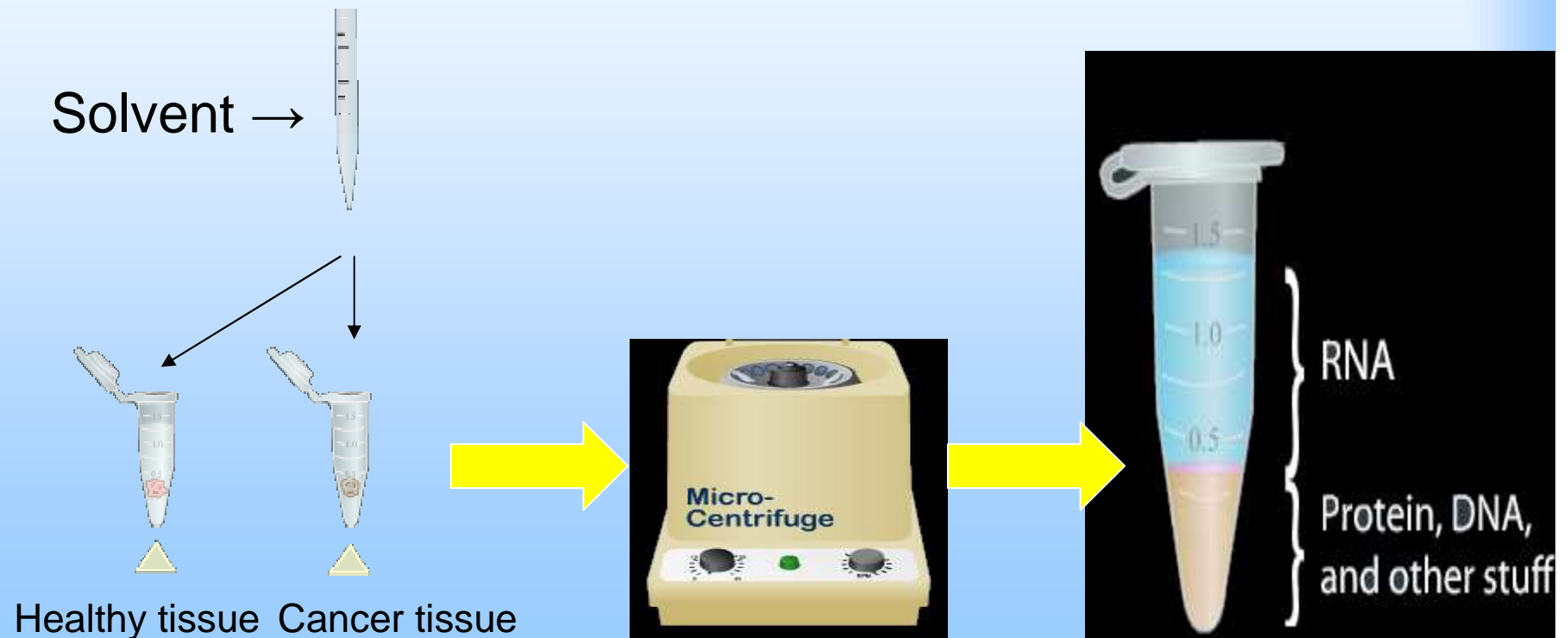


# Microarray Experiment



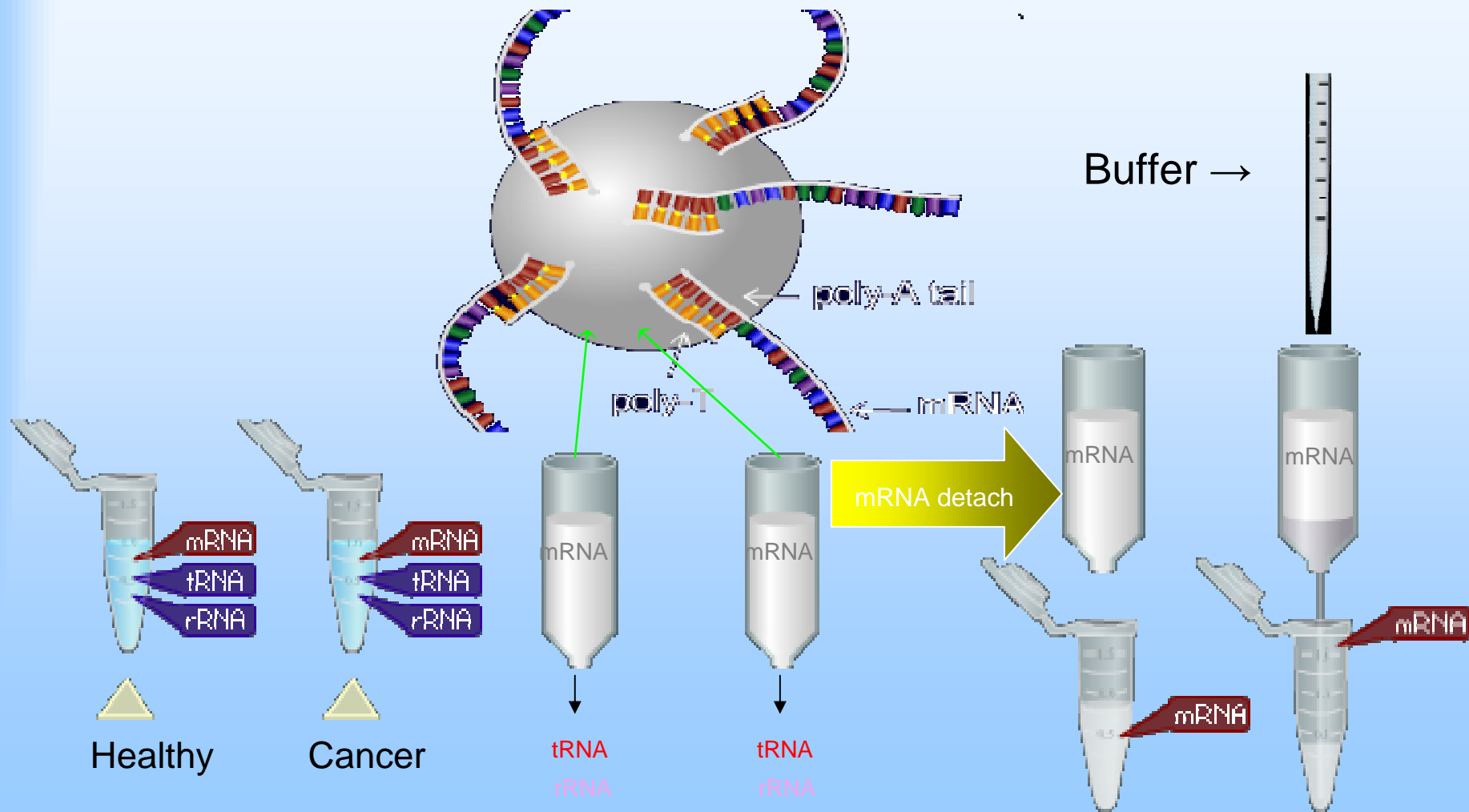
# RNA Extraction

- **RNA isolation:** RNA extracts from tissues samples by dissolving to them a mixture of organic solvents.



# mRNA Extraction

- **mRNA isolation:** Only mRNA reflects gene expression. mRNA molecules always end in a sequence of adenines known, as a “poly-A tail”.

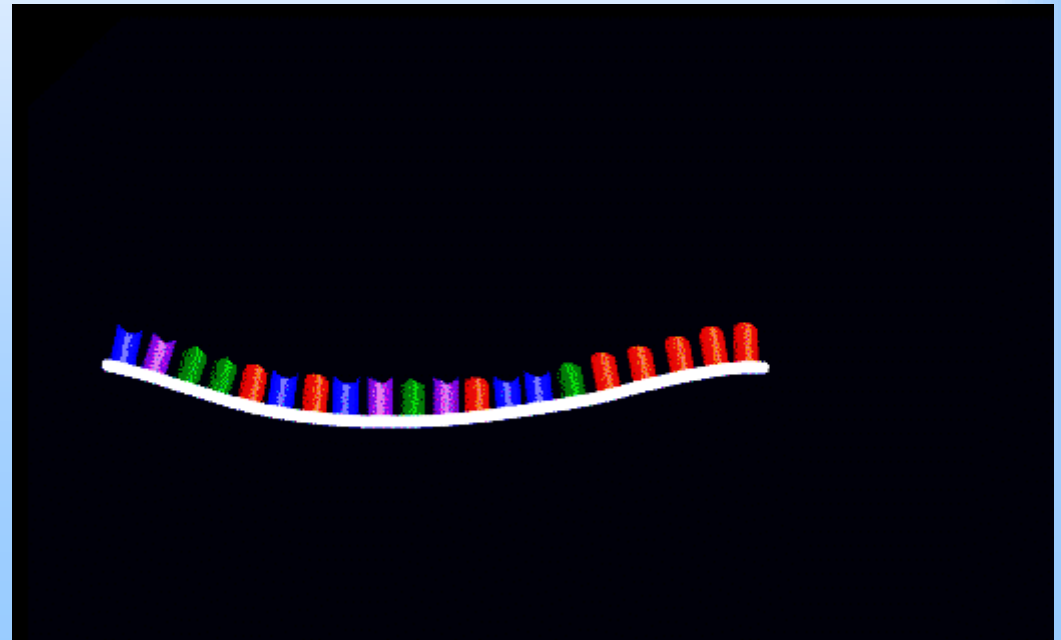




# Reverse Transcription & Labeling

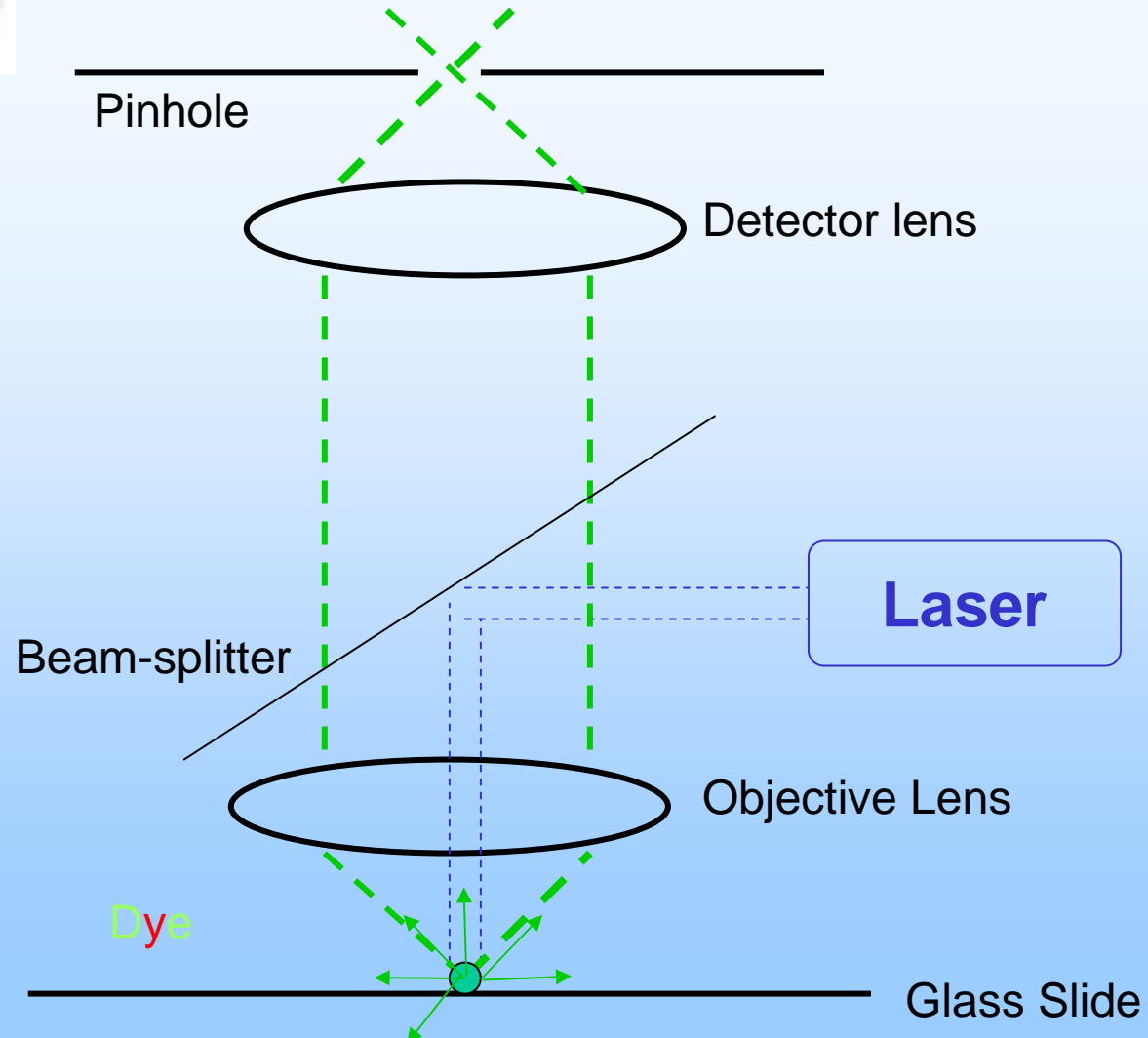


Green Label (Cy3) Healthy mRNA Cancer mRNA Red Label (Cy5)

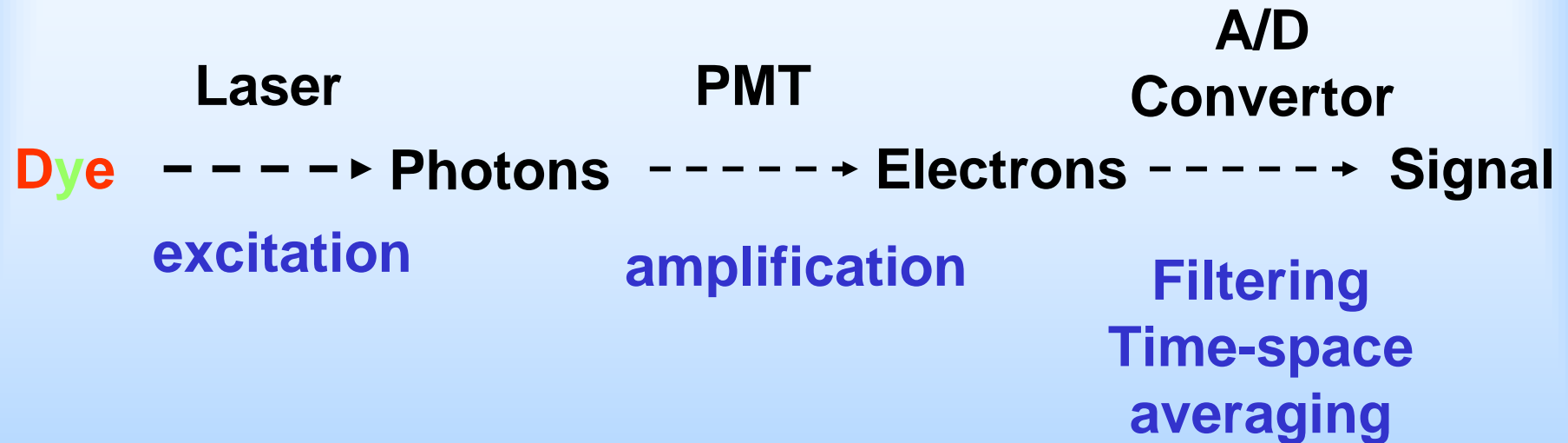




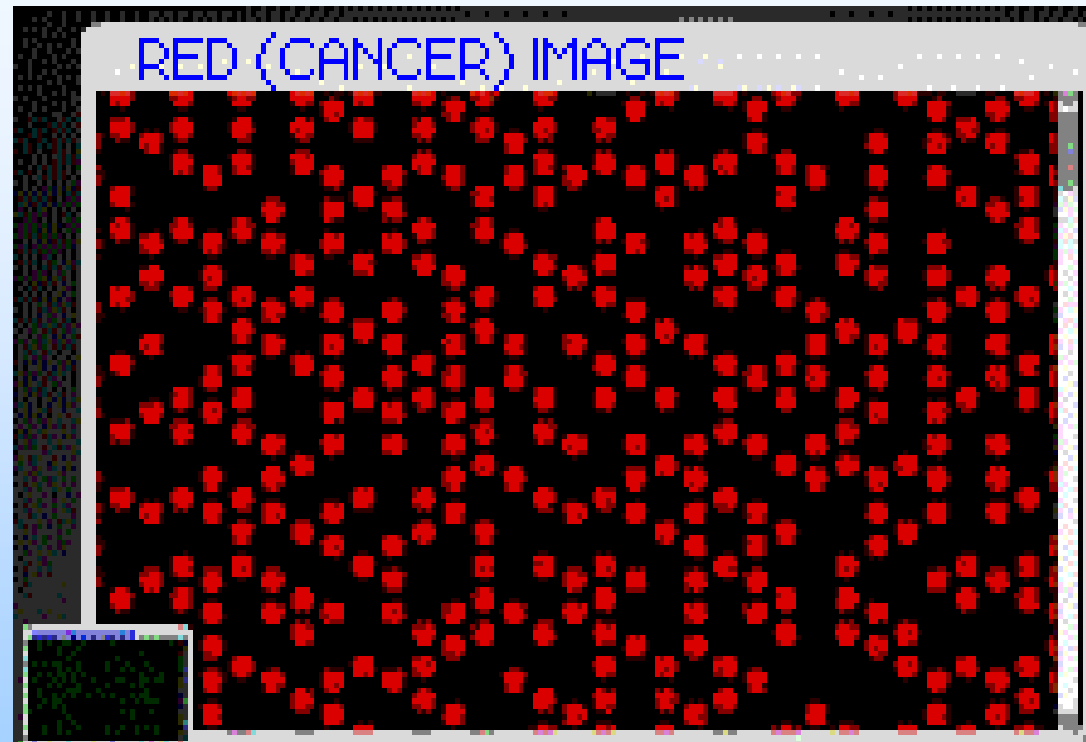
Scanner  
PMT



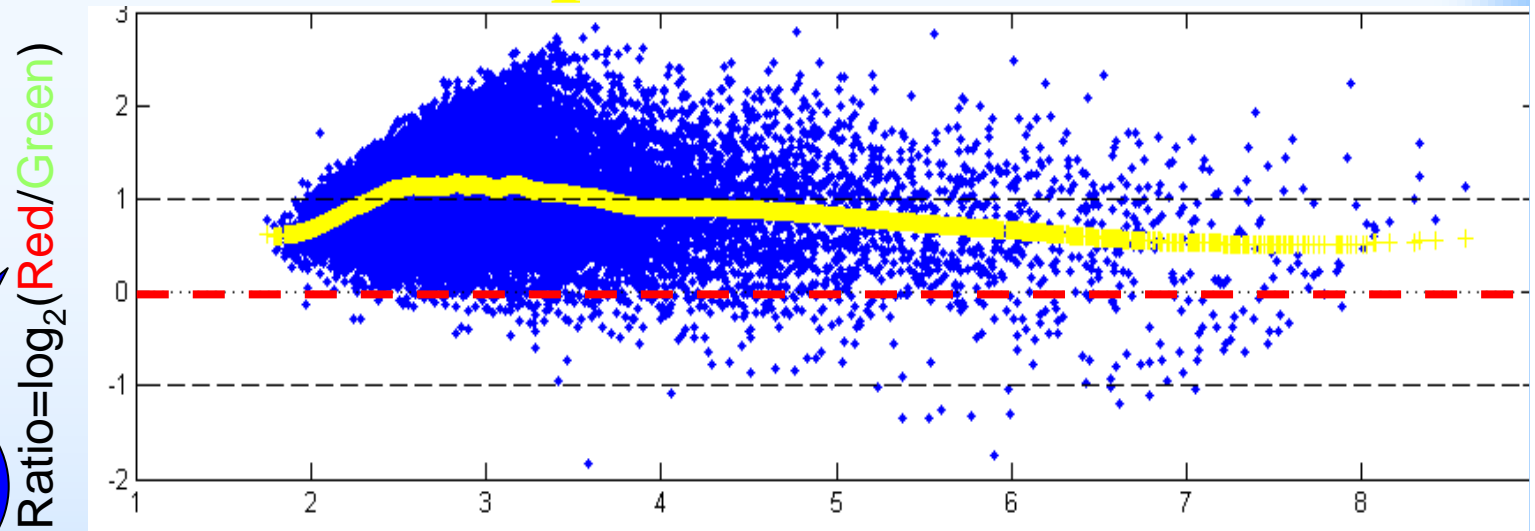
# Scanner Process



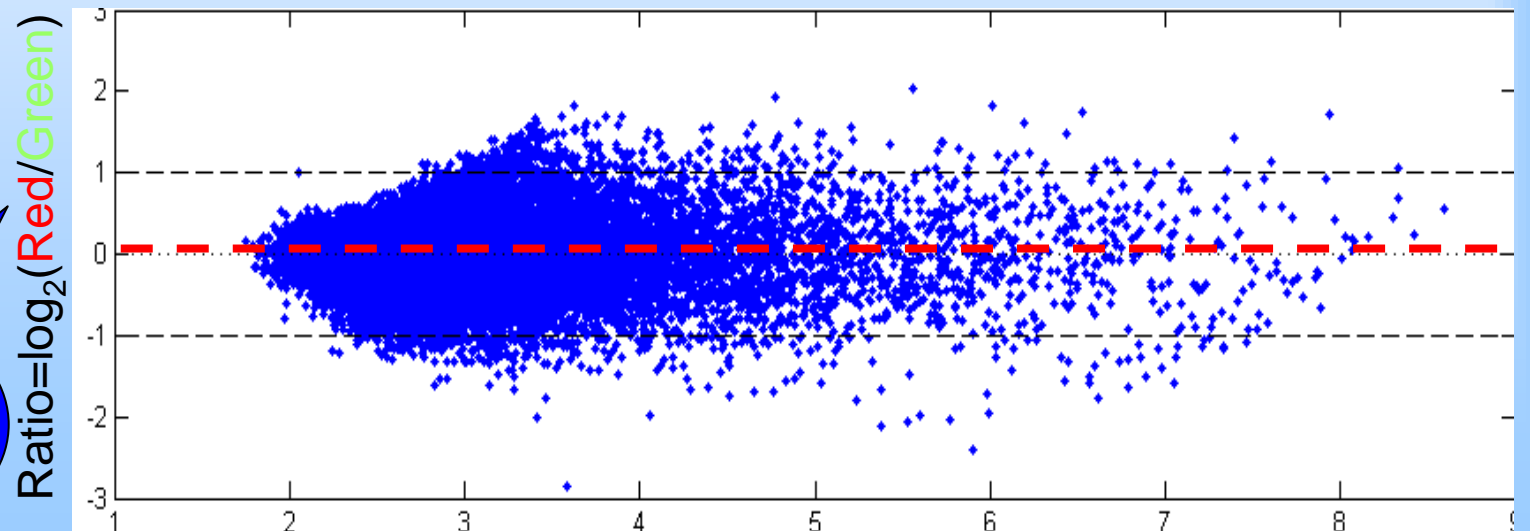
# Image Analysis (Merge)



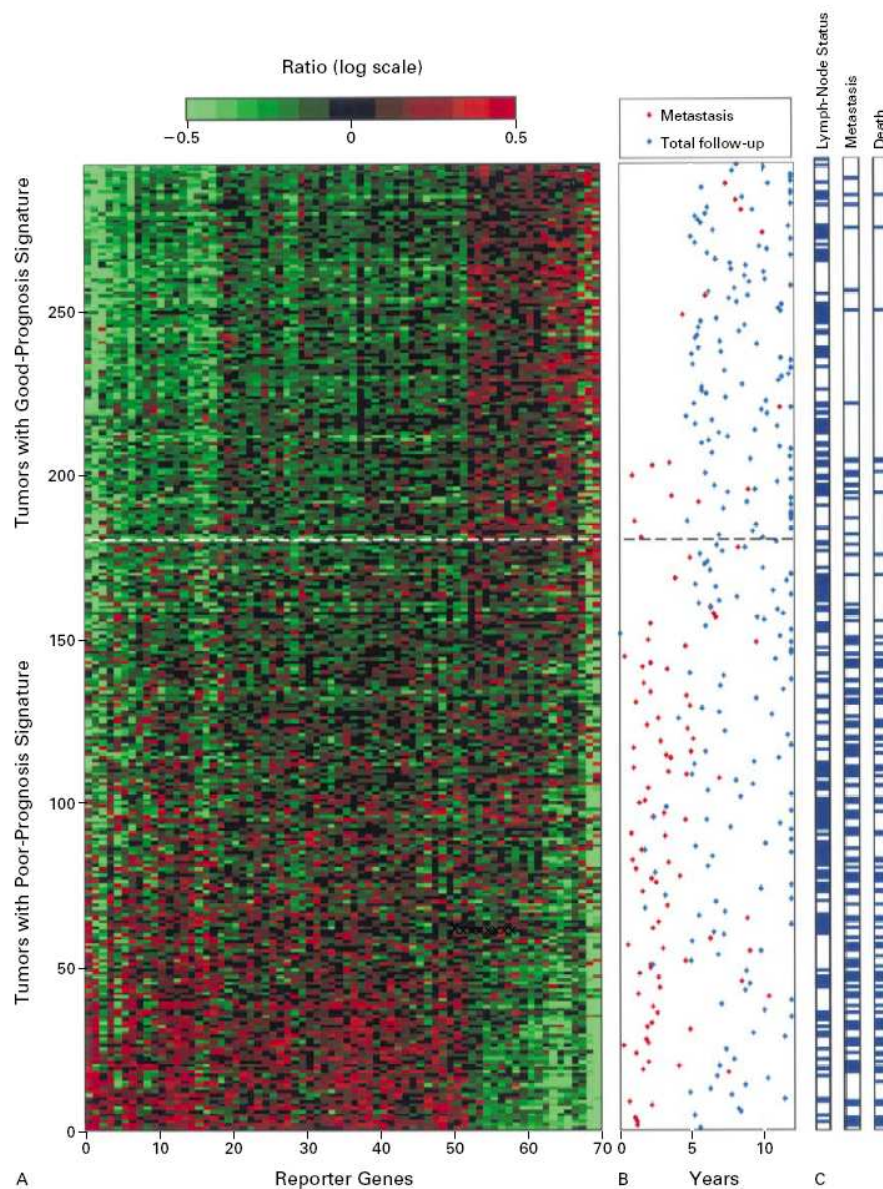
# IR plot



Before  
NORMALIZATION



After  
NORMALIZATION



Υπόδειγμα της έκφρασης των γονιδίων που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό της δυνατότητας της Πρόγνωσης σε σχέση με τα κλινικά χαρακτηριστικά 295 ασθενών με καρκίνο του στήθους.

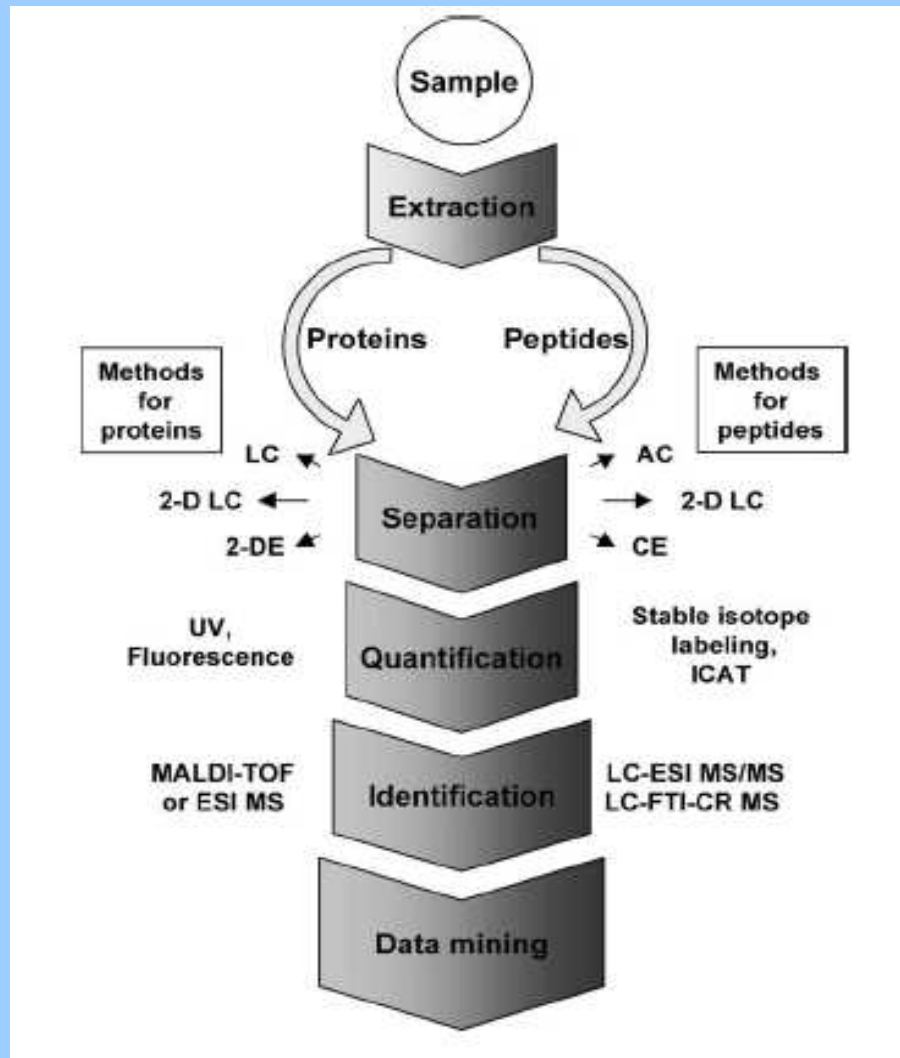
A. Εμφανίζεται ο βαθμός έκφρασης 70 γονιδίων (άξονας ψ) που χρησιμοποιούνται ως δείκτες σε 295 ασθενείς (άξονας χ) . Το κόκκινο χρώμα δείχνει τα γονίδια που έχουν υπερ-εκφρασθεί και το πράσινο τα γονίδια που έχουν υπο-εκφρασθεί. Η στικτή γραμμή δείχνει το επίπεδο κάτω από το οποίο έχουμε καλή συσχέτιση γονιδιακής υπερ-έκφρασης με μετάσταση και πάνω από το οποίο έχουμε καλή συσχέτιση μεταστάσεων με γονιδιακή υπο-έκφραση.

B. Αριθμός μεταστάσεων με τη πάροδο του χρόνου σε έτη. Στα πρώτα 5 έτη έχουμε αύξηση των μεταστάσεων που σχετίζονται με τα υπερ-εκφρασμένα γονίδια.

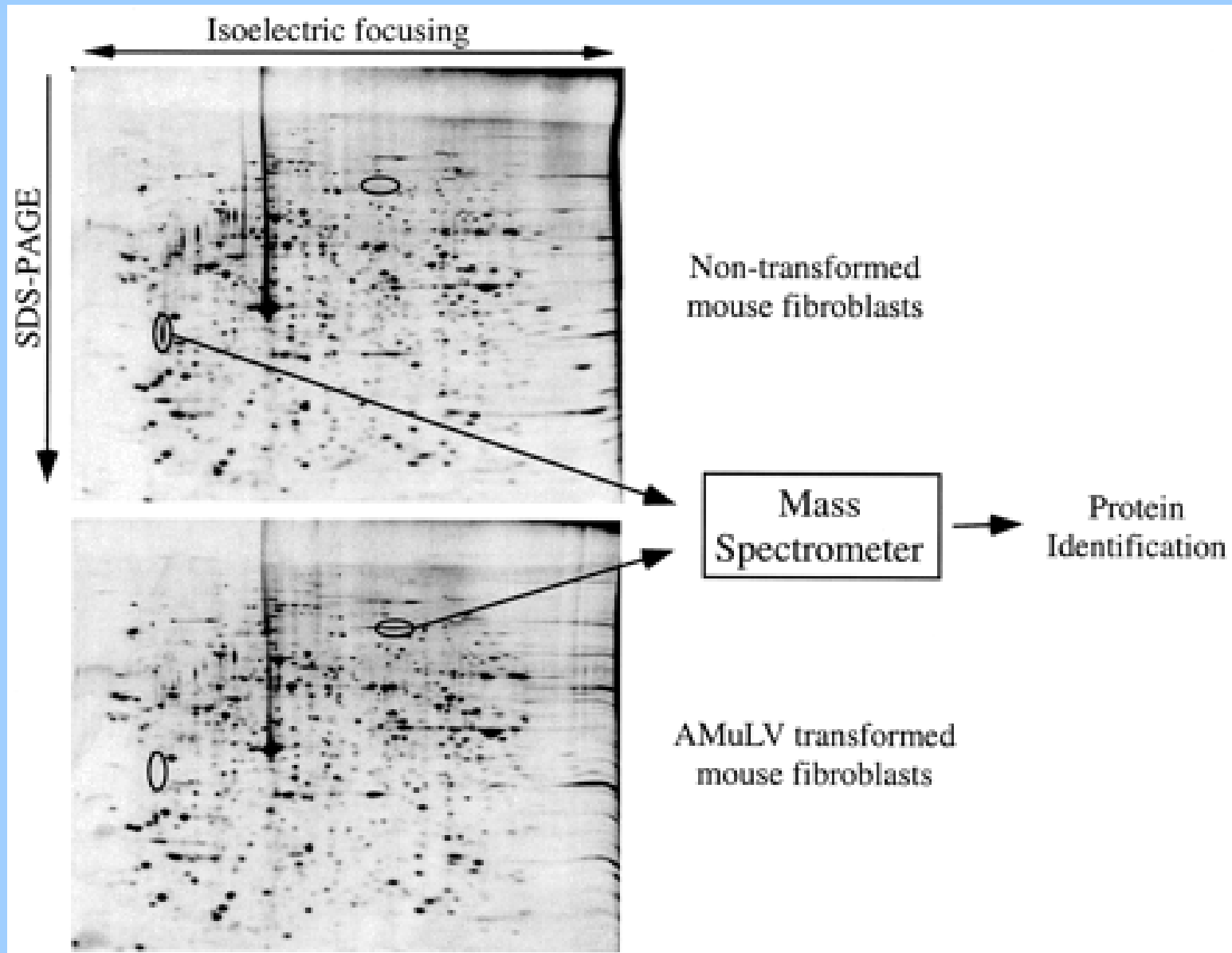
C. Συσχέτιση των μεταστάσεων με την εμφάνιση του καρκίνου των λεμφαδένων και τους θανάτους που παρουσιάζονται αυξημένοι τα πρώτα 5 έτη.

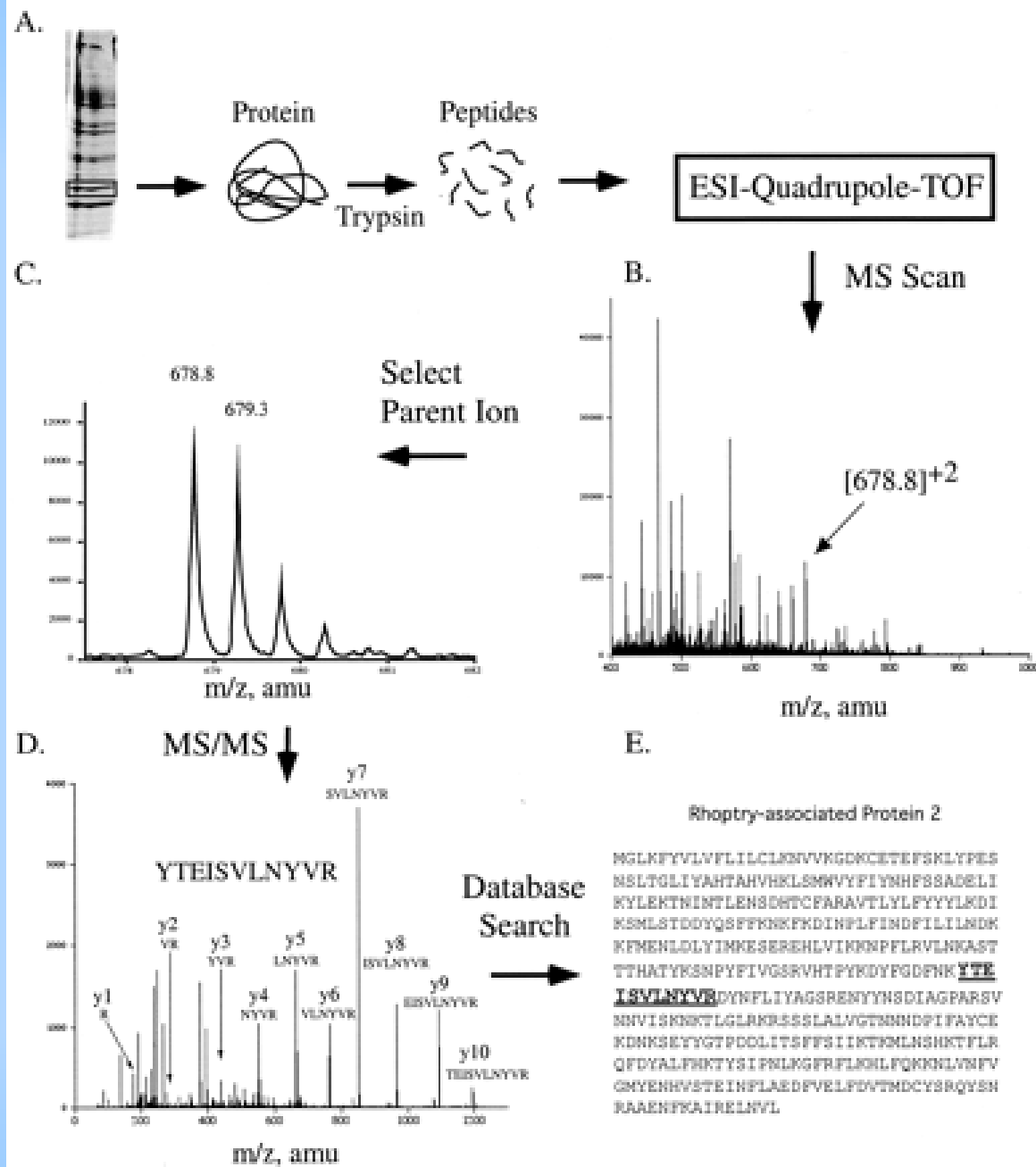
**Είναι προφανές ότι σε καμία περίπτωση δεν μπορούμε να συσχετίσουμε την παρουσία και μόνο κάποιου (ή ακόμη και κάποιων) γονιδίου με την εμφάνιση του καρκίνου αφού και τα 70 υπάρχουν σε όλες τις περιπτώσεις, αυτών δηλαδή που θα εμφανίσουν μετάσταση και θάνατο αλλά και αυτών που δεν θα παρουσιάσουν μετάσταση. Αντίθετα για την πρόγνωση θα πρέπει να ληφθεί υπ'όψιν ο βαθμός έκφρασης και η συσχέτιση και των 70 γονιδίων**

# PROTEOMICS





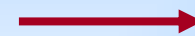
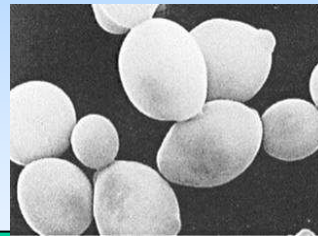




# METABOLOMICS

# The Cell Factory

Raw material



Product

Central Carbon Metabolism

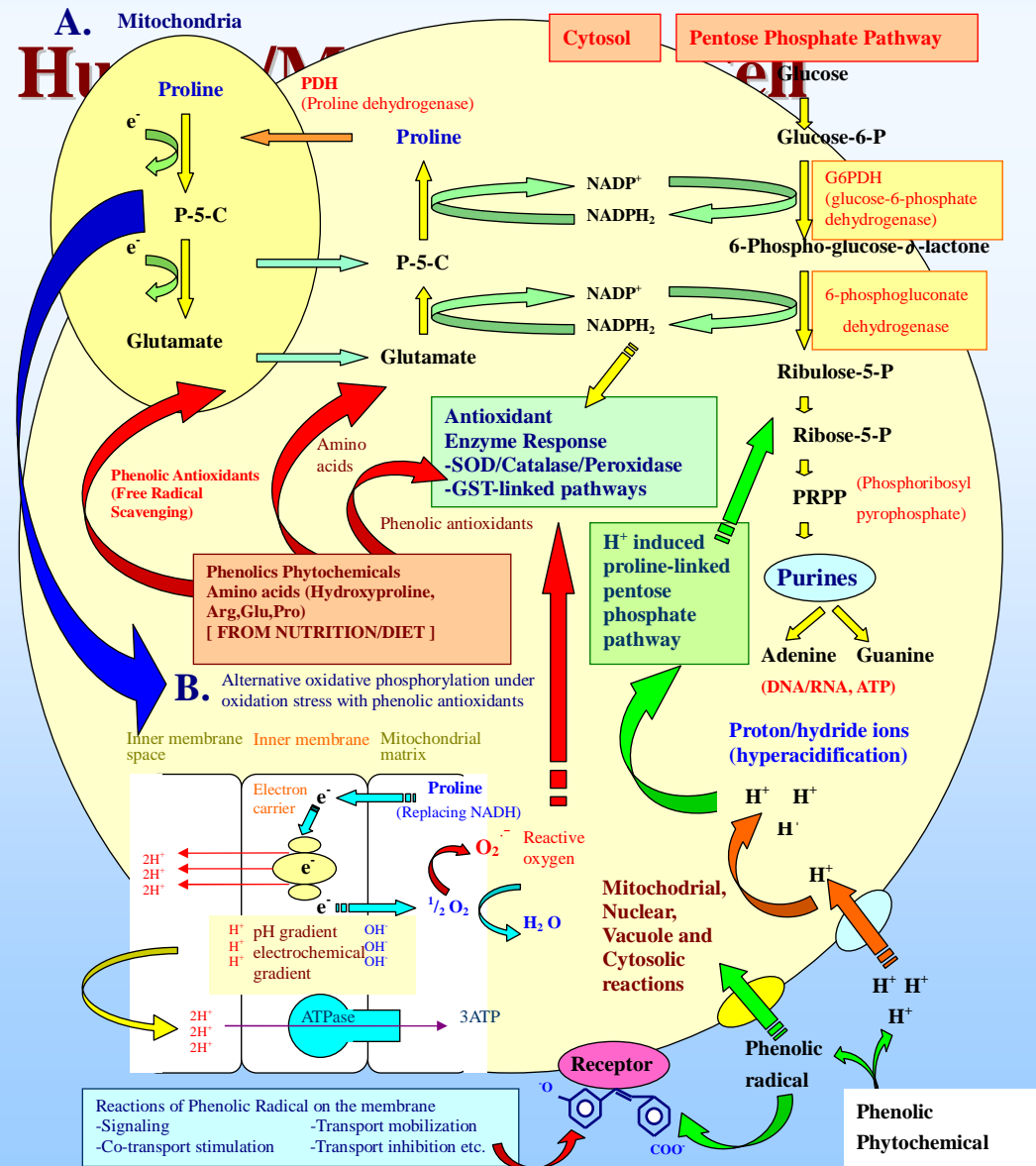
Reprogramming of the central carbon metabolism plays an important role in the design of cell factories

Can systems biology assist in design of improved cell factories?

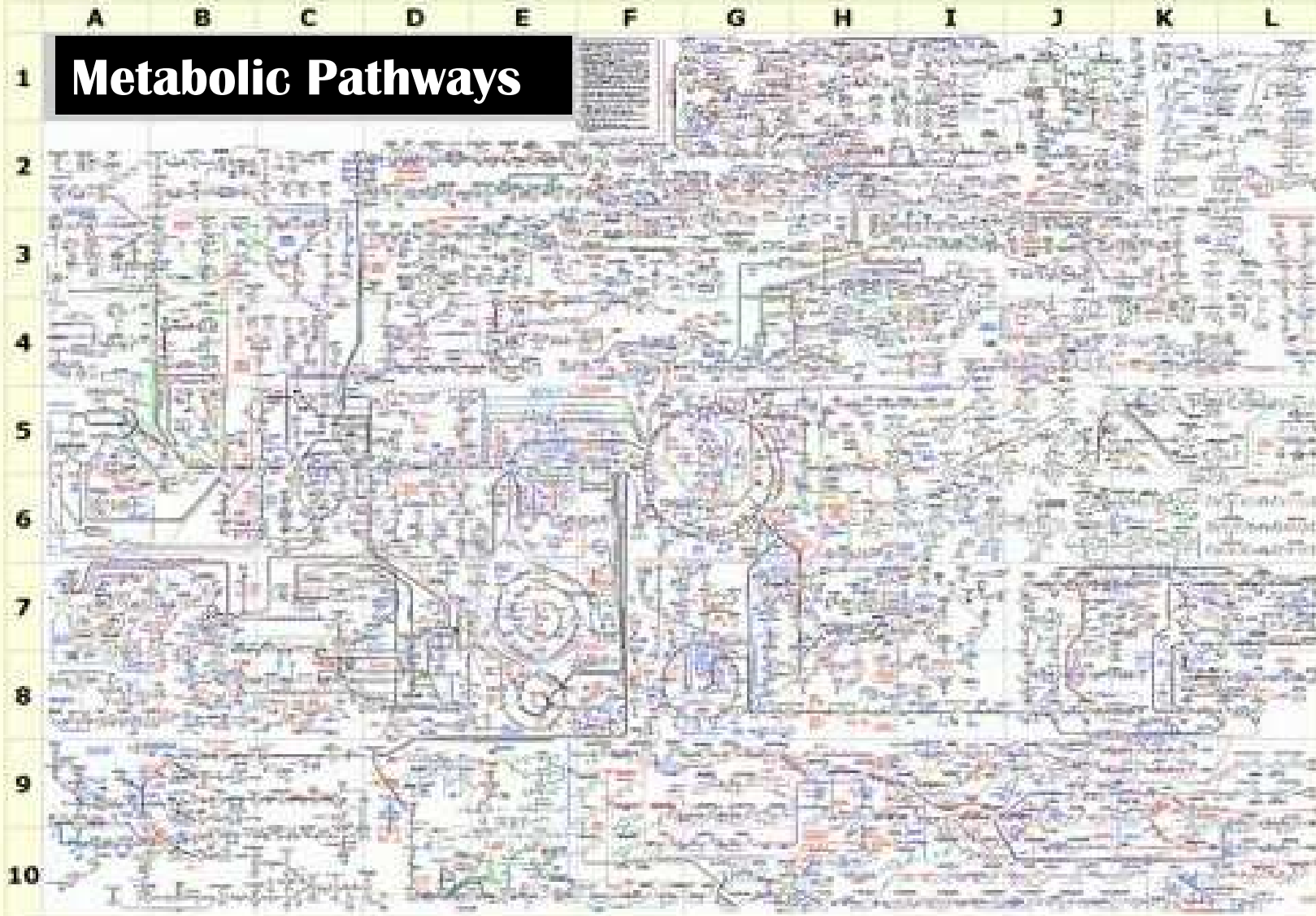
St  
g  
f  
x  
a  
g  
s  
r  
s

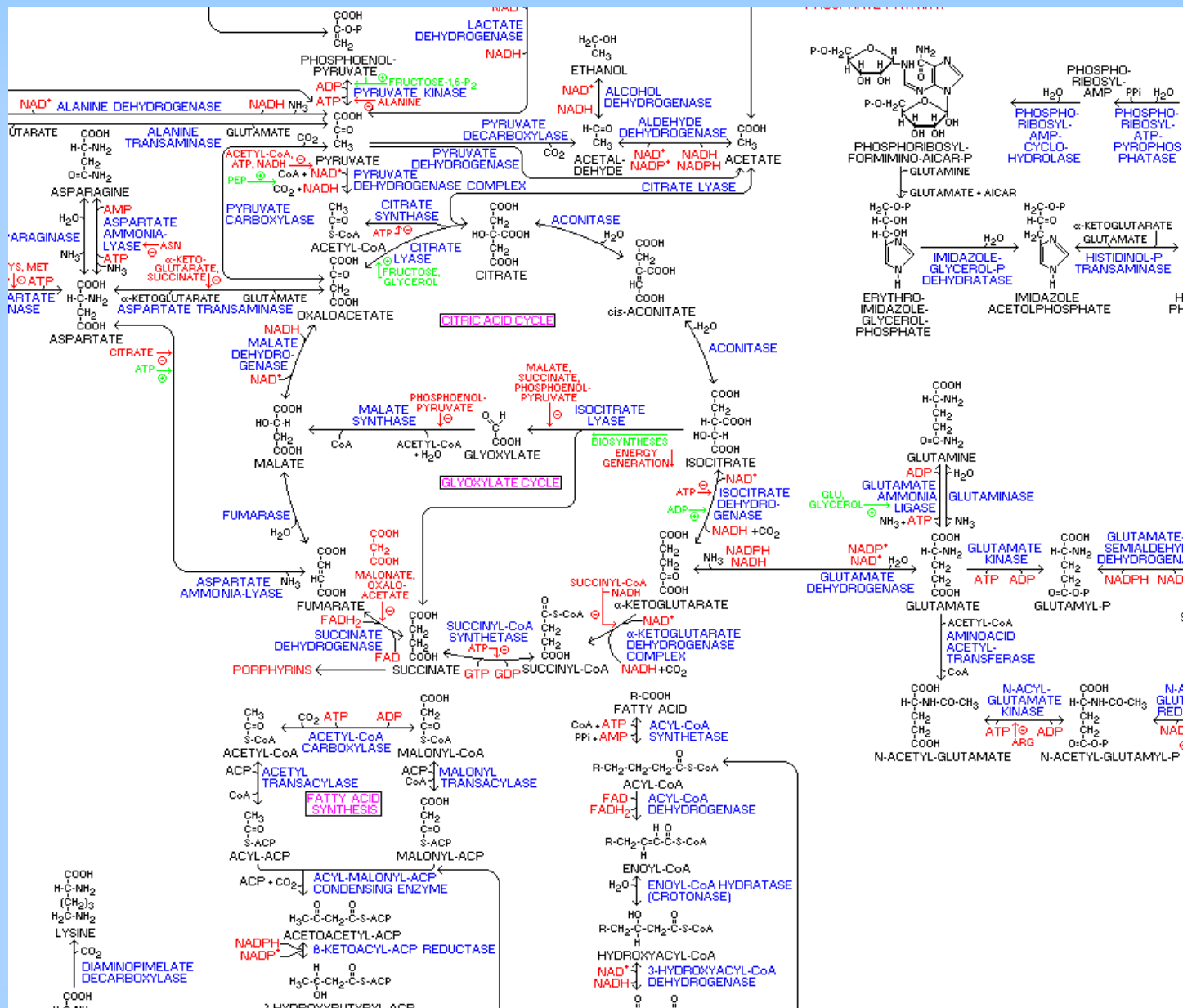
*hemicellulose*

Products:  
*te*  
*enoids*  
*otens*  
*iotics*

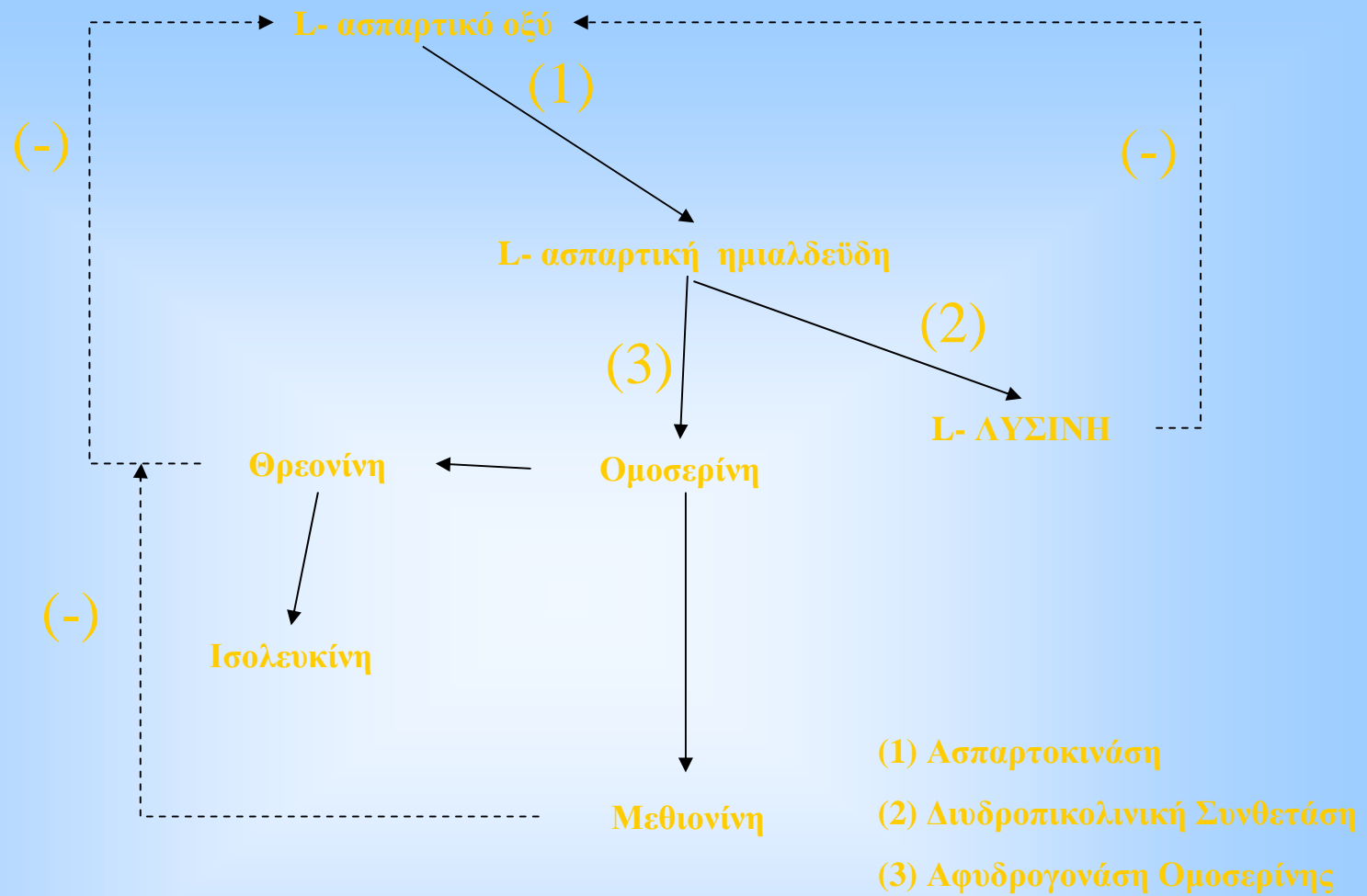


# Metabolic Pathways









Μηχανισμός συσσώρευσης L- Λυσίνης. Οι διακεκομμένες γραμμές δείχνουν αναστολή.



# Μεταβολική Μηχανική

**Μεταβολική Μηχανική:** Η κατευθυνόμενη βελτίωση των κυττάρων ως προς το σχηματισμό προϊόντος ή τις ιδιότητές τους, μέσω της τροποποίησης συγκεκριμένων βιοχημικών αντιδράσεων ή την εισαγωγή νέων με τη χρήση της τεχνολογίας ανασυνδυασμένου DNA .

Παράγοντες που συνεισφέρουν στην πολυπλοκότητα των μεταβολικών δικτύων:

- Ταυτόχρονη αλληλεπίδραση μεταβολιτών με περισσότερα του ενός υποστρώματα
- διαμερισμάτωση
- Συζευγμένη δράση συμπαραγόντων
- Αλλοστερικές δράσεις
- Ενδοκυττάρια μεταφορά

# Εργαλεία της Μεταβολικής Μηχανικής

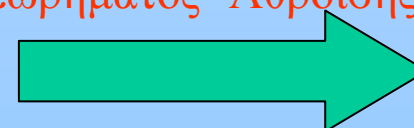
Δυο μεθοδολογίες συνιστούν τα βασικά μαθηματικά εργαλεία της Μεταβολικής Μηχανικής :

- **Ανάλυση Μεταβολικών Ροών (AMP)**

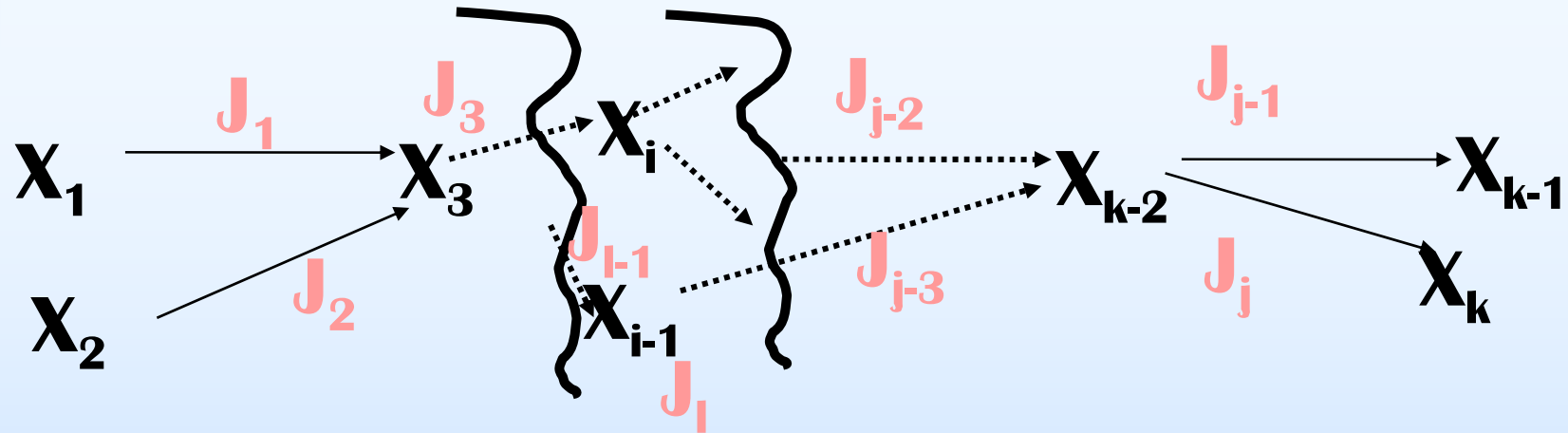
Η AMP εστιάζει στον ακριβή καθορισμό των ροών του μεταβολικού μονοπατιού. Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιεί μια ομάδα *μετρούμενων* ροών καθώς και το στοιχειομετρικό μοντέλο των σημαντικών ενδιάμεσων αντιδράσεων, προκειμένου να επιτευχθεί ο υπολογισμός των υπόλοιπων ροών.

- **Ανάλυση Μεταβολικού Ελέγχου (AME)**

Η AME ποσοτικοποιεί το πώς οι ροές και συγκεντρώσεις σταθερής κατάστασης των μεταβολιτών που απαρτίζουν το μεταβολικό δίκτυο, μεταβάλλονται αποκρινόμενες σε διάφορες διαταραχές (π.χ. μεταβολή της συγκέντρωσης ενζύμων κ.α.). Επίσης, συνδέει τις καθολικές αυτές ιδιότητες του συνολικού συστήματος με τις ιδιότητες των συστατικών του μερών (εν προκειμένω των μεμονωμένων ενζύμων), λαμβάνοντας υπ' όψη τα δομικά χαρακτηριστικά του μεταβολικού δικτύου, με τη βοήθεια του θεωρήματος Άθροισης Συντ/στών Ελέγχου Ροής και του θεωρήματος Ελαστικότητας.



# Ανάλυση Μεταβολικών Ροών-AMP



Βάση της AMP αποτελούν οι εξισώσεις ισοζυγίων μάζας για κάθε έναν από τους ενδιάμεσους μεταβολίτες ενός βιοχημικού μονοπατιού, εφόσον το σύστημα έχει προσεγγίσει την κατάσταση ισορροπίας.

$$0 = \frac{dX_i}{dt} = \left( \sum_m J_{synth} - \sum_n J_{cons} \right) \overset{r_i}{\leftarrow}$$

Όταν η στοιχειομετρία των αντιδράσεων του μονοπατιού θεωρείται γνωστή, οι  $K$  εξισώσεις ισοζυγίων μάζας, μπορούν να αποδοθούν υπό μορφή πινάκων.  $G^T$  είναι ένας ( $K \times J$ ) πίνακας όπου οι  $K$  γραμμές αντιστοιχούν στους  $K$  ενδοκυττάριους μεταβολίτες και οι  $J$  στήλες περιέχουν τους αντίστοιχους στοιχειομετρικούς συντελεστές για κάθε ενδιάμεσο μεταβολίτη στις  $J$  αντιδράσεις. Το  $v$  είναι το ( $J \times 1$ ) άνωσμα που περιέχει τις  $J$  το πλήθος ροές αντιδράσεων.

$$0 = r_{met} = G^T v$$

$$\begin{pmatrix} a_{11} & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & a_{1J} \\ \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot \\ \cdot & \cdot & a_{kj} & \cdot & \cdot & \cdot \\ \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot \\ a_{K1} & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & a_{KJ} \end{pmatrix} \times \begin{pmatrix} J_1 \\ J_2 \\ \vdots \\ J_{J-1} \\ J_J \end{pmatrix}$$

SYSTEMS  
LOGICAL MODELS

NETWORK MAPPING

CORRELATION MODELS

KINETIC MODELING

•Network Mapping

•Correlation Models

•Logical Models

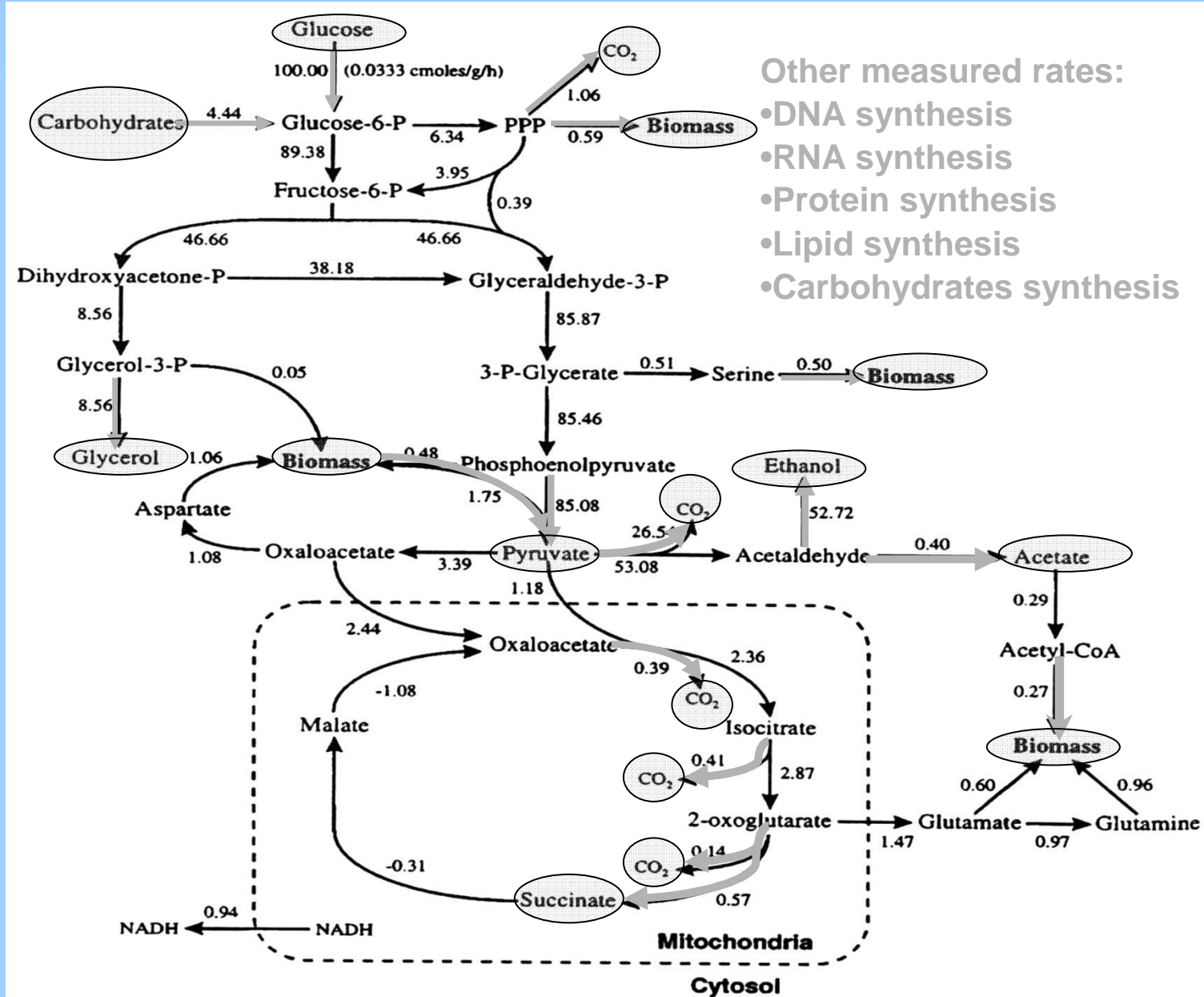
•Kinetic Modeling

Large scale computational quantitative pathway modeling

•Impossible to elucidate intuitively complex biochemical pathways

•Utilization of mathematic formalism and large scale kinetic data to reveal systemic properties of biochemical networks

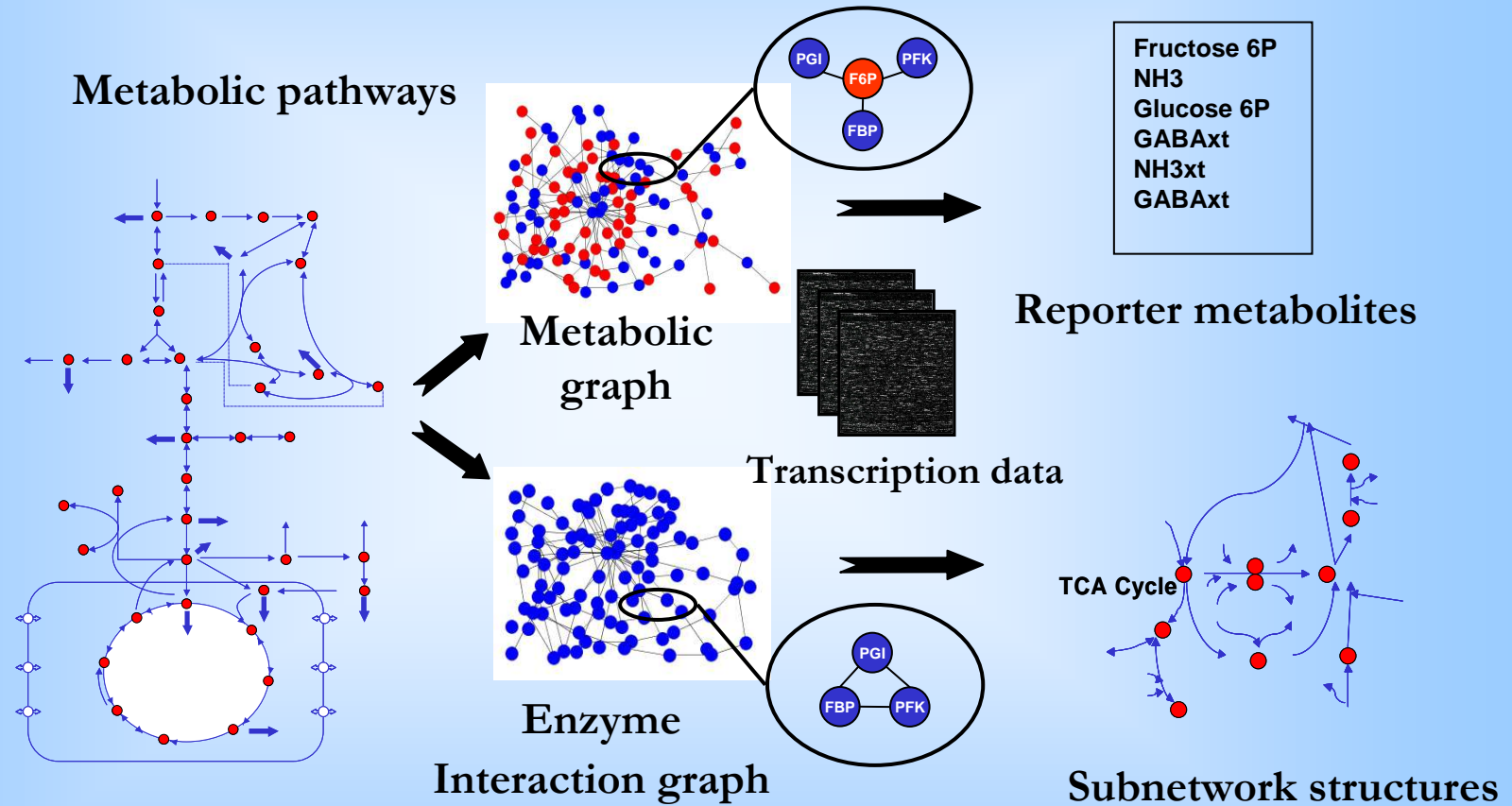
$$\begin{aligned} \dot{y} &= \sum_{i=1}^{n-1} a_i(x) y^{(i)} + r(x) & y'(x) &= \sum_{j=1}^n a_{ij}(x) y_j + \\ s(x) &= \sum_{i=1}^n c_i z_i(x) & s(x) &= \sum_{i=1}^n c_i z_i(x) \\ y'(x) &= A(x)y(x) + b(x) \end{aligned}$$



Other measured rates:

- DNA synthesis
- RNA synthesis
- Protein synthesis
- Lipid synthesis
- Carbohydrates synthesis

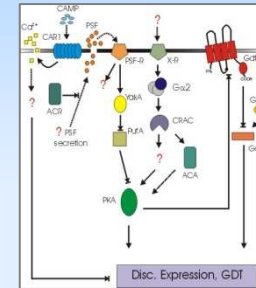
# The Approach



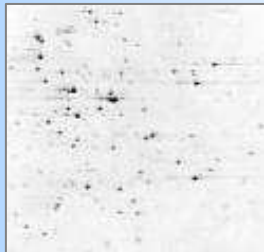
# The Experimental Component



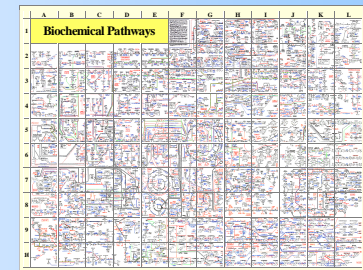
Transcriptome  
analysis



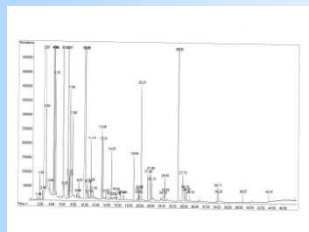
Interactome



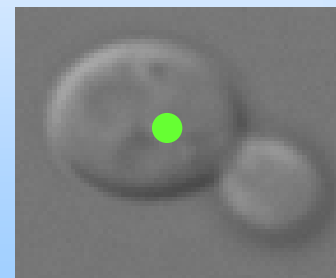
Proteome  
analysis



Fluxome



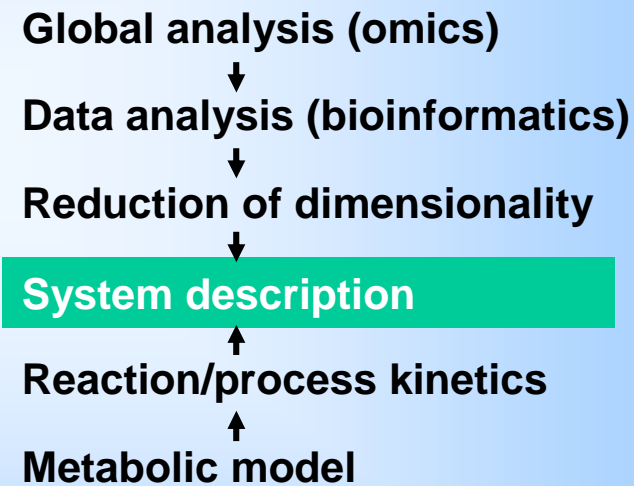
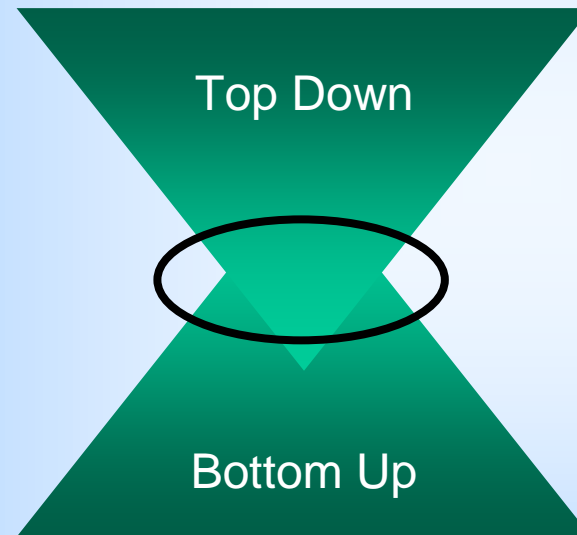
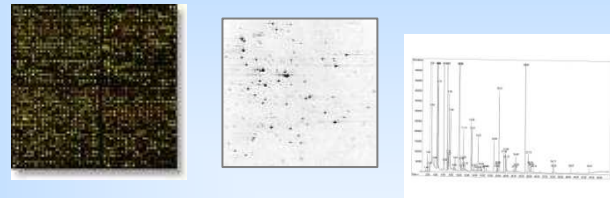
Metabolome  
analysis



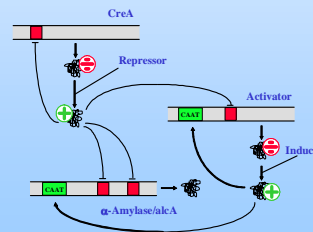
Locasome



# Top-Down vs. Bottom-Up SB



$\mu_{\max}$ ,  $K_d$ ,  $K_s$ , ...



## **Βιολογία Συστημάτων :**

Αναγκαία για την κατανόηση της φυσιολογίας  
σε επίπεδο συστήματος

Τι χρειαζόμαστε;

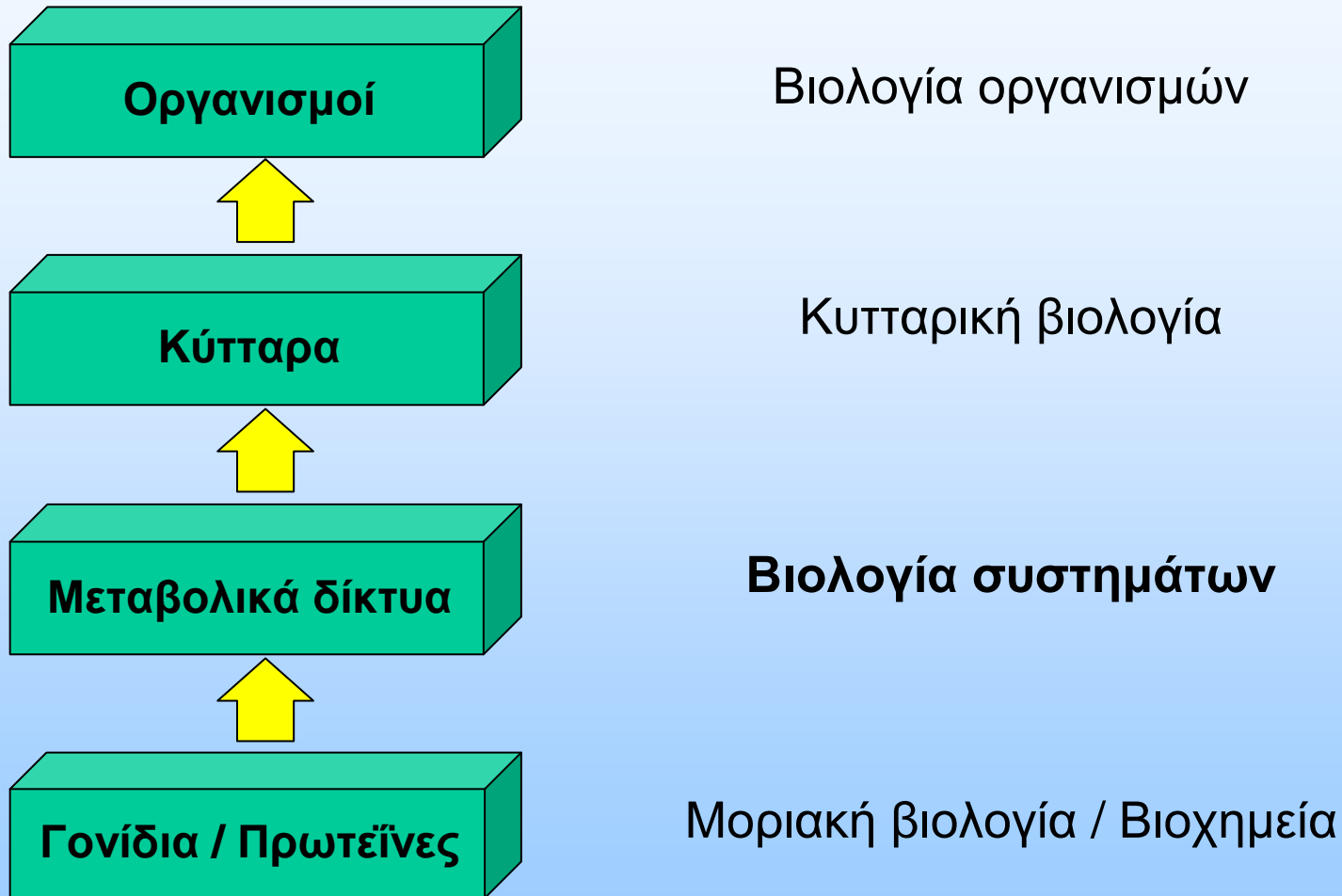
### **Συλλογή δεδομένων από**

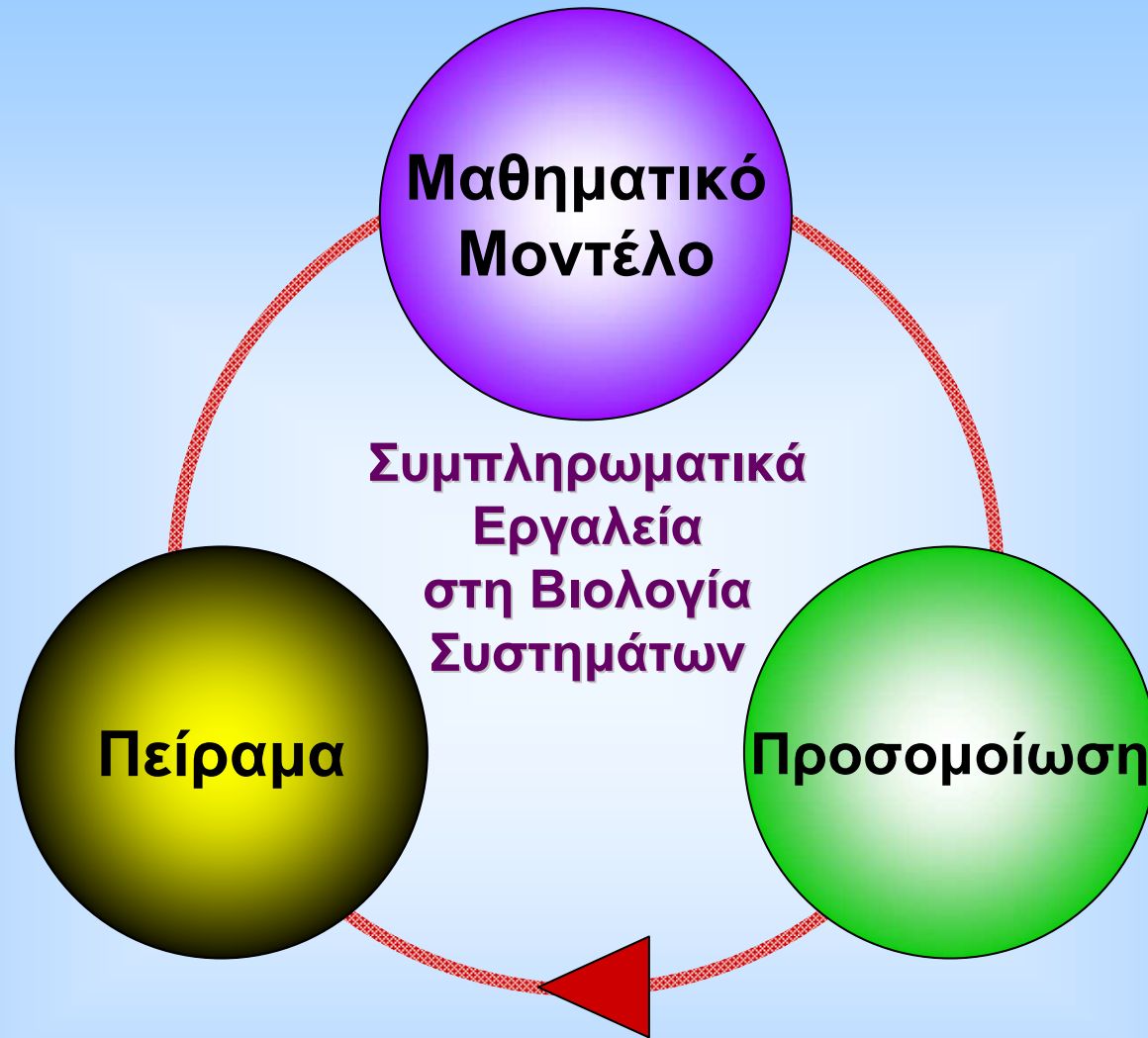
- Μεταβολικά γονίδια
- Ρυθμιστικά γονίδια
- Ρυθμιστικό DNA
- Ρυθμιστικό δίκτυο
- Μονοπάτι σήματος
- Μοντέλο
- Προσομοιωτής
- Πειραματική επαλήθευση

### **Διεπιστημονική συνεργασία**

- Βιολόγοι
- Πληροφορικοί
- Μηχανικοί
- Βιοπληροφορικοί
- Στατιστικοί
- Μαθηματικοί
- Δημιουργοί μοντέλων
- Ιατρικοί επιστήμονες

# Πού κατατάσσεται η βιολογία συστημάτων;





Πειραματισμός, μαθηματική μοντελοποίηση και υπολογιστικές προσομοιώσεις αποτελούν συμπληρωματικά εργαλεία για την επίτευξη στόχων στη βιολογία συστημάτων

# Μέθοδοι της βιολογίας συστημάτων

## Γονιδιωματική

- Αλληλούχιση γονιδιωμάτων
- Μαζική ανάλυση έκφρασης mRNA
- Γενετικές αλληλεπιδράσεις

## Πρωτεωμική

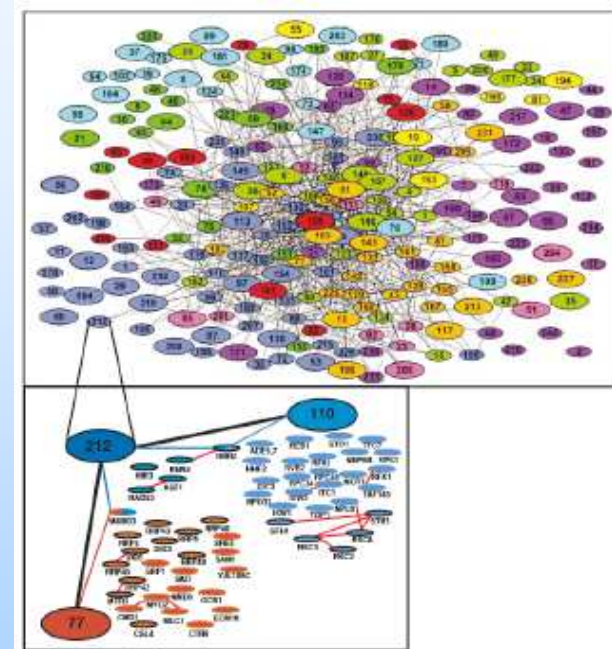
- ChIPs πρωτεϊνών
- Υβριδικές αναλύσεις
- Φασματογραφία μάζας

## Χημικές βιβλιοθήκες

## Μεταβολομική

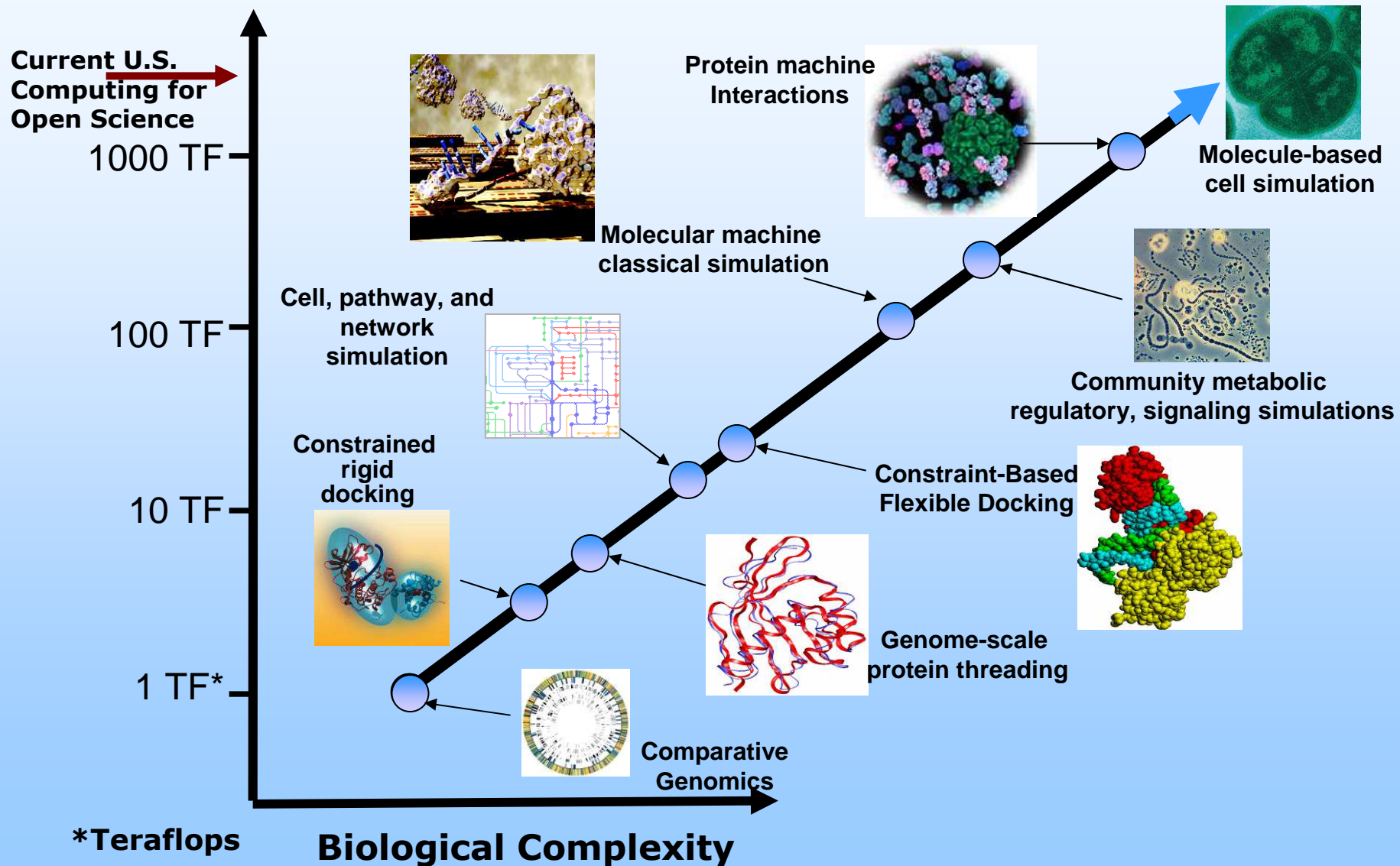
## Ανάλυση δεδομένων

- Βιοπληροφορική/ανάλυση μικροσυστοιχιών
- Ανάλυση δικτύων και μαθηματική μοντελοποίηση



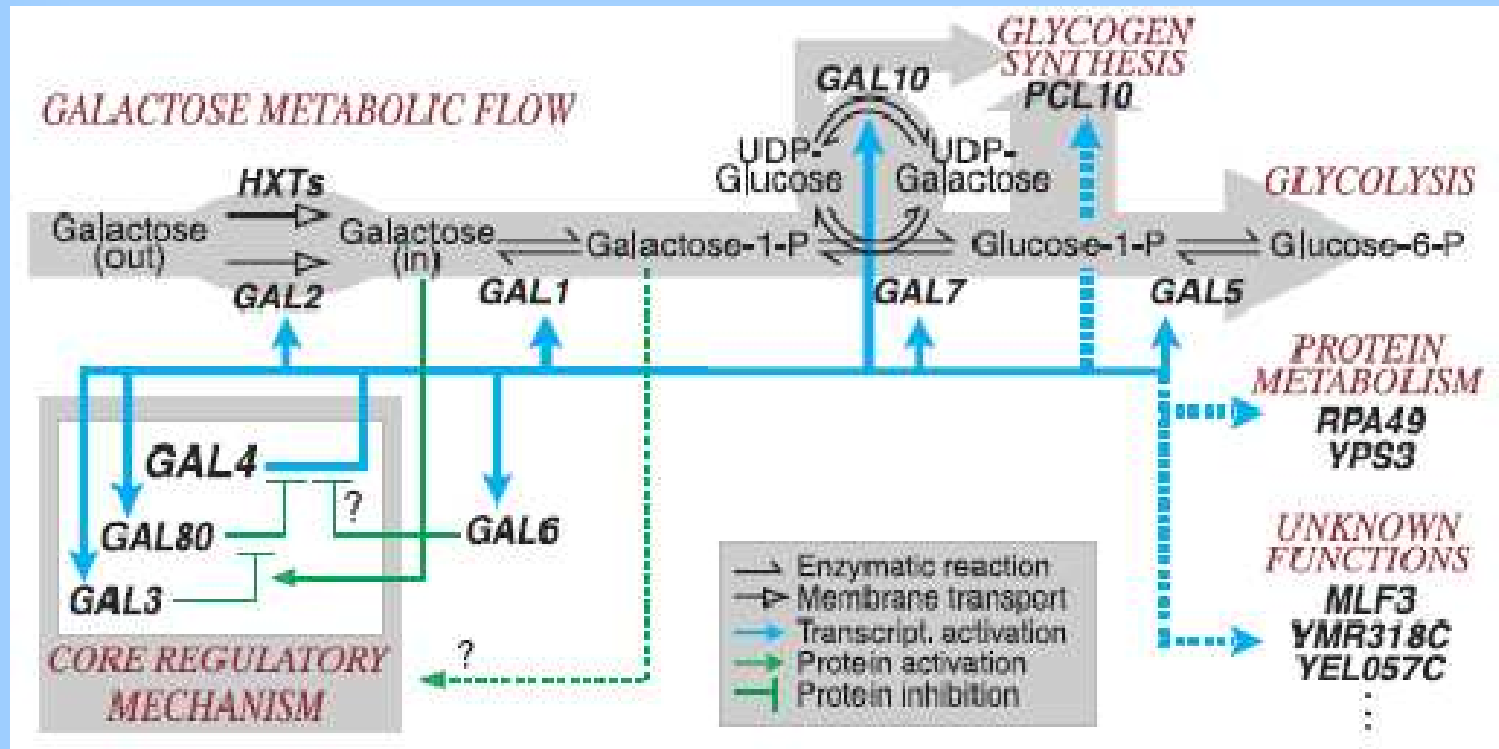
Gavin et al., Nature 415, 141 (2002)

# High-Performance Computing is Central to Systems Biology



T. Ideker, et al. 4 MAY 2001, SCIENCE 292.

## Integrated Genomic and Proteomic Analyses of a Systematically Perturbed Metabolic Network



➤ An integrated approach to build, test, and refine a model of a cellular pathway. Perturbations to critical pathway components are analyzed using DNA microarrays, quantitative proteomics, and databases of known physical interactions.

➤ 997 messenger RNAs responding to 20 systematic perturbations of the yeast galactose-utilization pathway, provide evidence that approximately 15 of 289 detected proteins are regulated posttranscriptionally, and identify explicit physical interactions governing the cellular response to each perturbation.

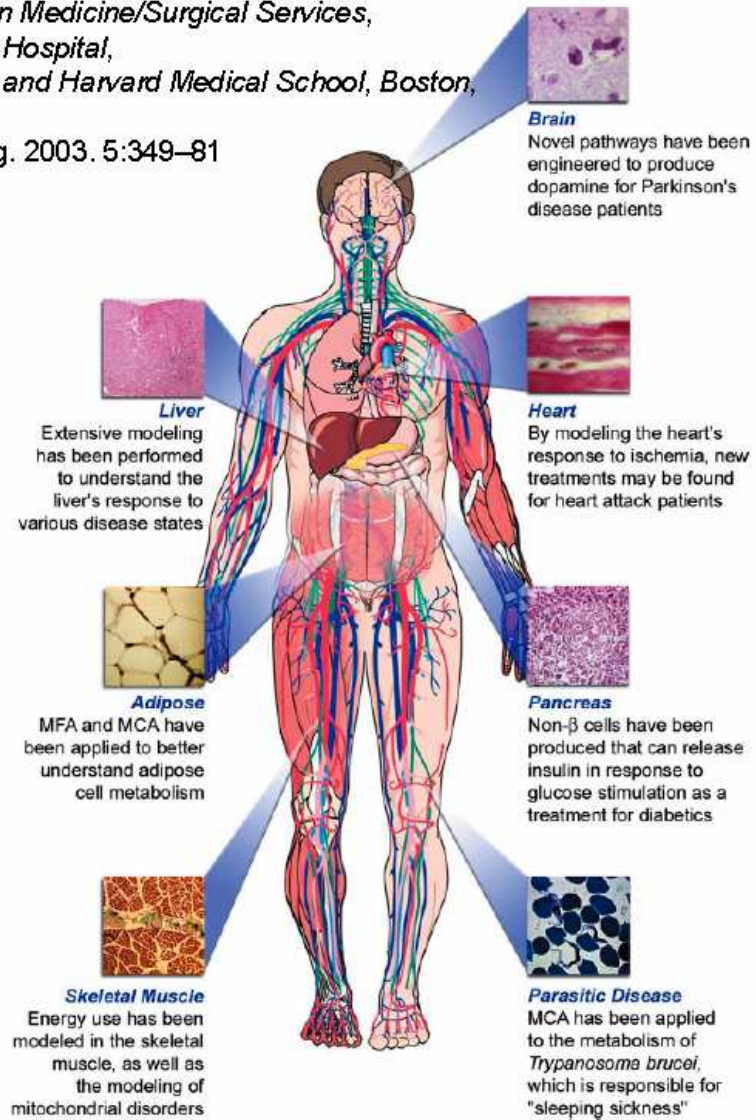
➤ The model was refined through further iterations of perturbation and global measurements, suggesting hypotheses about the regulation of galactose utilization and physical interactions between this and a variety of other metabolic pathways.

**METABOLIC ENGINEERING:** Advances in Modeling and Intervention in Health and Disease.

Martin L. Yarmush and Scott Banta.

*Center for Engineering in Medicine/Surgical Services,  
Massachusetts General Hospital,  
Shriners Burns Hospital and Harvard Medical School, Boston,  
Massachusetts.*

Annu. Rev. Biomed. Eng. 2003. 5:349–81





# National Systems Biology Programmes

INSTITUTE OF BIOLOGICAL RESEARCH & BIOTECHNOLOGY

NATIONAL HELLENIC RESEARCH FOUNDATION

- Research training at post graduate level, organization of workshops, seminars, invited lectures, graduate lectures at the School of Chem. Engin.NTUA, etc.
- Start and duration: 2005 - 2010
- Budget : 3.0 M€
- In the Medical and biotechnological area. Med: Cancer (colorectal and breast) ageing and Metabolic diseases (atherosclerosis, diabetes) environmental carcinogenesis, Biotech: biofuels, natural products (SysBio in *E. coli*, *algae* to mention some of the systems).
- Infrastructure funding : 0.7 M€ (LC MS/MS, Confocal microscopy, Grid)
- There is an interest of several big Hospitals of the public and private sector from the area of Athens (*personalised med*).

# e-Laboratory for Interdisciplinary Collaborative Research in Data Mining and Data-Intensive Sciences (e-LICO)

- Small/Medium-Scale Focused Research Project (STREP)  
Work programme topics:  
Objective ICT-2007.4.4: Intelligent Content and Semantics
- **Πρώτη πιλοτική προσπάθεια σε Ευρωπαϊκή κλίμακα μελέτης ασθενειών του «ουροποιητικού συστήματος», όπως καρκίνο του προστάτη, ουροδόχου κύστης, νεφρού, κ.ά μέσα από την ανάπτυξη κατάλληλων υπολογιστικών μεθοδολογιών και εργαλείων που εφαρμόζουν τις αρχές της Βιολογίας των Συστημάτων.**

Ο συνολικός προϋπολογισμός του έργου, που θα διαρκέσει 3 χρόνια (2009-2012) ανέρχεται σε

- 3 000 000 Euro

List of participants:

- 1. University of Geneva UNIGE (CH)
- 2. Institut National de la santé et de la recherche médicale INSERM (FR)
- 3. Medice Oy Medice (FIN)
- 4. National Hellenic Research Foundation NHRF (GR)
- 5. Rapid-I GmbH Rapid-I (DE)
- 6. University of Manchester UNIMAN (UK)
- 7. University of Zurich UNIZH (CH)

**Η συμβολή του IBEB αφορά στο σχεδιασμό της μεθοδολογίας συσχέτισης των διαφόρων τύπων μοριακών διαγνωστικών δεδομένων (γονιδιωματικά, πρωτεομικά, μεταβολομικά δεδομένα), με την εκδηλώση των παθολογικών καταστάσεων του ουροποιητικού συστήματος τόσο στο επίπεδο του κυττάρου όσο και στο επίπεδο του ασθενούς.**

Με τον τρόπο αυτό επιδιώκεται:

1. Η εξαγωγή αξιόπιστων βιοδεικτών προγνωστικού και διαγνωστικού χαρακτήρα. Οι δείκτες αυτοί αναφέρονται και ως κυτταρικές (γονιδιωματικές, πρωτεομικές, μεταβολομικές) υπογραφές.
2. Ο εντοπισμός και η περαιτέρω διασαφήνιση του λειτουργικού χαρακτήρα κρίσιμων κυτταρικών διεργασιών, όπως η φλεγμονή, η αγγειογένεση κλπ, που εμπλέκονται στο μηχανισμό γένεσης και εξέλιξης των ασθενειών του ουροποιητικού συστήματος,

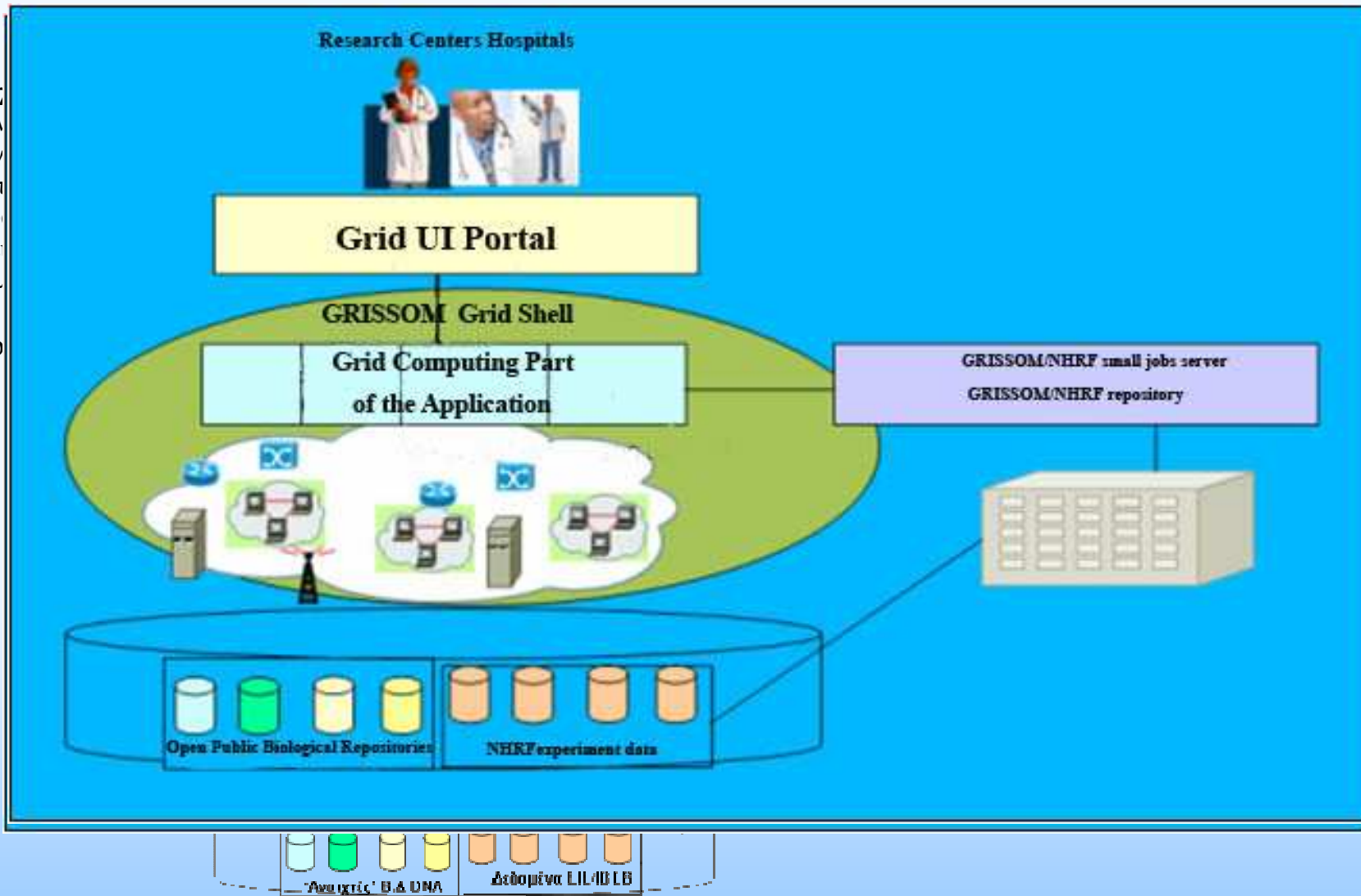
## **IBRB**

Our Institute is conducting global experiments in the fields of medical and biotech applications and is developing tools and mathematical methodologies in the fields of bioinformatics and computational biology, for the scope of simulation tasks:

- (i) **in metabolic engineering** (metabolic flux & control analysis, use of enzyme kinetics data at the system's level)
- (ii) **in functional genomics** (interpretation of microarray experiments, ChIP-Seq in collaboration with the University of Nijmegen, derivation of pathways exploiting GO terminology, promoter analysis)
- (iii) **in pathway analysis and derivation** (automated construction of metabolic and signaling pathways and superpathways) and
- (iv) **in the development of biomedical ontologies**

- **Technology Development for Systems Biology. GRID in Biological applications** as a part of the **Enabling Grids for E-science (EGEE)** infrastructure which is the largest multi-disciplinary grid infrastructure in the world, bringing together more than 120 organisations to produce a reliable and scalable computing resource available to the European and global research community. At present, it consists of 250 sites in 48 countries and more than 68,000 CPUs available to some 8,000 users 24 hours a day, 7 days a week.

Στόχοι  
Η ανάπτυξη  
πλέγας  
ανεξάρτητων  
πειραματικών  
είναι  
βιολογικών  
http



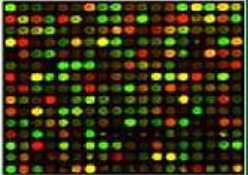
The GRISSOM Application - Experiment Submission - Step 1 - Microsoft Internet Explorer

File Edit View Favorites Tools Help

Address <https://195.251.6.234/biodatagrid/new/experiments/Step1.php> Go Links >>

# GRISSOM

GRids for In Silico Systems biology & Medicine



Personal Information ▾ Experimental Repository ▾ MicroArray Experiment ▾ Gene Ontology Analysis ▾ Log Out

Home  
General  
Publications  
Deliverables  
News  
GRISSOM Application  
GRISSOM Manual

Experiment Name  ?


Upload Experiment Data Manually

Image Software

Number of Experimental Conditions  ?

Select Experiment Data from Repository

<<Previous Reset Next

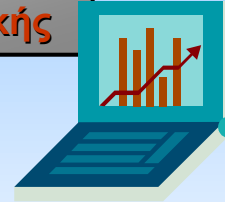


Done Internet

**Υπάρχοντα δεδομένα  
(πειραματικά δεδομένα,  
βιβλιογραφία)**



**Εργαλεία  
βιοπληροφορικής**



**Αναδόμηση  
μονοπατιών**



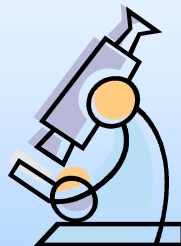
**Υπολογιστική  
μοντελοποίηση**



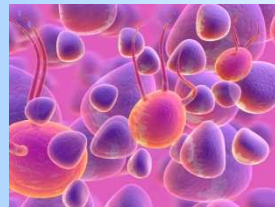
**Πειραματική  
επιβεβαίωση**



**Γνώση και  
κατανόηση  
βιολογικών  
λειτουργιών**

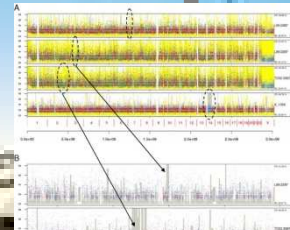


**Βελτίωση διαδικασιών,  
καταπολέμηση  
ασθενειών**

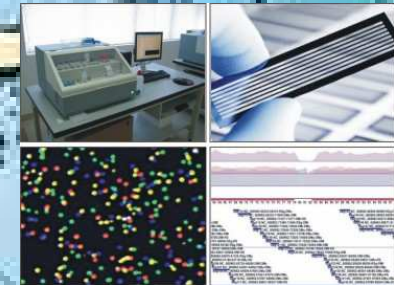
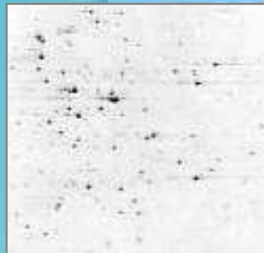


# Εξατομικευμένη Ιατρική

**Δεδομένα  
Μεταγραφομικής**  
(Γονιδιωματικές υπογραφές  
από αίμα, ορό, ούρα, ιστό)



**Γενωμικά Δεδομένα  
Σημειακών  
Νουκλεοτιδικών  
Πολυμορφισμών (SNP  
υπογραφές)**



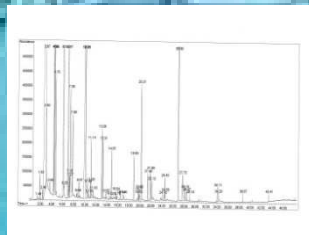
**Πρωτεομικά Δεδομένα**  
(Πρωτεϊνικοί Βιοδείκτες  
από αίμα, ορό, ούρα, ιστό)

**ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΦΑΙΝΟΤΥΠΙΚΗΣ &  
ΓΕΝΩΜΙΑΚΗΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΑΣ** (i. Εξατομικευμένη Βιο-

δεικτών (Biomarkers) που θα συνδέουν το φαινότυπο με το  
βιολογικά προφίλ. II Ανάπτυξη εξατομικευμένων  
φαρμάκων και δοσολογιών)

**In-silico μοντέλα της ανθρώπινης  
φυσιολογίας / Αποθετήρια ασθενειών**  
**Τεχνολογίες Εξόρυξης δεδομένων,**  
μεθοδολογίες ταξινόμησης, σημασιολογική  
ανάλυση, βάσεις δεδομένων, επεξεργασία  
σημάτων, μοντελοποίηση πολλών μεταβλητών,  
απόδοσή σε εφαρμογές Βιοιατρικής

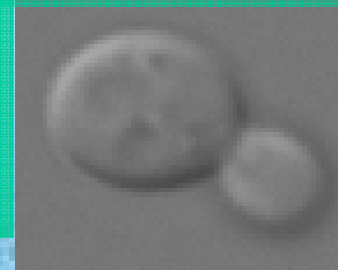
**Δεδομένα Επιγενωμικής**  
(Γενωμικές αναλύσεις  
ανοσοκατακρύμνισης  
χρωματίνης από αίμα, ορό,  
ούρα, ιστό)



**Μεταβολομικά  
Δεδομένα**  
(Μεταβολομικές υπογραφές  
από αίμα, ορό, ούρα, ιστό)

**Δεδομένα ροών βιοχημικών δικτύων**  
(χαρακτηριστικές μεταβολές σε προφίλ ροών)

**Κυτταρική Ιστολογική  
ποσοτική απεικονιστική**  
(Βιοψίες)





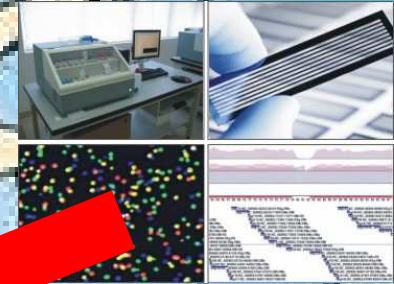
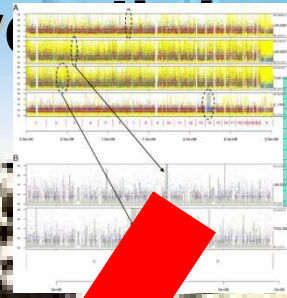
# Translation of laboratory findings into diagnostic, therapeutic and preventive applications

Transcriptomic

Data (Genomic signatures from blood, serum, tissue samples)



Genome wide SNP Data (SNP signatures)

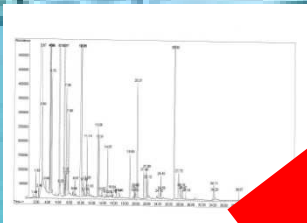


ΕΠΕΞΕΤΙΣΗ ΦΑΙΝΟΤΥΠΙΚΗΣ & ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΑΣ (I).  
Ανάπτυξη βιο-δεικτών (Biomarkers) που θα συνδέουν  
αλλαγές με βιολογικά προφίλ. II Ανάπτυξη εξατομικευμένων  
φαρμάκων και δοσολογιών

multi-scale in-silico models of human  
physiology / Disease Repositories  
Data mining, knowledge discovery tool, semantic  
integration, databank, biomedical imaging,  
modelling, simulation and visualisation techniques,  
HealthGrid

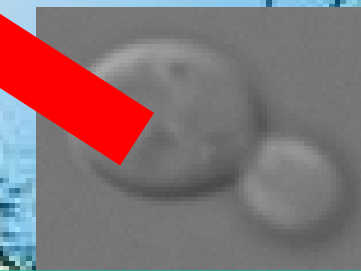
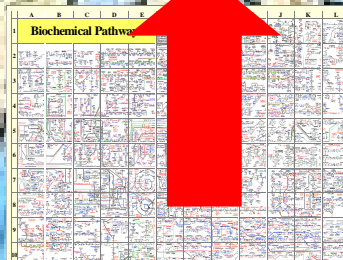
Epigenomic Data (Genome wide ChIP assays from blood, serum, tissue samples)

Proteomic Data (Protein Biomarkers from blood, serum, tissue samples)



Patient Data (clinical records)

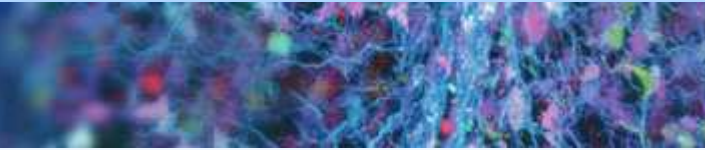
Metabolomic Data (Metabolomic signatures from blood, serum, tissue samples)



Cell /Histological quantitative Imaging (biopsic samples)

Fluxomic Data (characteristic flux pattern changes)

**SCHIZOPHRENIA**  
RESEARCH FORUM  
A CATALYST FOR CREATIVE THINKING



<http://www.schizophreniaforum.org/res/sczgene/default.asp>

## Schizophrenia Gene Statistics

Studies: 1575

Genes: 925

Polymorphisms: 8034



<http://www.alzgene.org/>

## Alzheimer Gene Statistics

Studies: 1355

Genes: 660

Polymorphisms: 2822

**Τίτλος Πρότασης: «Εφαρμογή των αρχών της βιολογίας συστημάτων στην μελέτη των μειζόνων ψυχικών διαταραχών: Ψηφιακή καταγραφή και μοντελοποίηση με στόχο την ανάπτυξη εξατομικευμένων θεραπευτικών στρατηγικών»**

Συνεργαζόμενες ομάδες:

- Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας ΕΙΕ και Σχολή Χημ/κών Μηχ/κών ΕΜΠ
- Ειδική Μονάδα Αποκατάστασης και Επαγγελματικής Επανάταξης (ΕΜΑΕΕ) του Ερευνητικού Πανεπιστημιακού Ινστιτούτου Ψυχικής Υγείας (ΕΠΨΥ) Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών
- Τμήμα Πληροφορικής με εφαρμογές στην Βιοϊατρική, Πανεπιστήμιο Στερεάς Ελλάδος
- Εξωτερικοί Συνεργάτες, Πανεπιστήμιο Örebro Σουηδίας & King's College, London, Center for Bioinformatics

**Το συγκεκριμένο πρόγραμμα αποβλέπει στη δημιουργία ολοκληρωμένου προγράμματος υπηρεσιών υγείας που θα αξιοποιεί την ανάπτυξη και προώθηση ενός φάσματος καινοτόμων προσεγγίσεων στην μελέτη των μειζόνων ψυχικών διαταραχών.**

Μέσα από την πολυεπίπεδη ψηφιακή καταγραφή και μοντελοποίηση θα επιχειρηθεί:

- (α) η ανάπτυξη **εξατομικευμένων θεραπευτικών στρατηγικών**, και
- (β) η ανάπτυξη **εξατομικευμένων διαγνωστικών μεθόδων πρόβλεψης της εξέλιξης της νόσου**,

με βάση το επιδημιολογικό προφίλ ενός πληθυσμού ασθενών με διάφορους τύπους ψυχικών νόσων (σχιζοφρένεια, διπολική διαταραχή, κα).

Η βιο-ιατρική επεξεργασία θα στηριχθεί στην ανάλυση:

1. **μοριακών δεδομένων** (βιοχημικοί, μεταβολικοί δείκτες),
2. **γενετικών δεδομένων** (γενετικοί πολυμορφισμοί, γονιδιωματική έκφραση)
3. **απεικονιστικών δεδομένων** (ηλεκτρο εγγεφαλογραφήματα (EEGs),
4. **Λειτουργική Μαγνητική Τομογραφία (fMRIs)**,
5. **φαινομενολογικών ιατρικών δεδομένων** (ψυχομετρικές μετρήσεις γνωσιακών δεξιοτήτων, καθώς και κλίμακες εργασιακών δεξιοτήτων, αξιολόγησης αυτοστιγματισμού ασθενών και ποιότητας ζωής τους).

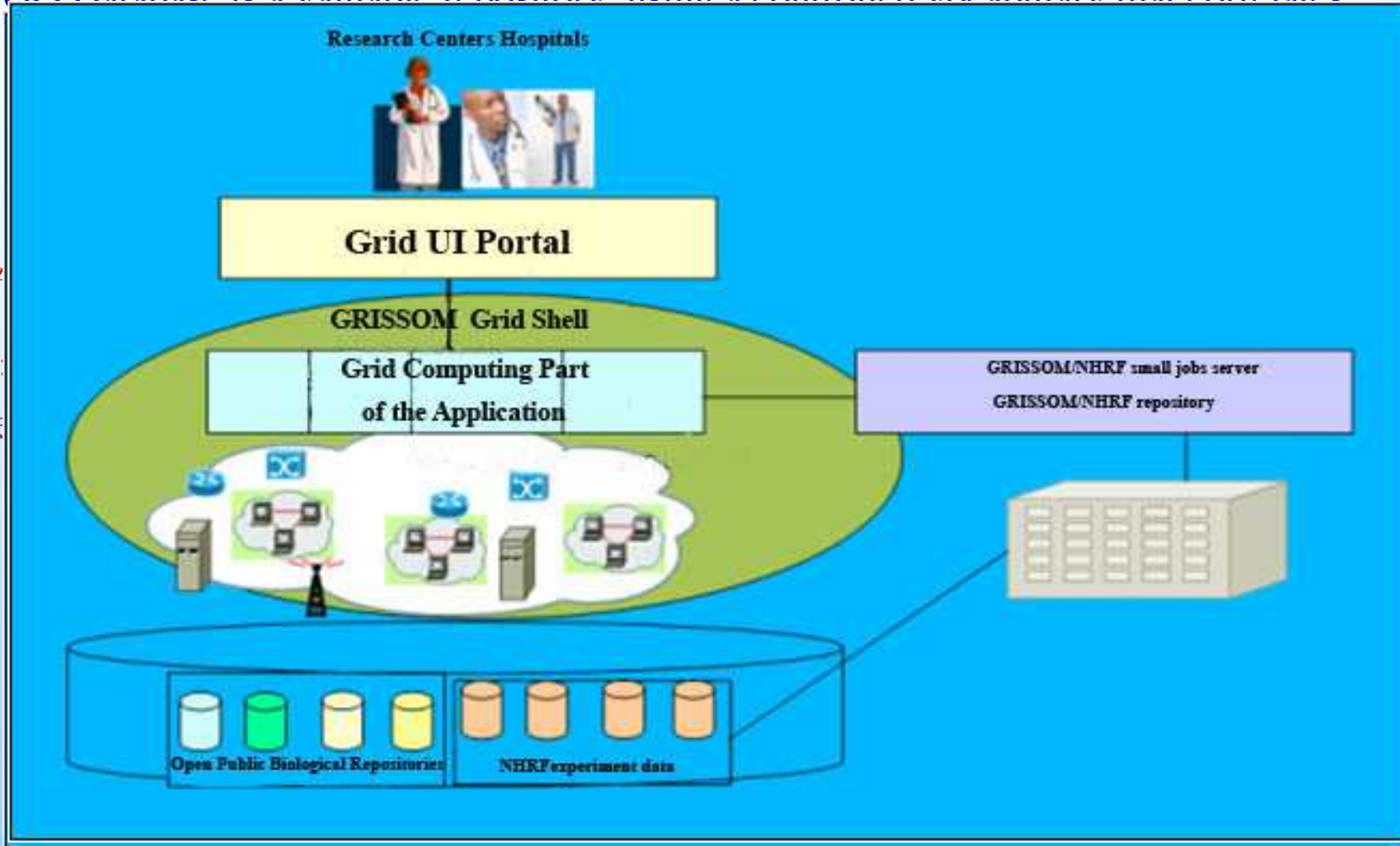
**Με τελικό στόχο την ευφυή διαχείριση, συσχέτιση και ερμηνεία των πολυεπίπεδων και ετερογενών όγκων δεδομένων που σχετίζονται με τις ψυχικές νόσους που θα ερευνηθούν για την «ανάπτυξη στρατηγικών εξατομικευμένης διάγνωσης/θεραπείας».**

Στα πλαίσια του συγκεκριμένου προγράμματος θα αξιοποιηθούν:

- Οι πλέον σύγχρονες τεχνολογίες διαδικτυακής επικοινωνίας και ανταλλαγής πληροφοριών/δεδομένων ασθενών, (ολοκληρωμένη διαχείριση Ηλεκτρ. Φακέλλων Ασθενών- Ηλεκτρ. Κάρτες)
- Μεθοδολογίες ανάλυσης και διαχείρισης, πειραματικών βιοιατρικών δεδομένων,
- Εξαγωγής και παρακολούθησης προγνωστικών και διαγνωστικών βιοδεικτών,
- Κατηγοριοποίησης φαινοτύπων,
- Αξιολόγησης θεραπευτικών προσεγγίσεων.

# The Gene Ontology (GO) database

- GO Database is a valuable repository using a controlled vocabulary that correlates



Special Issue

# FEBS *Letters*

Systems Biology

Understanding the biological mosaic

Edited by  
Robert Russell  
and  
Giulio  
Superti-Furga

$$\frac{dS}{dt} = \lim_{\Delta t \rightarrow 0} \frac{\Delta S}{\Delta t}$$

Published by Elsevier on behalf of  
the Federation of European Biochemical Societies  
ISSN 0.014 5793

Volume 579  
Number 8  
21 March 2005

## Where Are We Going ?

We are approaching a time in which we can begin to look at cells and organisms holistically.

Biology will require a transition from a Deterministic to a Stochastic approach.

**Εφαρμογές των αρχών της  
Συστημικής Βιολογίας  
στη μελέτη της δράσης  
φυτοχημικών ενώσεων**

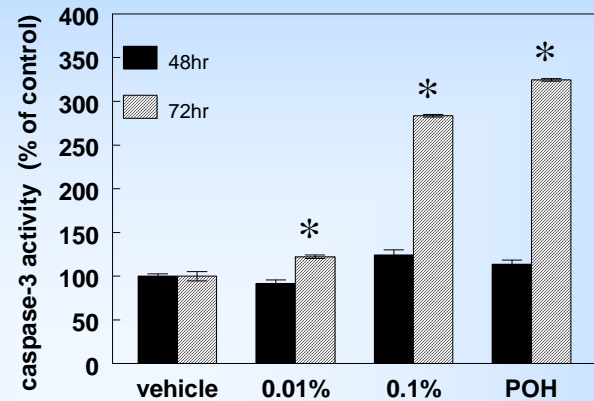
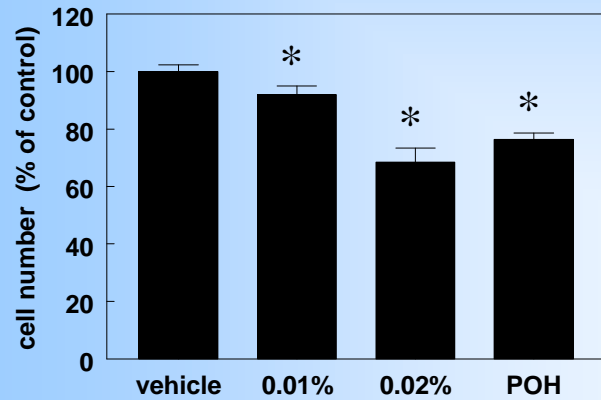


## Chemical composition of mastic oil

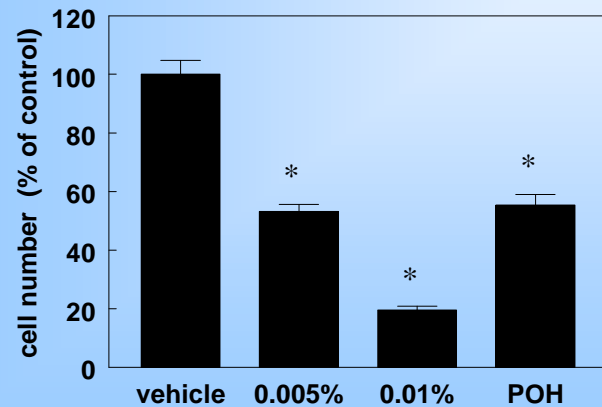
Component	Concentration (%)	Component	Concentration (%)
$\alpha$ -Pinene	77.1	2-Nonanone	0,03
$\beta$ -Myrcene	12.27	$\alpha$ -Terpineole	0,35
$\beta$ -Pinene	2,46	Methyl-eugenol	0,02
Camphene	1,04	Methyl-iso-eugenol	0,25
Caryophyllene	1,47	Myrtenal	0,13
Limonene	0,95	Myrtenol	0,09
Perillyl alcohol	0,84	o-Crezol-methyl-ether	0,44
6-Methyl-5-hepten-2	0,01	Bornyl Acetate	0,18
trans-Carveol	0,04	Perillen	0,34
$\gamma$ -Terpinene	0,08	Linalool	0,48
10-hydro- $\pi$ -Cymene	0,01	$\pi$ -Cymene	0,13
$\delta$ -Cadinene	0,01	Terpinolene	0,05
$\alpha$ -Copaene	0,01	Not Identified	0,99
Anthole	0,23		

# Mastic oil inhibits tumor cell proliferation and survival

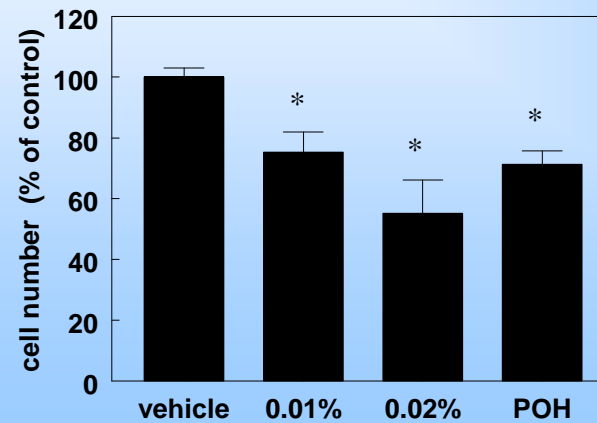
## K562 human lymphoblastomas



## B16 mouse melanomas



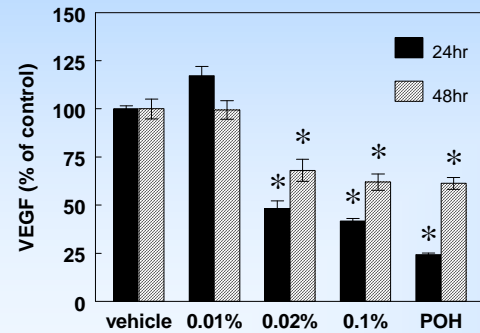
## LLC mouse adenocarcinomas



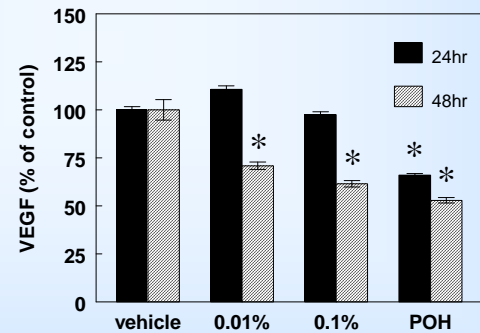
# Effects of mastic oil on angiogenesis

## 1. Mastic oil down-regulates VEGF release from tumor cells

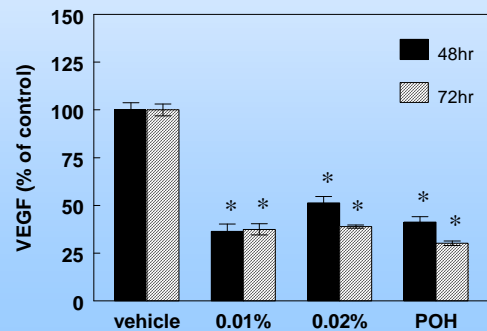
K562 human lymphoblastomas



B16 mouse melanomas

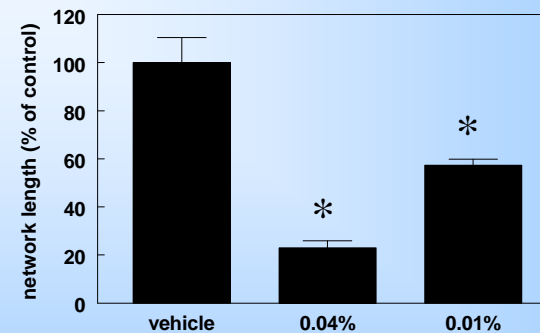
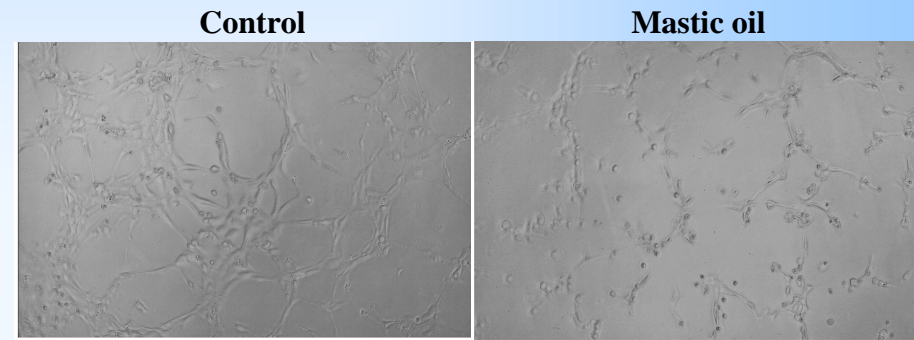
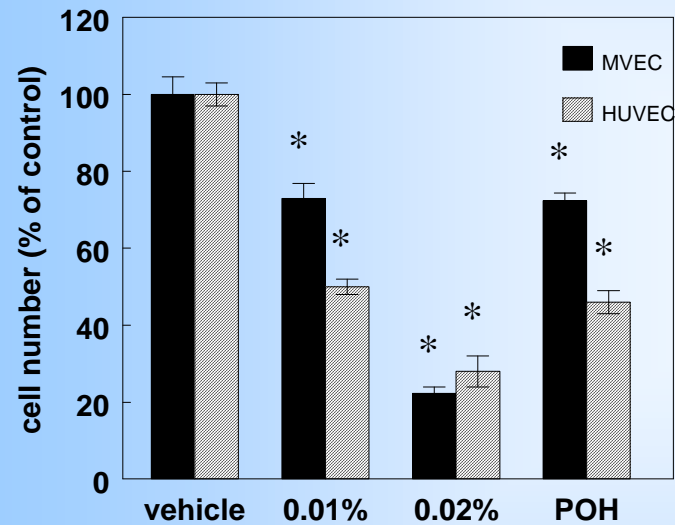


LLC mouse adenocarcinomas



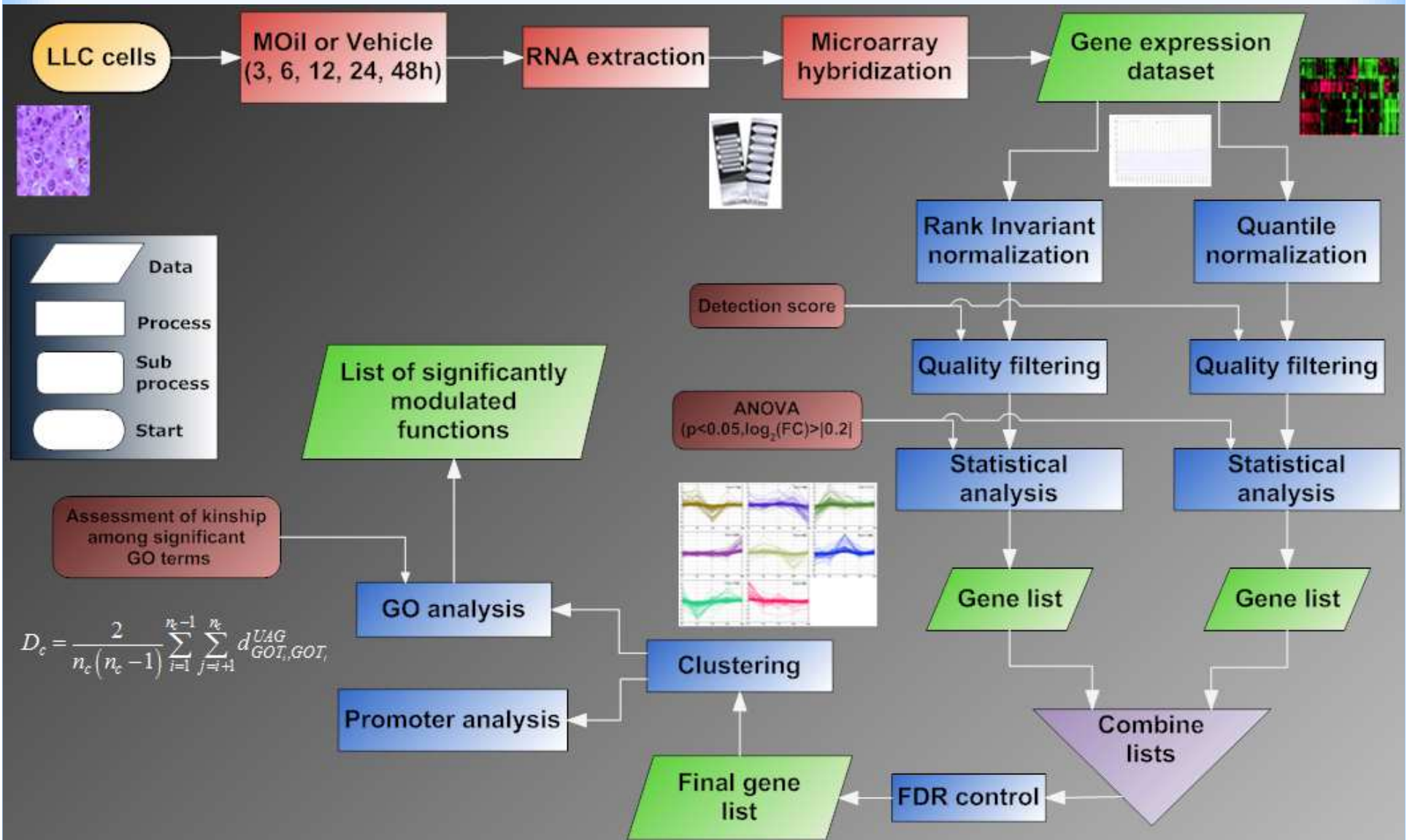
# Effects of mastic oil on angiogenesis

## 2. Mastic oil attenuates EC proliferation and EC organization into vessel-like structures



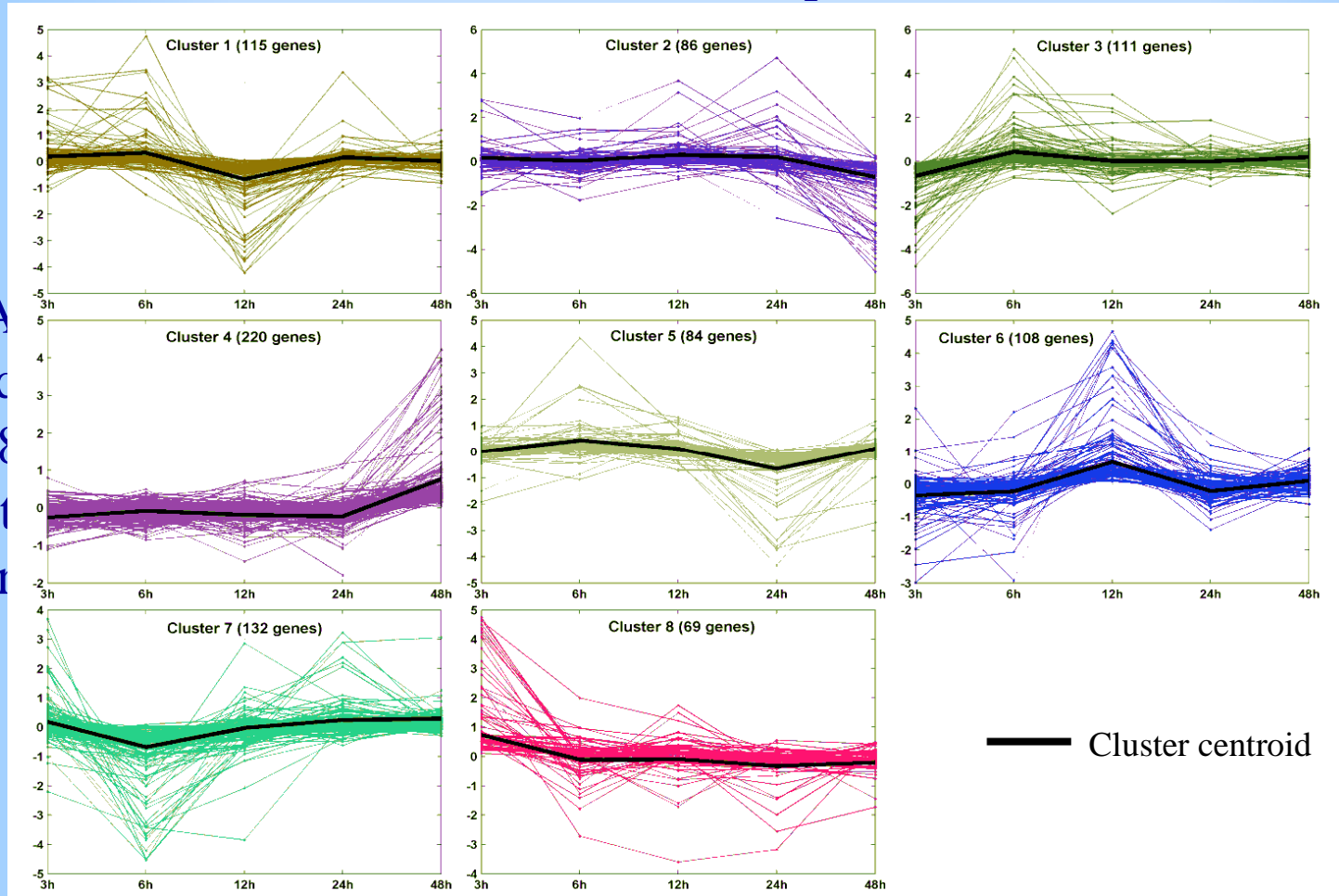
**AIM:** To analyze the global tumor cell response to mastic oil treatment at the gene expression level and identify potential molecular mechanisms underlying chemoprevention by mastic oil

# Data generation and analysis workflow



# Microarray Analysis – Statistical Selection

Among all time points: ANOVA on  $\log_2$  transformed fold changes (each



• A  
ic  
(8  
st  
fr

below

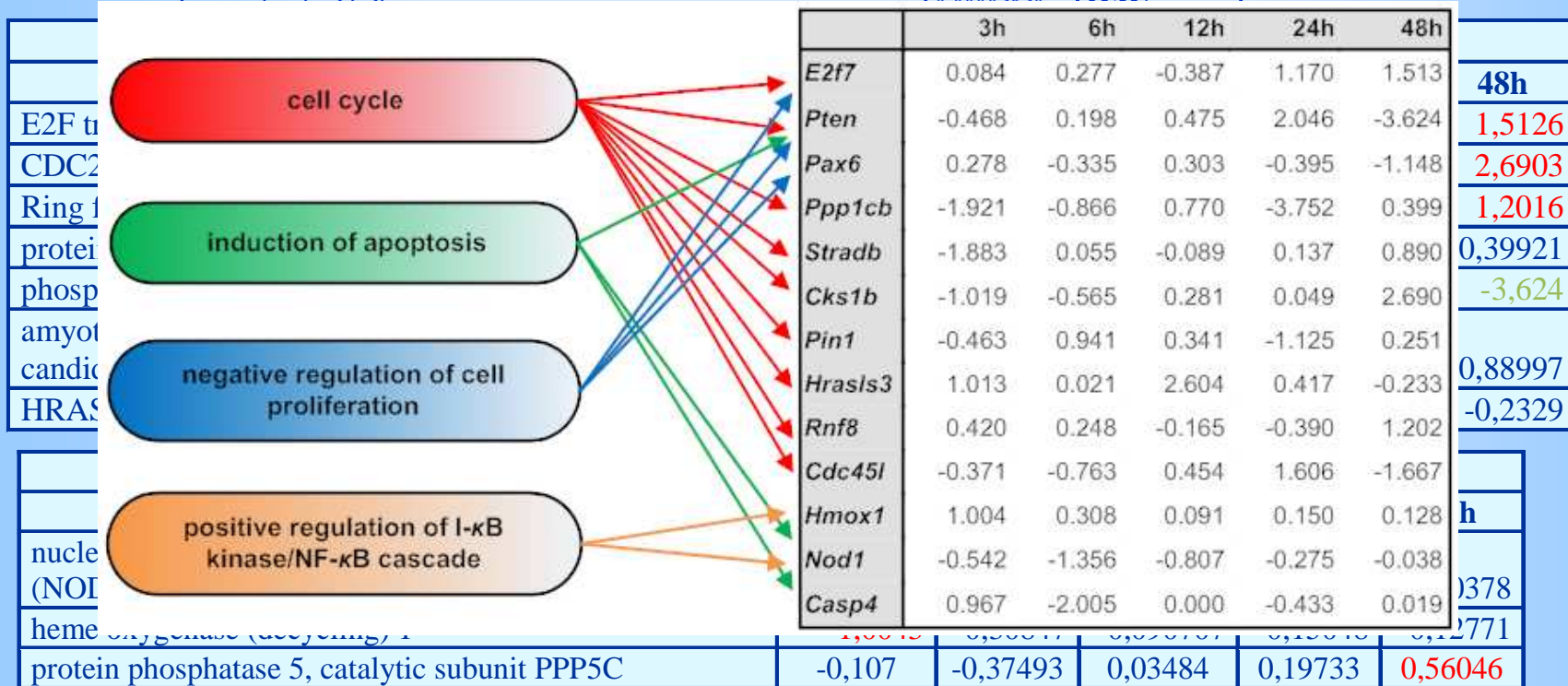
to  
clusters  
the Gap  
ing

GO Annotation	HT p-value	Enrichment
kinase binding	0.00000134	4/11

### Negative regulation of cell proliferation

	3h	6h	12h	24h	48h
phosphatase and tensin homolog (PTEN)	-0,46838	0,19844	0,47491	2,0455	-3,624
E2F transcription factor 7	0,083546	0,27744	-0,38691	1,1698	1,5126

acyltransferase activity	0.00005379	14/224
--------------------------	------------	--------



### Induction of apoptosis

	3h	6h	12h	24h	48h
caspase 4, apoptosis-related cysteine peptidase	0,96721	-2,0045	0	-0,4330	0,01881
nucleotide-binding oligomerization domain containing 1 (NOD1)	-0,5418	-1,3564	-0,80695	-0,2754	-0,0379
phosphatase and tensin homolog (PTEN)	-0,46838	0,19844	0,47491	2,0455	-3,624

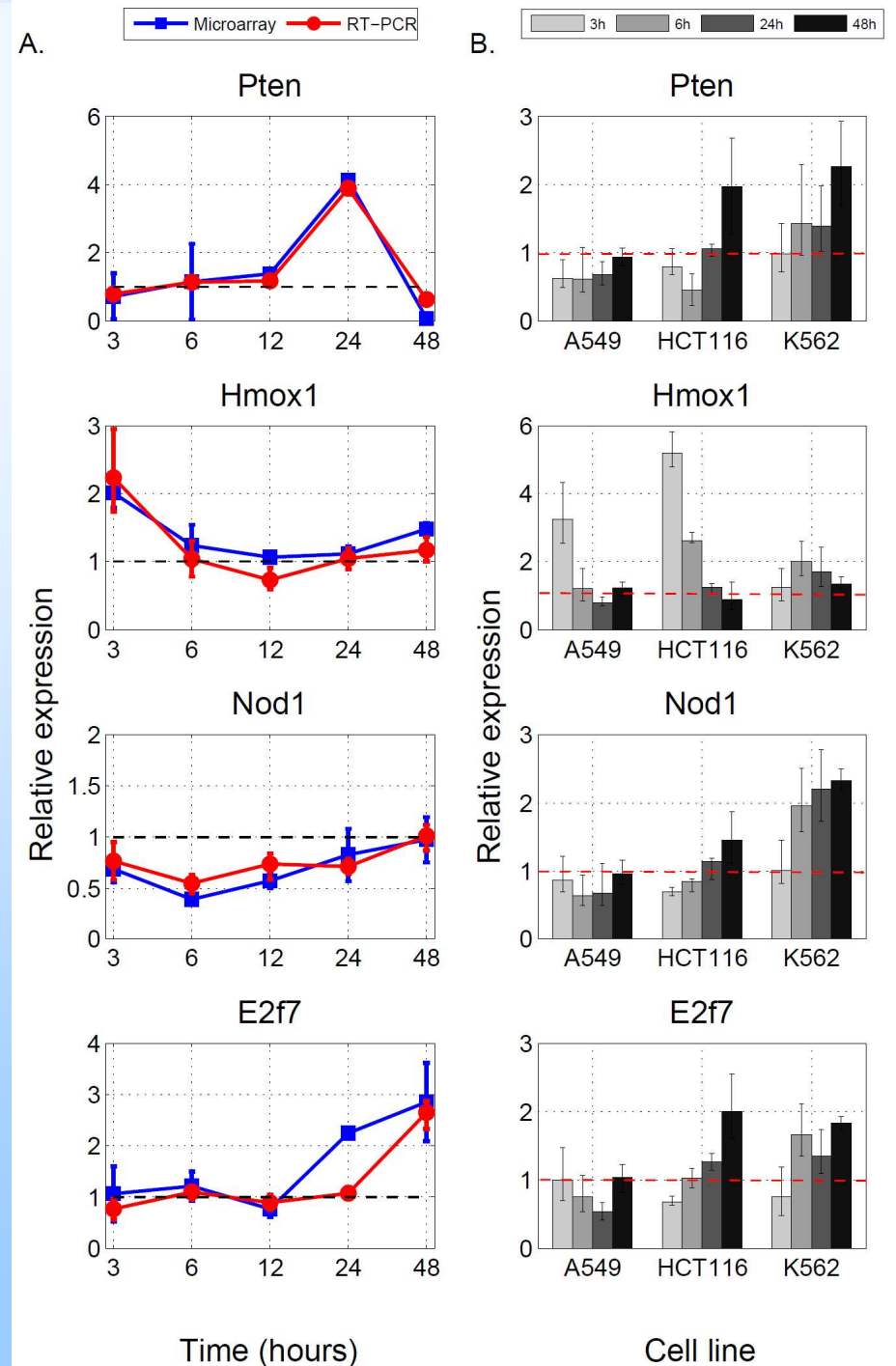


# Discussion

- *Pten* may be considered essential upstream effect accounting for anti-proliferative, pro-apoptotic and anti-inflammatory actions of mastic oil through blockade of AKT and NF- $\kappa$ B transcriptional activity
  - Inhibitory role in cancer expansion and metastasis (Baker, 2007, Salmena et al., 2008)
  - Blockade of PI3K/AKT signaling preventing AKT from phosphorylating a plethora of targets to activate cell cycle, prevent apoptosis and trigger NF- $\kappa$ B signaling (Song et al., 2005, Simpson et al., 2001, Manning et al., 2007)
- *E2f7* is a transcription factor that has been shown to act as a repressor of several genes known to promote tumor cell proliferation (de Bruin et al., 2003)
- Up-regulation of *Hmox1* along with modification of glutathione transferase activity (GO analysis) support that activation of detoxifying enzymes might also contribute to cancer chemoprevention by mastic oil (de Bruin et al., 2003)
  - Has been shown to exert anti-oxidative and anti-inflammatory activities attributed to inhibition of pro-inflammatory mediators and negative regulation of NF- $\kappa$ B signaling (Prawan et al., 2005, Oh et al., 2006)
  - Known to be involved in the process of xenobiotic metabolism (Giudice et al., 2006)
- )

# RT-PCR validation

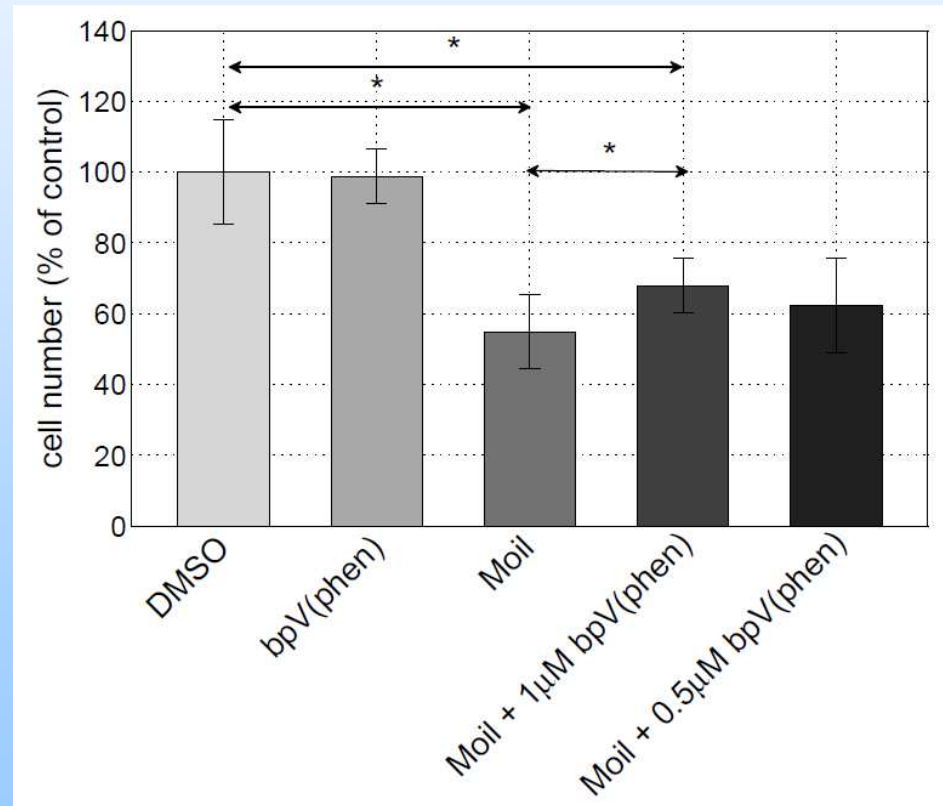
- 4 genes (*Pten*, *Hmox1*, *Nod1*, *E2f7*) belonging to multiple GO categories of interest chosen for RT-PCR validation
  - Using LLC cells, presenting good correlation with microarray data
  - In 3 human cancer cell lines, namely lung adenocarcinoma (A549), colon carcinoma (HCT116) and erythromyeloblastoid leukaemia (K562), in order to investigate whether alterations are specific for mouse LLC cells or imply a more general cancer cell response to mastic oil treatment
    - *Pten* late induced in K562 and HCT116 cells in agreement with LLC cells but no response in A549 cells
    - *Hmox1* early induced in all 3 cell lines in agreement with 3h induction in LLC cells
    - *Nod1* elevated in contrast with LLC cells and no significant response in A549 cells
    - *E2f7* late induced in K562 and HCT116 cells, in line LLC cells but it is not significantly modified in A549 cells

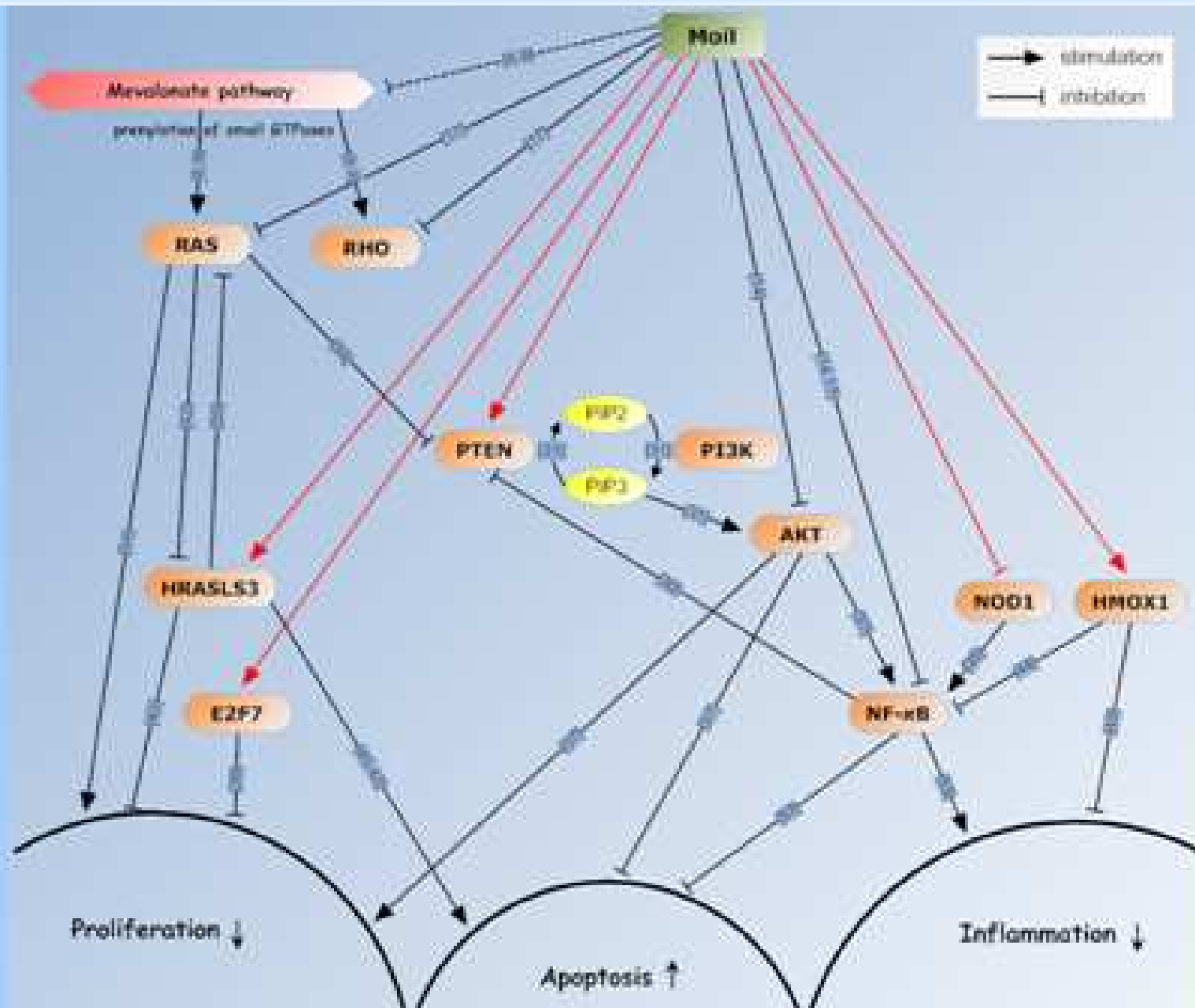


# PTEN mediates tumor cell growth inhibition by mastic oil

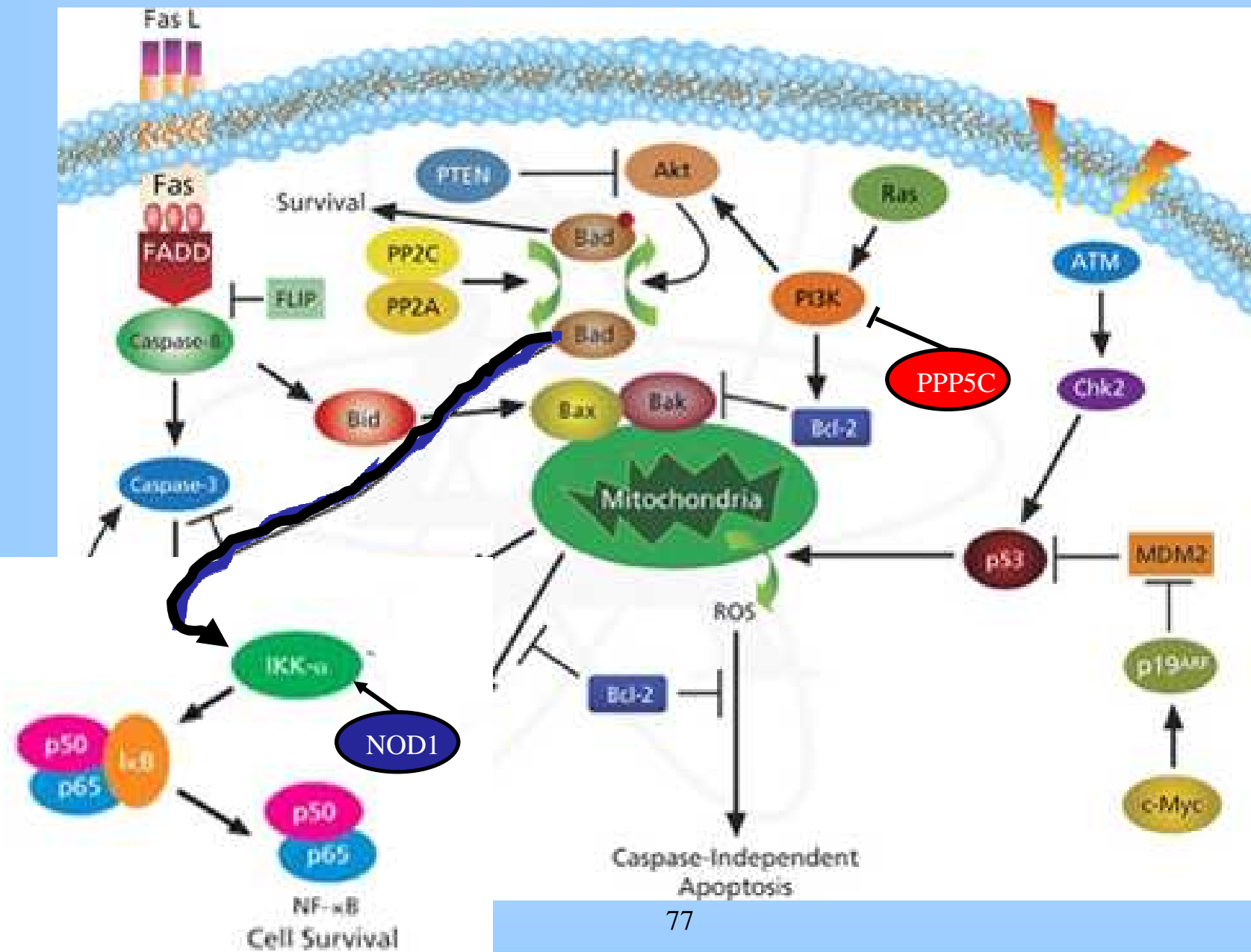
- PTEN has a reported role of as a key negative regulator of the PI3K-AKT survival pathway (Song et al., 2005)
- *Pten* mastic oil observed induction in LLC and 2 different human tumor cell lines → investigate whether inhibitory effects of mastic oil on tumor cell growth are mediated by PTEN

- Dividing K562 cells treated with mastic oil in the presence/absence of bpV(phen) (specific PTEN inhibitor)
- Mastic oil induced decrease in cell number, partially reversed in the presence of inhibitor in a concentration-dependent manner





A transcriptomic computational analysis of msi1-treated Lewis lung carcinomas reveals molecular mechanisms targeting tumor cell growth and survival. P. Moulos, D. Papadimitriou, A. Chatzicannou, M. Loutrari, C. Roussos, F. N. Kollias (in press BMC Medical Genomics), 2009.

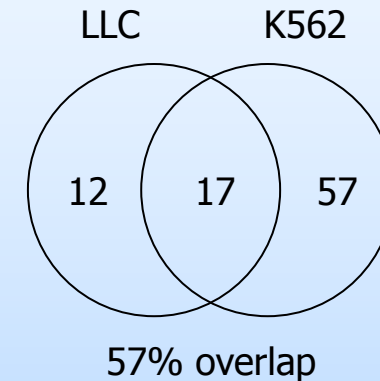
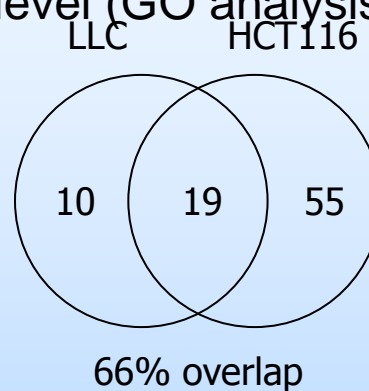
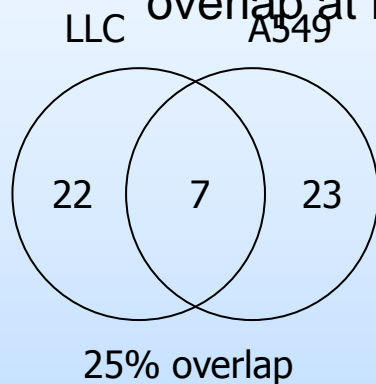


# Conclusions

- Bioinformatic Analysis through the use of novel tools (Gene ARMADA and RankGO) enables the identification of key pathways associated with regulation of important cellular functions:
- Genes and pathways derived through exhaustive rounds of analysis exhibited a significant relationship with experimental evidence supporting that mastic oil inhibits tumor cell growth by **negative regulation of cell cycle and induction of apoptosis (E2F7↑, PTEN↑, PPP5C↑, NOD1↓)**
- **Potential molecular mechanisms through which mastic oil may exert its effects were associated:**
  - **in EC with a reduction in the levels of the active form of RhoA**
  - **in K562 leukemic cells with an inhibition of Erk1/2 activation**
  - **in LLC cells with prevention of NF-κB activation**

# Microarray analysis in 3 human cancer cell lines

- RNA from the 3 human cancer cell lines (A549, HCT116, K562) in two time points of mastic oil and vehicle treatment was subjected to microarray hybridization
- Preliminary analysis shows little overlap with LLC cells at the gene level but overlap at functional level (GO analysis)



cell division
oxidoreductase activity
electron transport
nucleotide catabolic process
cell cycle
catalytic activity
kinase activity

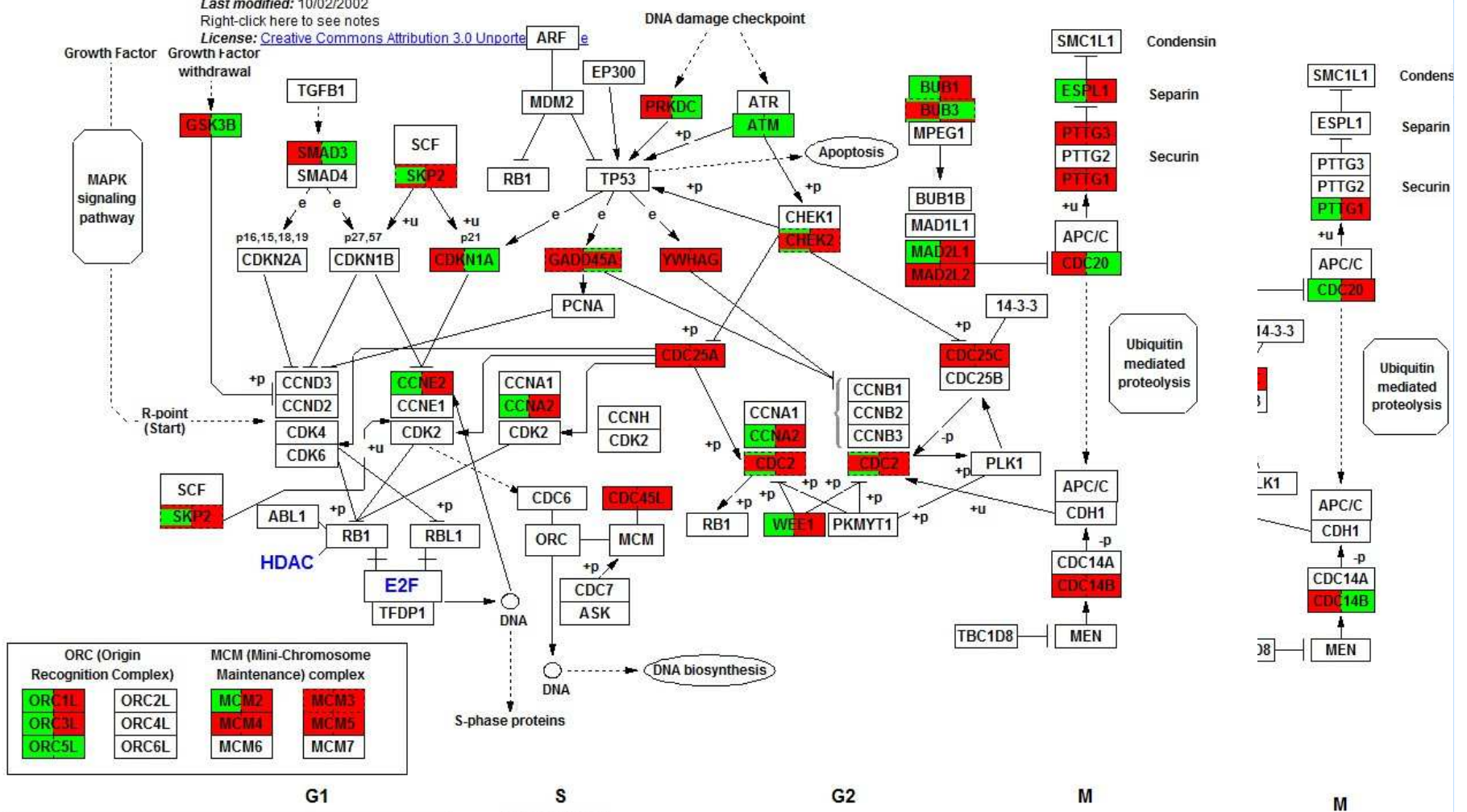
cell cycle
DNA replication
kinase activity
apoptosis
transcription coactivator activity
oxidoreductase activity
ubiquitin cycle
protein catabolic process
magnesium ion binding
cell division
regulation of transcription from RNA polymerase II promoter
transcription factor binding
transcription from RNA polymerase II promoter
fatty acid metabolic process
transcription from RNA polymerase II promoter
ubiquitin-protein ligase activity
negative regulation of transcription

DNA replication
cell cycle
oxidoreductase activity
cell division
apoptosis
electron transport
ubiquitin-protein ligase activity
magnesium ion binding
negative regulation of transcription
NADH dehydrogenase activity
kinase activity
transcription from RNA polymerase II promoter
regulation of transcription from RNA polymerase II promoter
regulation of cell growth
acyltransferase activity
anti-apoptosis
G2/M transition of mitotic cell cycle

# Cell cycle targeted in human end LCC

Author: Adapted from KEGG  
 Maintained by: GenMAPP.org  
 E-mail: genmapp@gladstone.ucsf.edu  
 Last modified: 10/02/2002  
 Right-click here to see notes  
 License: [Creative Commons Attribution 3.0 Unported](https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/)

## Cell cycle



ORC (Origin Recognition Complex)		MCM (Mini-Chromosome Maintenance) complex	
ORC1L	ORC2L	MCM2	MCM3
ORC3L	ORC4L	MCM4	MCM5
ORC5L	ORC6L	MCM6	MCM7

Histone Deacetylases		Transcription Factor E2F	
HDAC1	HDAC5	E2F1	RBL1
HDAC2	HDAC6	E2F2	E2F6
HDAC3	HDAC7A	E2F3	UBE2F
HDAC4	HDAC8	E2F4	
		E2F5	

**Gene Database**  
 Hs-Std\_20070817.gdb  
**Expression Dataset**  
 Name: K\_ANOVA\_GenMAPP  
 Color Sets:  
 12h  
 24h  
 Gene

**Legend: 12h**  
 ■ Up-regulated 12h  
 ■ Down-regulated 12h  
 □ No criteria met  
 □ Not found

**K562**



## Cell division common target in human cell lines

Cell line	A549		HCT1 16		K562	
Time (h)	12	2 4	12	2 4	12	2 4
Deregulation						

Mitotic related functions down-regulated in A549 cells

GO term	12 h	24 h
mitosis		
mitotic spindle organization		
microtubule based movement		
microtubule motor activity		
mitotic cell cycle spindle assembly checkpoint		
spindle organization		
mitotic chromosome condensation		

# Common target functions between

## Cholesterol Biosynthesis

### Fatty Acid Degradation

#### Gene Database

Mm-Std\_20070514.gdb

#### Expression Dataset

Name: K\_ANOVA\_GenMAPP

Color Sets:

12h

24h

Gene

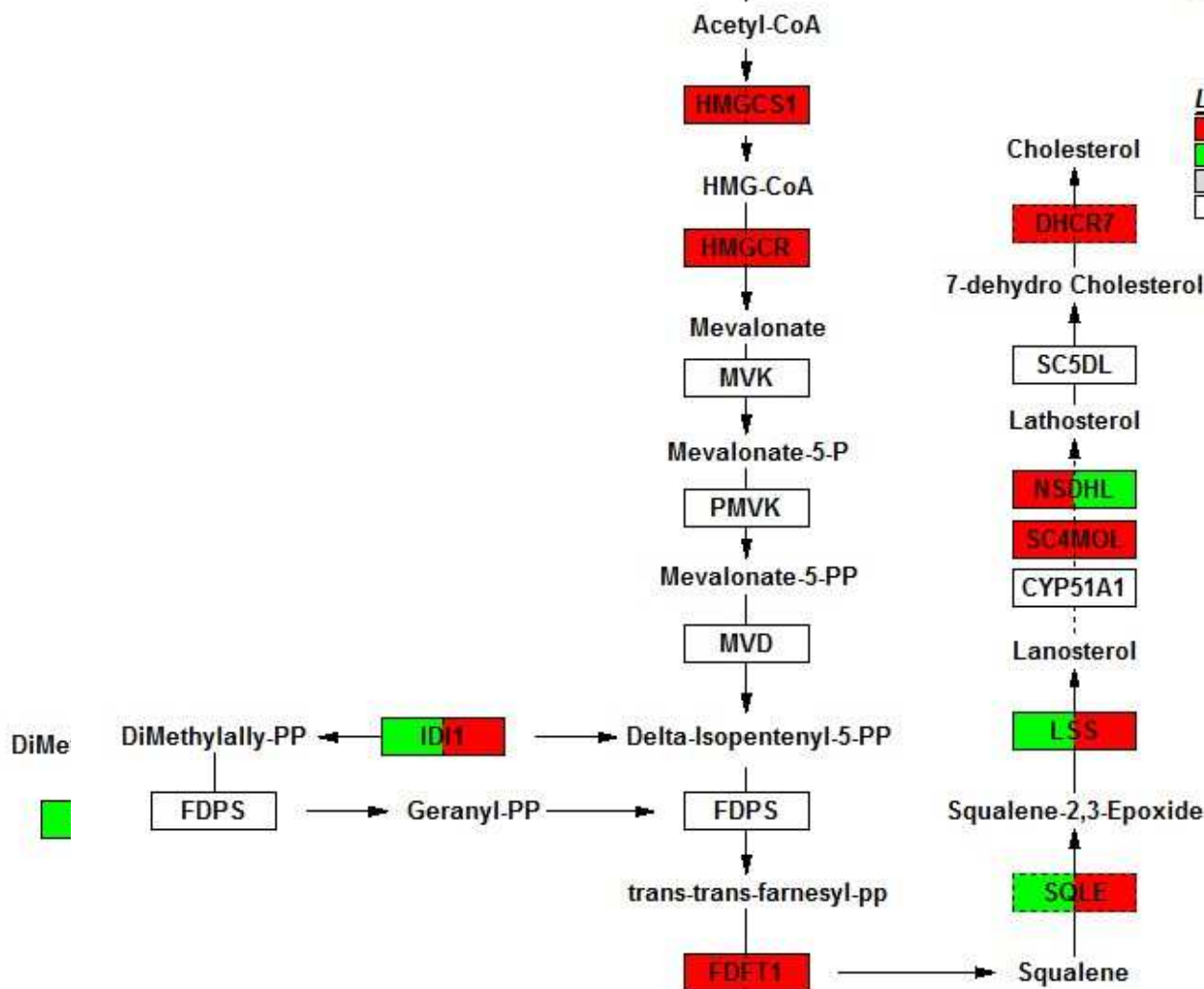
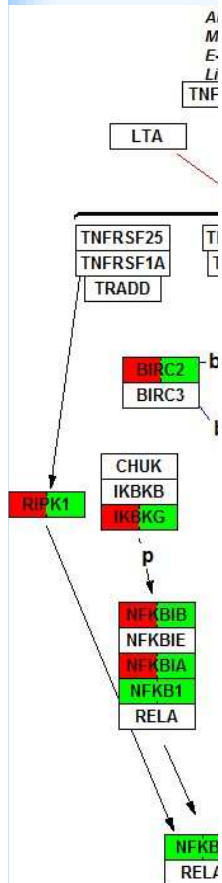
#### Legend: 12h

Up-regulated 12h

Down-regulated 12h

No criteria met

Not found



Activator of Cell Death  
Inhibitor of Cell Death

K562

562

## Experimental Procedure

Confluent Lewis lung carcinoma cells



Vehicle or Mastic oil (0.01% v/v)  
treatment for 3,6,12,24,48h



Collection, total RNA extraction (Trizol plus)



Microarray (ILLUMINA)



Normalization, statistical and  
functional analysis

## A genomic microarray analysis to study the anticancerous effect of natural compounds : the case of mastic oil

- Statistical selection
  - Individual time points: t-test on  $\log_2$  transformed intensities between each time point and the respective control with p-value threshold set to 0.05.
  - Paired Analysis for each time point with its control (t-test) yielded a total of 320 DE genes (106 over-expressed , 214 under- expressed)

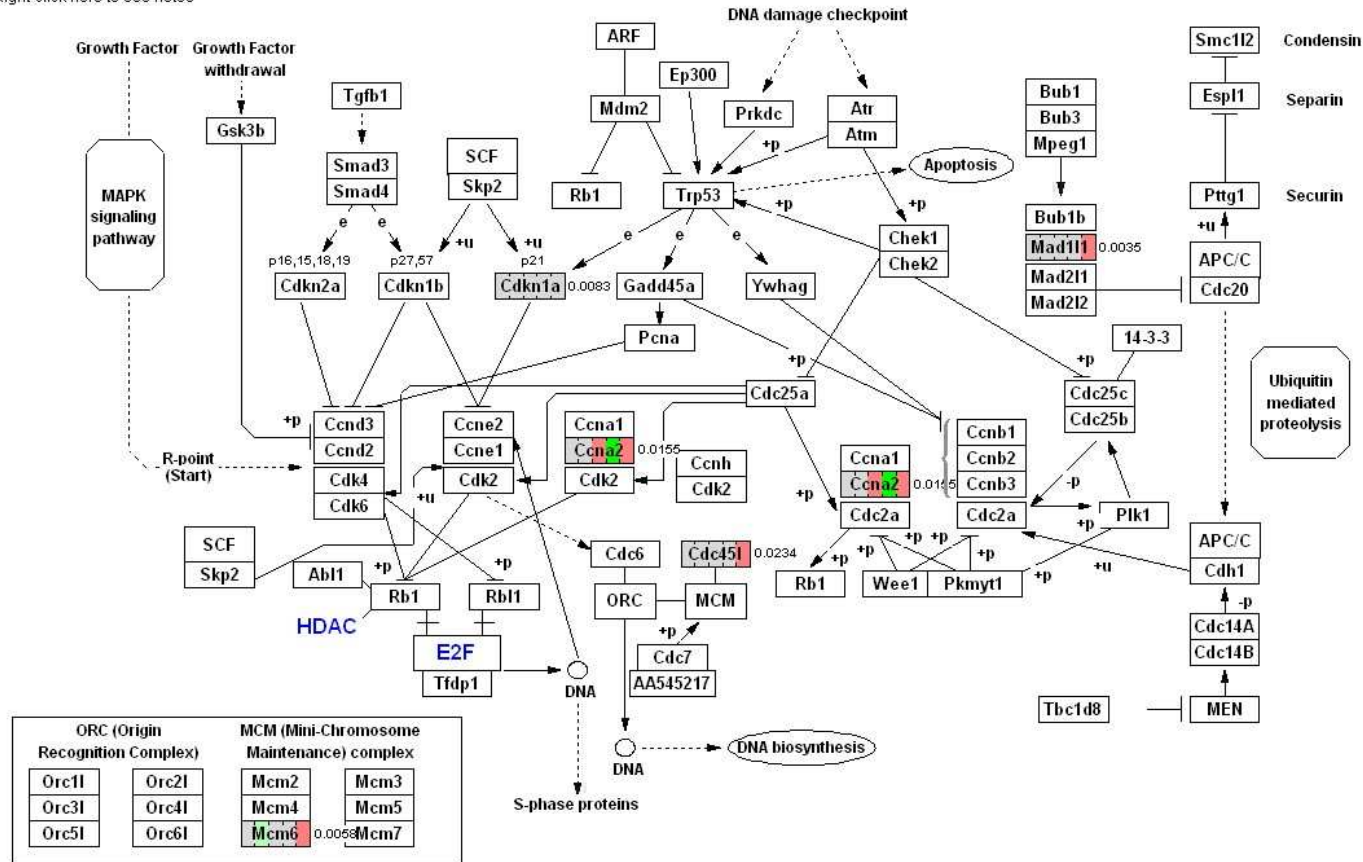
Mastic oil treatment (h)		3	6	12	24	48
Up regulated	Number of genes	28	9	17	6	46
Down regulated		63	35	47	42	27

Mastic oil treatment (h)		3	6	12	24	48
	Number of genes	28	9		6	46
Down regulated		63	35	47	42	27

17

Author: Adapted from KEGG  
 Maintained by: GenMAPP.org  
 E-mail: genmapp@gladstone.ucsf.edu  
 Right-click here to see notes

## Cell cycle



G1

S

G2

M

## **Hypothesis: Mastic oil is a modulator of critical signaling pathways in tumor cells**

### **Experimental evidence:**

#### **Mastic oil attenuates**

- **RhoA expression and activation (*in vitro* and *in vivo*)**
- **Erk1/2 MAPK/kinase phosphorylation (*in vitro*)**
- **NF- $\kappa$ B activation (*in vitro* and *in vivo*)**

# Conclusions

- Bioinformatic Analysis through the use of novel tools (Gene ARMADA and RankGO) enables the identification of key pathways associated with regulation of important cellular functions:
- Genes and pathways derived through exhaustive rounds of analysis exhibited a significant relationship with experimental evidence supporting that mastic oil inhibits tumor cell growth **by negative regulation of cell cycle and induction of apoptosis (E2F7↑, PTEN↑, PPP5C↑, NOD1↓)**

# ΒΑΣΕΙΣ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ

- <http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- <http://www.expasy.org/tools/pathways/>



# ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ

Συστημική Βιολογία

Συνθετική Βιολογία

Συστημική Βιοτεχνολογία

# The Bio-Economy

The term “bio-economy” includes all industries and economic sectors that produce, manage and otherwise exploit biological resources (e.g. agriculture, food, forestry, fisheries and other bio-based industries);

The European bio-economy has an approximate market size of over €1.5 trillion, employing more than 22 million people

Sector	Annual turn-over (billion €)	Employment (million)	Data source
Food	800	4.1	CIAA
Agriculture	210	15	COPA-COGECA
Paper/Pulp	400	0.3 direct (4 ind.)	CEPI
Forestry/Wood ind.	150	2.7	CEI-BOIS
Industrial Biotech.	50 (est.)		McKinsey*
Total	1610	22.1	

\* estimated to be around €100-160 million by 2010

## Industrial Biotechnology is for real



### Large scale products of Industrial Biotechnology :

Bio-ethanol : 30 million t/year

Isoglucose : 15 million t/year

Glutamate : 1.5 million t/year

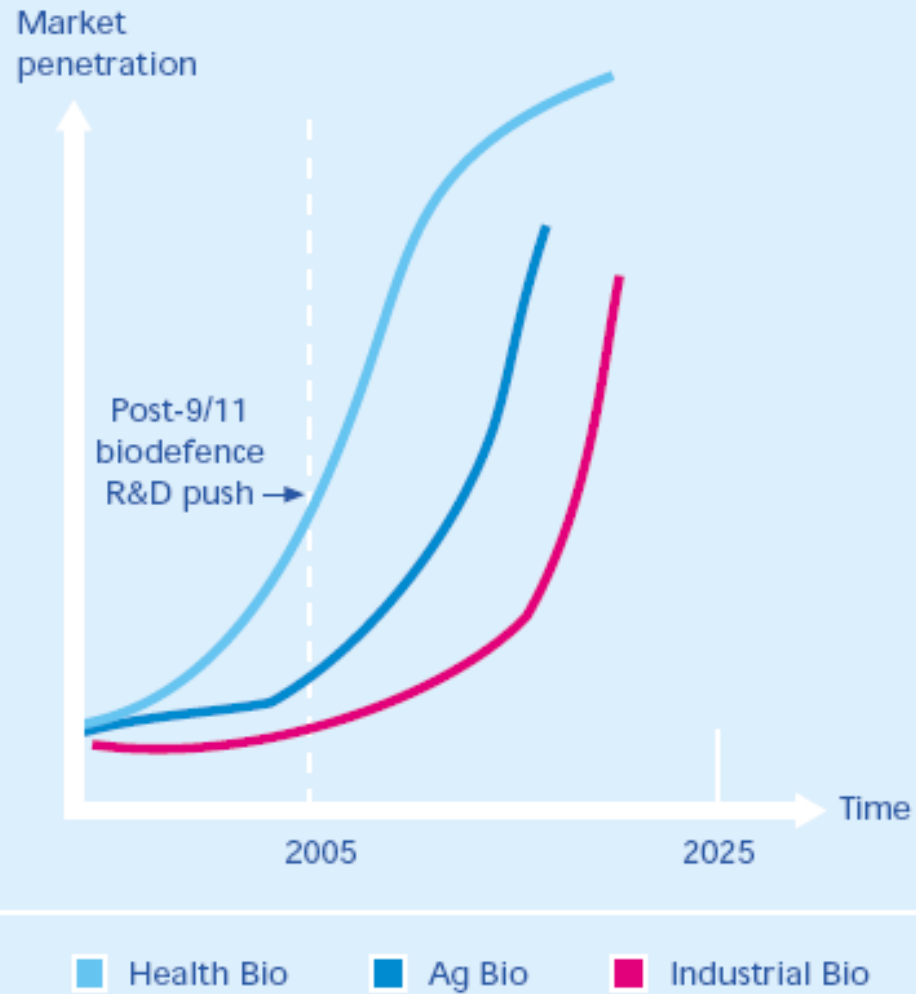
Citric acid : 1 million t/year

Lactic acid : 250.000 t/year

Acrylamide : 200.000 t/year

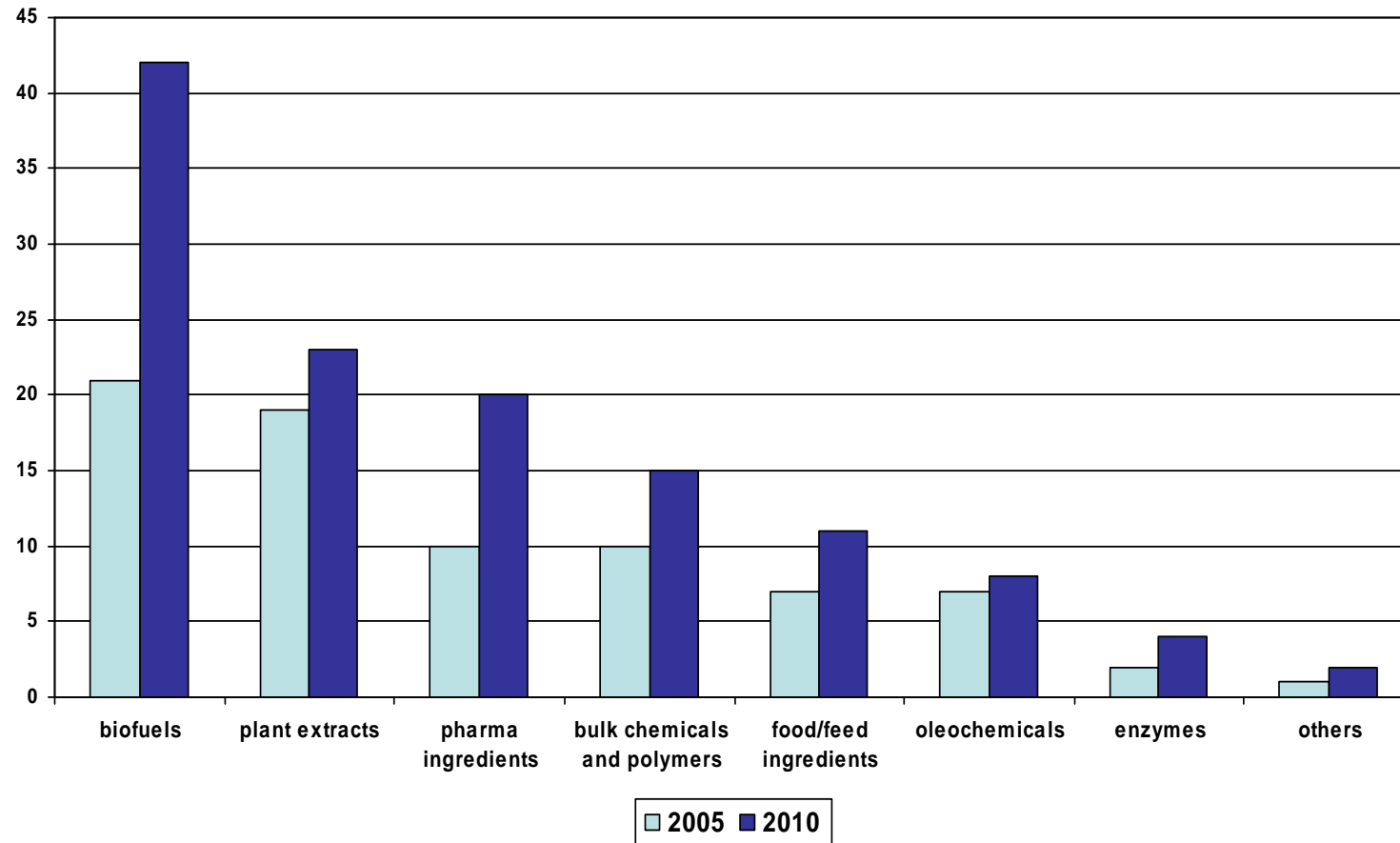
Antibiotics : 30.000 t/year

### Projected Biotechnology Sector Development – A Comparative View



*(adapted from presentation given by Dr Rolf Bachman, McKinsey & Co at Bio2003)*

## Impact of industrial biotechnology (in billion EUR)



2005: 77 billion EUR IB related sales in chemicals (7% sales of the chemical industry)  
2010: 125 billion EUR IB related sales in chemicals (10% sales of the chemical industry)

# ΣΥΣΤΗΜΙΚΗ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ

- Ανάπτυξη της γνώσης και των κατάλληλων εργαλείων μελέτης που θα συνεισφέρουν στη κατανόηση της αλληλεξάρτησης των διαφόρων επιμέρους στοιχείων και της συνεργασίας τους στο **σχηματισμό ανωτέρων συστημάτων τα οποία εκδηλώνουν πολύπλοκες βιολογικές λειτουργίες**. Απώτερος στόχο ο σχεδιασμό των λειτουργιών του κυττάρου, του κυτταρικού συστήματος, του οργανισμού για την τεχνολογική του αξιοποίηση (κυτταρικά εργοστάσια)

# ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΗ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ

- Η Βιομηχανική Βιοτεχνολογία / Βιοκατάλυση (**BB**) αποτελεί ένα **διεπιστημονικό** πεδίο που περιλαμβάνει πολλές ειδικότητες επιστημόνων και μηχανικών και αφορά τη τεχνολογική αξιοποίηση των κυττάρων (μικροβιακών, ζωϊκών, φυτικών) ή συστατικών τους η/και ολόκληρων οργανισμών ή συστημάτων στην παραγωγή προϊόντων ή προσφορά υπηρεσιών. Η **BB** καλύπτει τομείς από την **υγεία** και τη **σύνθεση ειδικών χημικών ουσιών**, έως την **ενέργεια**, και το **περιβάλλον** και είναι μια **φιλική προς το περιβάλλον τεχνολογία**.

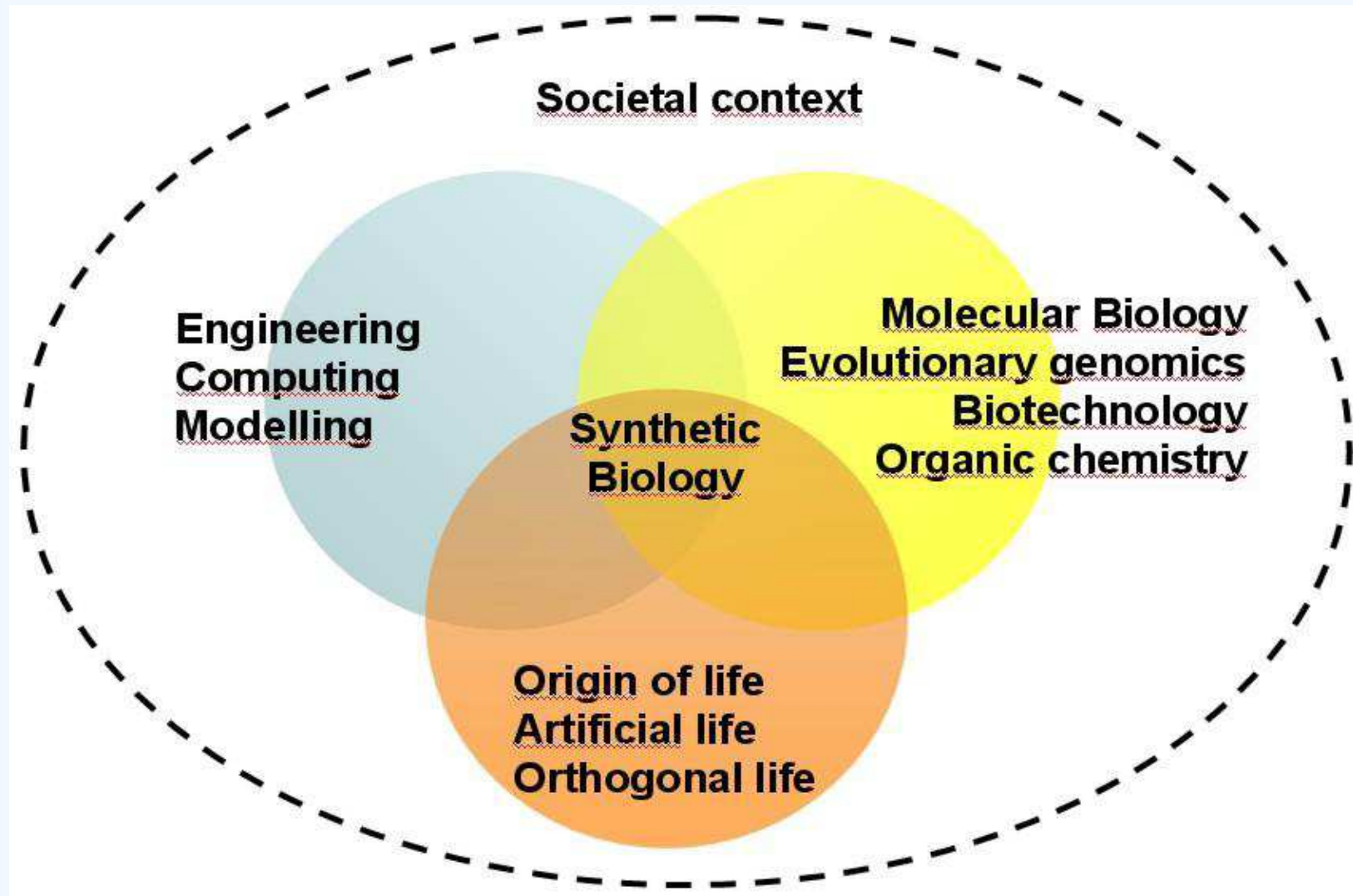
# Συνθετική Βιολογία

**Ορισμός 1:** «Η Συνθετική Βιολογία έχει ως στόχο το σχεδιασμό και την κατασκευή Τμημάτων, Διατάξεων και Συστημάτων βιολογικής βάσης, καθώς και τον επανασχεδιασμό ήδη υφιστάμενων φυσικών βιολογικών συστημάτων» (Εκθεση της Βασιλικής Ακαδημίας Μηχανικών, 2009, [http://www.raeng.org.uk/news/publications/list/reports/Synthetic\\_biology.pdf](http://www.raeng.org.uk/news/publications/list/reports/Synthetic_biology.pdf))

**Ορισμός 2:** «Η Συνθετική Βιολογία στοχεύει στη μελέτη και στην τροποποίηση βιολογικών συστημάτων τα οποία δεν υφίστανται ως τέτοια στη φύση, και η προσέγγιση αυτή χρησιμοποιείται για (1) την επίτευξη βαθύτερης κατανόησης των βιολογικών διαδικασιών, (2) την παραγωγή και συναρμολόγηση λειτουργικών επιμέρους στοιχείων, (3) την ανάπτυξη νέων εφαρμογών ή διεργασιών ( Έκθεση TESSY, 2008 [http://www.tessy-europe.eu/public\\_docs/TESSY-Final-Report\\_D5-3.pdf](http://www.tessy-europe.eu/public_docs/TESSY-Final-Report_D5-3.pdf))



**Synthetic biology is the rational (re-)design of biological systems with useful properties**



## Η σύνθεση «από κάτω προς τα πάνω» (bottom up approach)

Σύνθεση ενός βιολογικού συστήματος μέσω της συναρμολόγησης των μεμονωμένων επιμέρους στοιχείων. Μια εργασία-σταθμός στο Science (Craig Venter, 2008). Στην εργασία αυτή αλληλουχήθηκε και ανασυντέθηκε από το γονιδιώμα του (που αποτελείται από 583 χιλιάδες ζεύγη βάσεων) ένα απλό βακτήριο (*M. genitalium*):

- Η ανασύνθεση του βακτηρίου πραγματοποιήθηκε από τρεις εταιρείες (δύο στις ΗΠΑ και μια στην Ευρώπη, Blue Heron, DNA2.0 και GeneArt).
- Ο προσδιορισμός της αλληλουχίας του γονιδιώματος προσεγγίστηκε με τη μέθοδο των «κασετών DNA». Αλληλοεπικαλυπτόμενες "κασέτες" των 5 έως 7 χιλιάδων βάσεων συναρμολογήθηκαν από χημικά συντεθειμένα ολιγονουκλεοτίδια.
- Οι κασέτες αυτές ενώθηκαν στη συνέχεια *in vitro* για την παραγωγή ενδιάμεσων τμημάτων DNA, τα οποία κλωνοποιήθηκαν σε τεχνητά βακτηριακά χρωμοσώματα (BACs) του βακτηρίου *E. coli*.
- Ανακαλύφθηκε ότι το πλήρες συνθετικό γονιδίωμα δεν μπορούσε να συναρμολογηθεί στο *E. Coli* και ότι αυτό θα ήταν τελικά εφικτό με τη χρησιμοποίηση μιας άλλης μεθόδου κλωνοποίησης με βάση τη Ζύμη (Transformation Associated Recombination, TAR).
- Η εργασία αυτή αποτελεί ένα καλό παράδειγμα για το πώς βακτήρια μπορούν να ανασυντίθενται από την αλληλουχία του γονιδιώματός τους.

## Μεταβολική Μηχανική

Παραγωγή της αρτεμισινίνης από τους Keasling et al. 2007 που μελέτησαν τα μεταβολικά μονοπάτια του *Artemisia annua* και χρησιμοποίησαν το μόριο του αρτεμισιακού οξέος ως πρόδρομο αντιελονοσιακού φαρμάκου, το οποίο και παρήγαγαν χρησιμοποιώντας τη Ζύμη ως κυτταρικό εργοστάσιο (γνωστό από τους Κινέζους εδώ και αιώνες το φυτό *Artemisia annua* για την αντιμετώπιση της ελονοσίας. Το 1972 μελετήθηκε από τον Κινέζο επιστήμονα, Tu Youyou). (*Metab Eng.* 2007 Mar;9(2):160-8

## Σασί

Η έννοια περιλαμβάνει τη χρησιμοποίηση ενός κυττάρου-ξενιστή στον οποίο εισάγεται τροποποιημένο DNA. Οι συνηθέστεροι οργανισμοί που χρησιμοποιούνται ως ξενιστές είναι τα βακτήρια *E. coli*, *B. subtilis*, *Mycoplasma* και *P. putida* και η ευκαρυωτική Ζύμη. Ο ξενιστής προσφέρει το βασικό κυτταρικό περιβάλλον το οποίο εμπλουτίζεται με νέες ιδιότητες που εισάγονται μέσω του τροποποιημένου DNA. Η κύρια δυσκολία της προσέγγισης αυτής είναι ο έλεγχος της συμπεριφοράς του ξενιστή, ο οποίος είναι ένας ζωντανός φυσιολογικός οργανισμός. Όταν εισαχθεί το νέο DNA, το σύστημα ενδέχεται να μην συμπεριφερθεί με τον αναμενόμενο και επιθυμητό τρόπο. Για τον λόγο αυτόν, ένας αριθμός ερευνητικών ομάδων εργάζεται πάνω στα αποκαλούμενα «ελάχιστα κύτταρα», δηλαδή κύτταρα-ξενιστές τα οποία διατηρούν μόνο τις ελάχιστες απαραίτητες βιολογικές λειτουργίες για την επιβίωσή τους. Ένα παράδειγμα τέτοιας εργασίας δημοσιεύθηκε στην επιθεώρηση *Molecular Systems Biology* από τους Forster και Church, με τίτλο «Για τη σύνθεση ελάχιστου κυττάρου» (*Mol Syst Biol.* 2006;2:45). Ο στόχος είναι να αφαιρεθούν όλα τα μη απαραίτητα στοιχεία του κυττάρου ώστε να ανακτηθεί ο μεγαλύτερος δυνατός έλεγχος σε μια διεργασία Συνθετικής Βιολογίας.

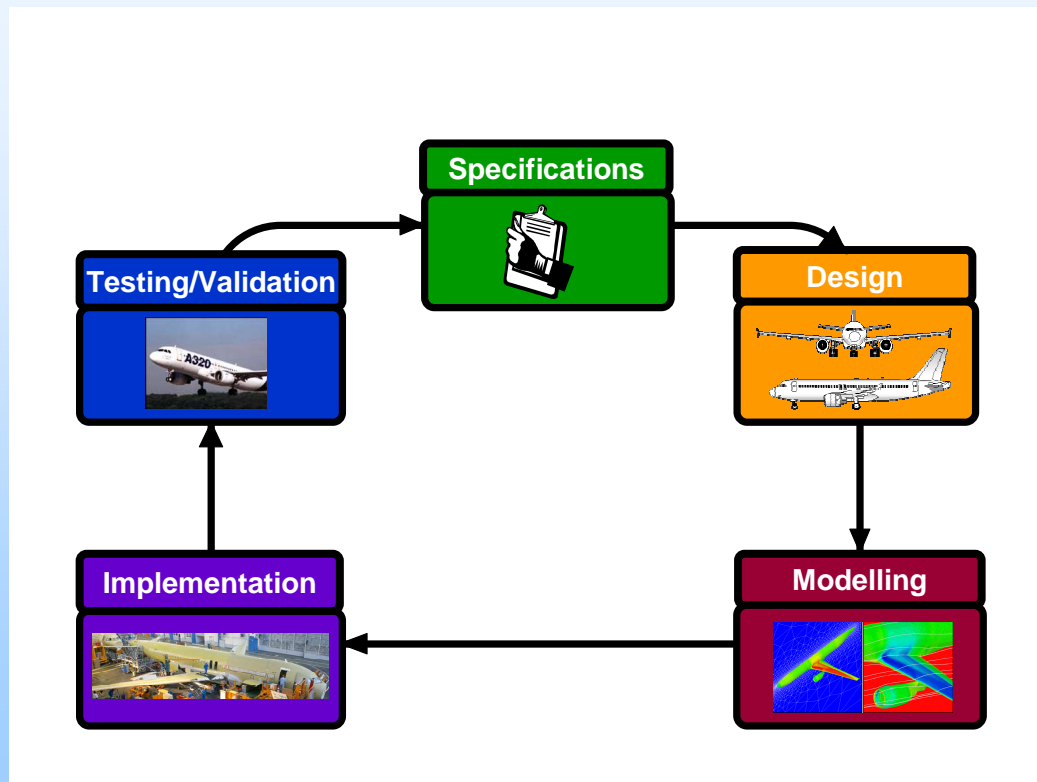
## Τμήματα, Διατάξεις και Συστήματα

Ο στόχος της προσέγγισης αυτής είναι ο σχεδιασμός και οι ανάπτυξη βιολογικών μηχανισμών και, ιδανικά, συστημάτων από πρότυπα επιμέρους στοιχεία (μέθοδος που χρησιμοποιείται στους περισσότερους κλάδους της Μηχανικής).

- Τα Τμήματα μπορούν να οριστούν ως κωδικοποιημένες βιολογικές λειτουργίες (δηλαδή τροποποιημένο DNA)
- Οι Διατάξεις κατασκευάζονται από μια συλλογή διαφορετικών Τμημάτων και κωδικοποιούν καθορισμένες από τον άνθρωπο λειτουργίες (π.χ. βιοαισθητήρες και λογικές πύλες)
- Τα Συστήματα εκτελούν ολοκληρωμένα καθήκοντα (π.χ. μετρήσεις και λειτουργίες ελέγχου)

Ο κύκλος της Μηχανικής αποτελείται από πέντε στάδια: την προδιαγραφή, τον σχεδιασμό, τη μοντελοποίηση, την υλοποίηση και τον έλεγχο/επικύρωση. (Ένα αεροσκάφος Airbus έχει χρησιμοποιηθεί εσκεμμένα στην εικόνα για να δείξει ότι αυτή είναι μια διαδομένη προσέγγιση στη Μηχανολογία.)

στη Μηχανολογία.)



## Εφαρμογές της Συνθετικής Βιολογίας

**Υγεία:** (α) Ένας μεγάλος αριθμός φαρμάκων αναμένεται να έχουν σχεδιαστεί ως εφαρμογές Συνθετικής Βιολογίας (η αρτεμισινίνη). Η ΣΒ μπορεί να χρησιμοποιηθεί είτε για την παραγωγή συνθετικών μορφών των φυσικών ουσιών είτε για την βελτιστοποίησή τους, μειώνοντας τις παρενέργειες. (β) Ανάπτυξη βιολογικών νανομηχανών με επιθυμητές ιδιότητες (π.χ βιοαισθητήρες, που μπορούν να ανιχνεύουν ουσίες ή παράγοντες μόλυνσης και να χρησιμοποιούνται ως διαγνωστικά ή θεραπευτικά μέσα μεγάλης ακριβείας).

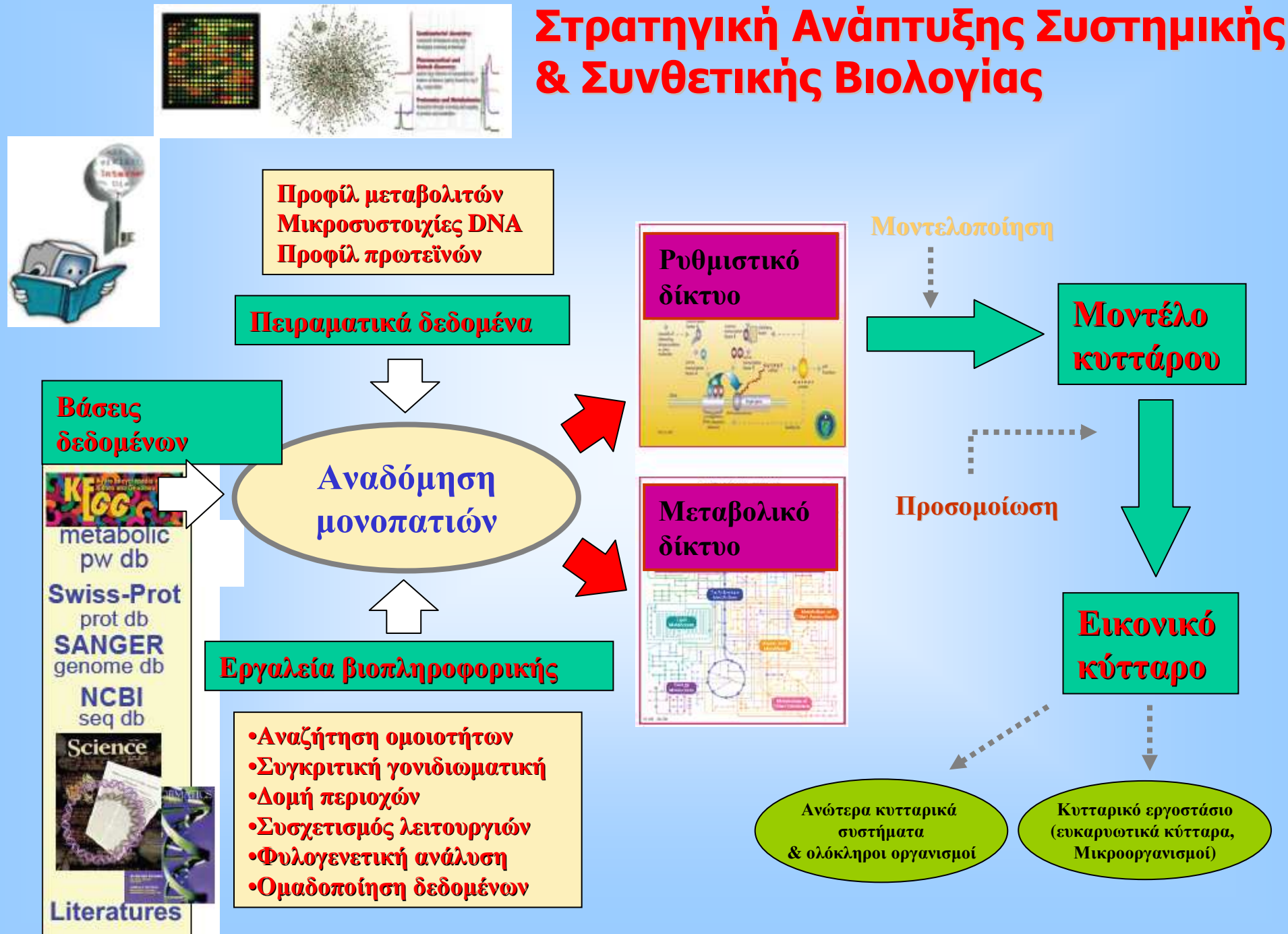
**Ενέργεια:** (α) αναμένεται να παίξει σημαντικό ρόλο στην κατασκευή βιολογικών μηχανισμών που επιτελούν την παραγωγή βιοκαυσίμων με τη βέλτιστη απόδοση αλλά και ειδικότερα με τη χρησιμοποίηση πρώτων υλών μη αξιοποιησίμων με τη σημερινή τεχνολογία.

**Περιβάλλον:** Βιοαισθητήρες έχουν ήδη εφαρμοστεί στην ανίχνευση μολυσματικών παραγόντων και συγκεκριμένα στην ανίχνευση αρσενικού στο πόσιμο νερό, αλλά και στην ανίχνευση επικίνδυνων χημικών ουσιών ή εκρηκτικών.

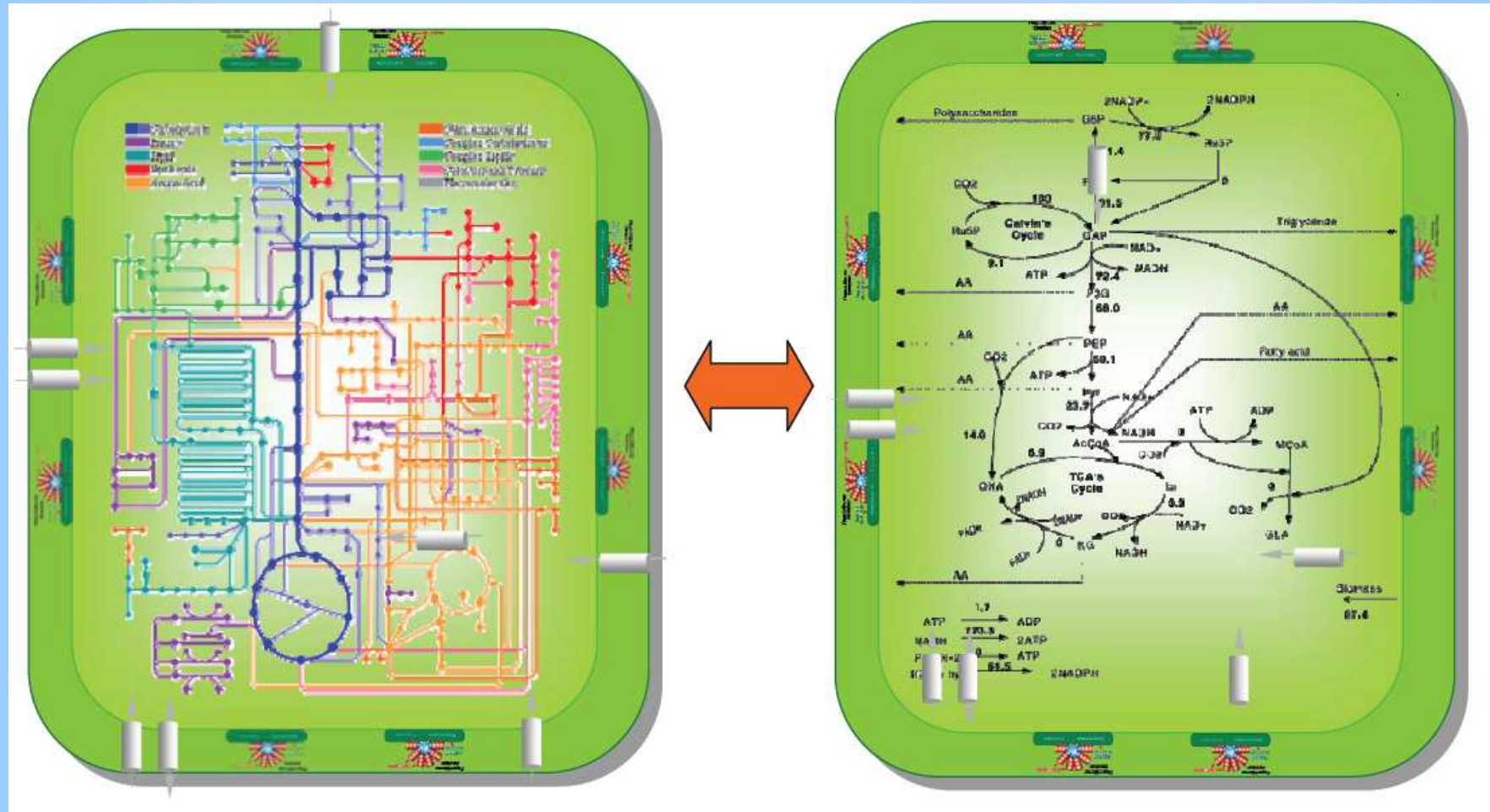
**Γεωργία:** αναμένεται να αποτελέσει το κυριότερο πλαίσιο ανάπτυξης εφαρμογών με βάση τη γενετική τροποποίηση των καλλιεργειών ως βιολογικά συστήματα/κυτταρικά εργοστάσια. Οι προεκτάσεις είναι πολλές και αγγίζουν όλους τους τομείς που αναφέρθηκαν παραπάνω. Για παράδειγμα, τον τομέα της διατροφής (παραγωγή τροφών με βέλτιστες ιδιότητες), της υγείας (παραγωγή φαρμάκων από φυτά), της ενέργειας (βιοκαύσιμα επόμενης γενιάς) και της βιομηχανίας (παραγωγή χημικών υψηλής προστιθέμενης αξίας).

**Άλλοι τομείς:** (α) Ανάπτυξη βιοϋλικών. Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η παραγωγή συνθετικού μεταξιού από αράχνη (golden orb spider). Το μετάξι της αράχνης αυτής ήταν ήδη γνωστό για την ακραία ανθεκτικότητά του σε συνδυασμό με το πολύ χαμηλό βάρος του. Η συνθετική παραγωγή του επιτεύχθηκε μέσω της ανάπτυξης ολόκληρου βιοχημικού μονοπατιού σε εργαστηριακό επίπεδο (in vitro). Παρόμοιες τεχνικές βρίσκονται υπό ανάπτυξη για την παραγωγή χημικών υψηλής αξίας όπως μη φυσικοί μονοσακχαρίτες και νέα πολυμερή.

# Στρατηγική Ανάπτυξης Συστημικής & Συνθετικής Βιολογίας



# Υπολογιστική μοντελοποίηση

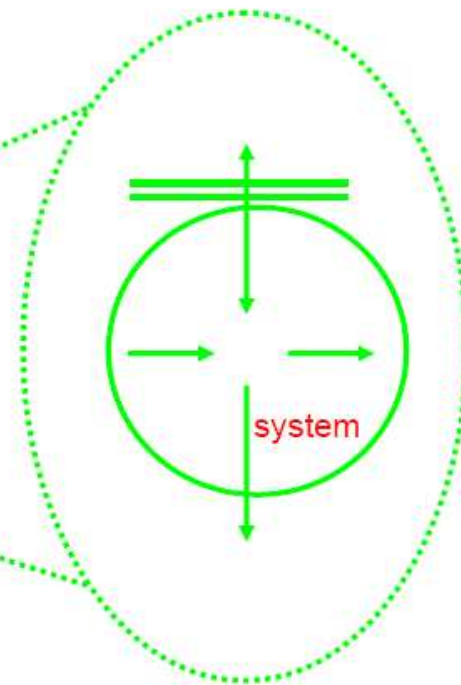
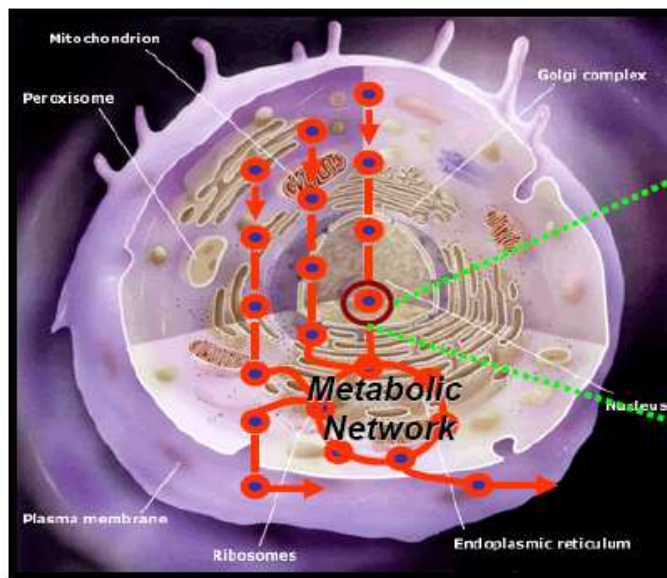


Δημιουργία μοντέλου και προσομοίωση



# Μοντελοποίηση ολόκληρου κυττάρου

«Η **ανάλυση διακύμανσης ροών** αναπαριστά τη συστηματική διακύμανση κυτταρικών συστημάτων με βάση τη διατήρηση της μάζας κάτω από την υπόθεση της κατάστασης ισορροπίας»



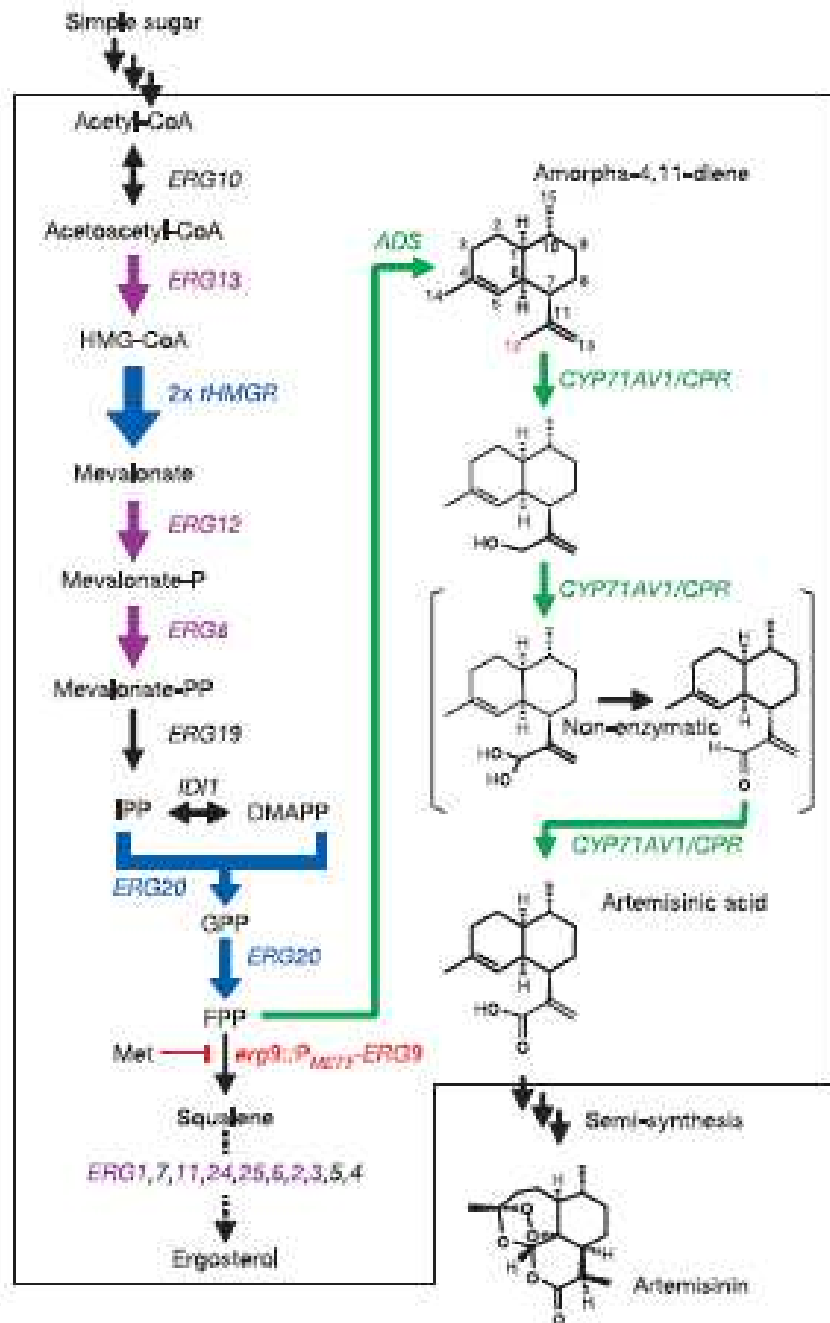
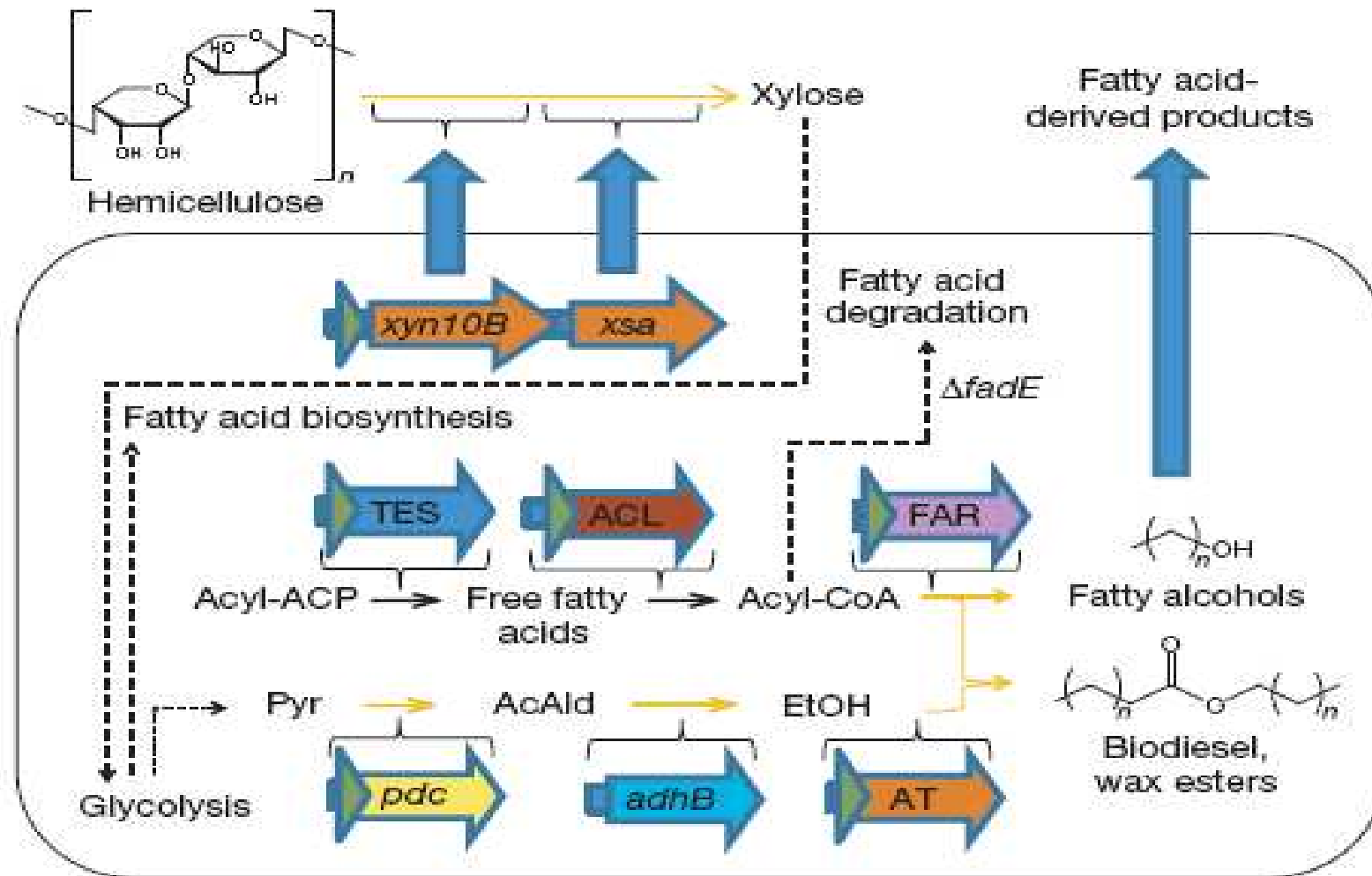


Figure 1 | Schematic representation of the engineered artemisinin acid biosynthetic pathway in *S. cerevisiae* strain EPY224 expressing *CYP71AV1* and *CPR*. Genes from the mevalonate pathway in *S. cerevisiae* that are directly upregulated are shown in blue; those that are indirectly upregulated by *apc2-1* expression are in purple; and the red line denotes repression of *ERG9* in strain EPY224. The pathway intermediates IPP, DMAPP and GPP are defined as isopentenyl pyrophosphate, dimethyl allyl pyrophosphate and geranyl pyrophosphate, respectively. Green arrows indicate the biochemical pathway leading from farnesyl pyrophosphate (FPP) to artemisinin acid, which was introduced into *S. cerevisiae* from *A. annua*. The three oxidation steps converting amorphaadiene to artemisinin acid by *CYP71AV1* and *CPR* are shown.



Engineered pathways for production of fatty acid-derived molecules from hemicelluloses or glucose and depiction of the synthetic operons used in this study. Flux through the *E. coli* fatty acid pathway (black lines) was increased to improve production of free fatty acids and acyl-CoAs by eliminating  $\beta$ -oxidation (knockouts are *fadE*), by overexpressing thioesterases (TES) and acyl-CoA ligases (ACL). Various products were produced from non-native pathways (orange lines) including biodiesel, alcohols and wax esters. Alcohols were produced directly from fatty acyl-CoAs by overexpressing fatty acyl-CoA reductases (FAR); the esters were produced by expressing an acyltransferase (AT) in conjunction with an alcohol-forming pathway; biodiesel was produced by introduction of an ethanol pathway (*pdc* and *adhB*) and wax esters were produced from the fatty alcohol pathway (FAR). Finally, expressing and secreting xylanases (*xyn10B* and *xsa*) allowed for the utilization of hemicellulose. Overexpressed genes or operons are indicated; green triangles represent the *lacUV5* promoter. AcAld, acetaldehyde; EtOH, ethanol; pyr, pyruvate.

# IN SILICO MODEL OF LIPID BIOSYNTHESIS IN RAPESEED EMBRYOS

Eleftherios Pilalis<sup>1</sup>, Abdelghani Idrissi<sup>2</sup>, Aristotelis  
Chatziioannou<sup>1</sup>, Brigitte Thomasset<sup>2</sup>, Fragiskos Kolisis<sup>1</sup>

1. Metabolic Engineering and Bioinformatics Group, Institute of Biological  
Research and Biotechnology, National Hellenic Research Foundation, Athens,  
Greece

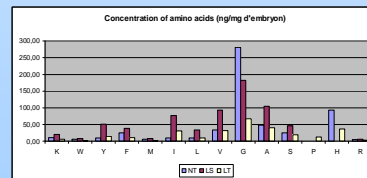
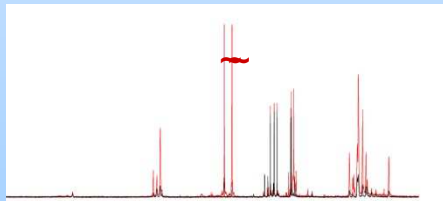
2. Génie enzymatique et Cellulaire, UMR CNRS 6022, Université de Technologie  
de Compiègne, Compiègne, France

# PLATON Research Collaboration

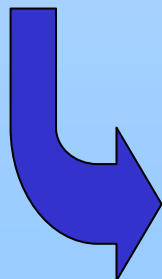
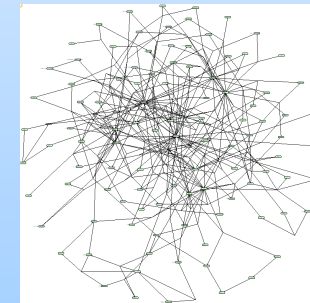
Target: Metabolic engineering to obtain modified (branched) lipids with novel properties

- Enzymatic and Cellular Engineering, UMR CNRS 6022, Université de Technologie de Compiègne, Compiègne, France
- Metabolic Engineering and Bioinformatics Group, Institute of Biological Research and Biotechnology, National Hellenic Research Foundation, Athens, Greece

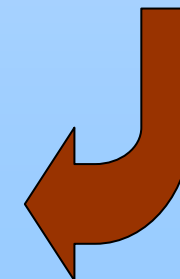
Genetic engineering and acquisition of experimental data (NMR, LC/GC-MS)



Computational pathway modeling



Elucidation of the regulation of lipid biosynthesis → Predictions/design of genetic engineering strategies



# Failure of branched fatty acid synthesis

Introduction of three bacterial enzymes

- Threonine Deaminase (TD)
- Propionyl-coA Carboxylase (Pccase)
- Fatty-acyl ACP Synthase (KAS)



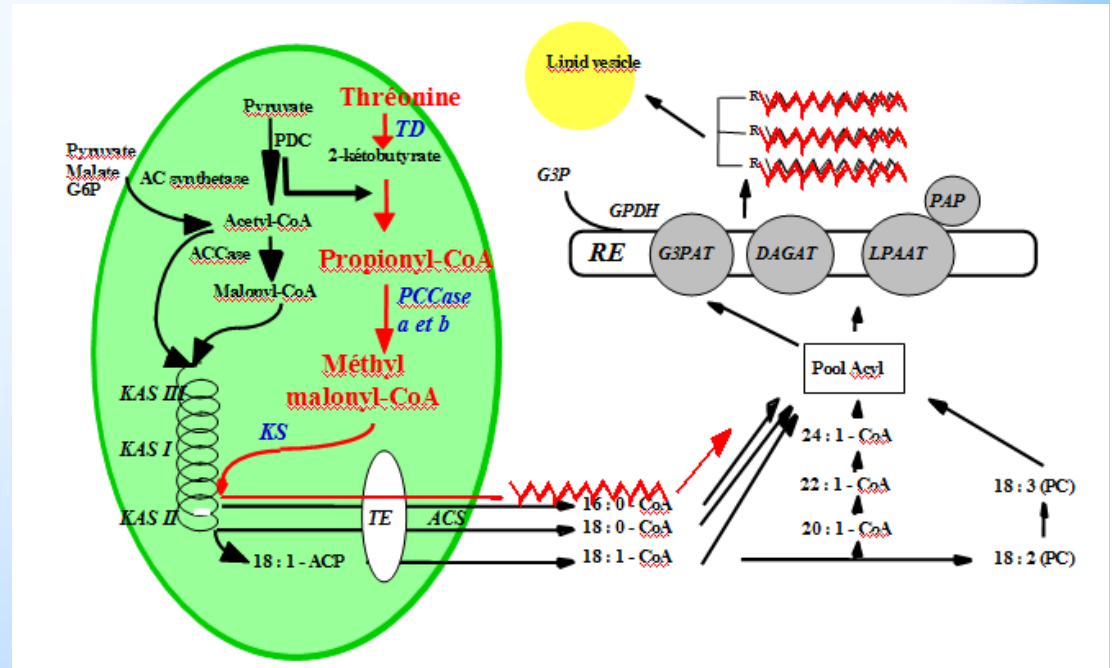
Significant metabolic perturbations

- increase of amino acids (Isoleucine, Leucine, Valine)
- increase of cetoacids (pyruvate, ketobutyrate)

**Branched fatty acids detectable but extremely low**

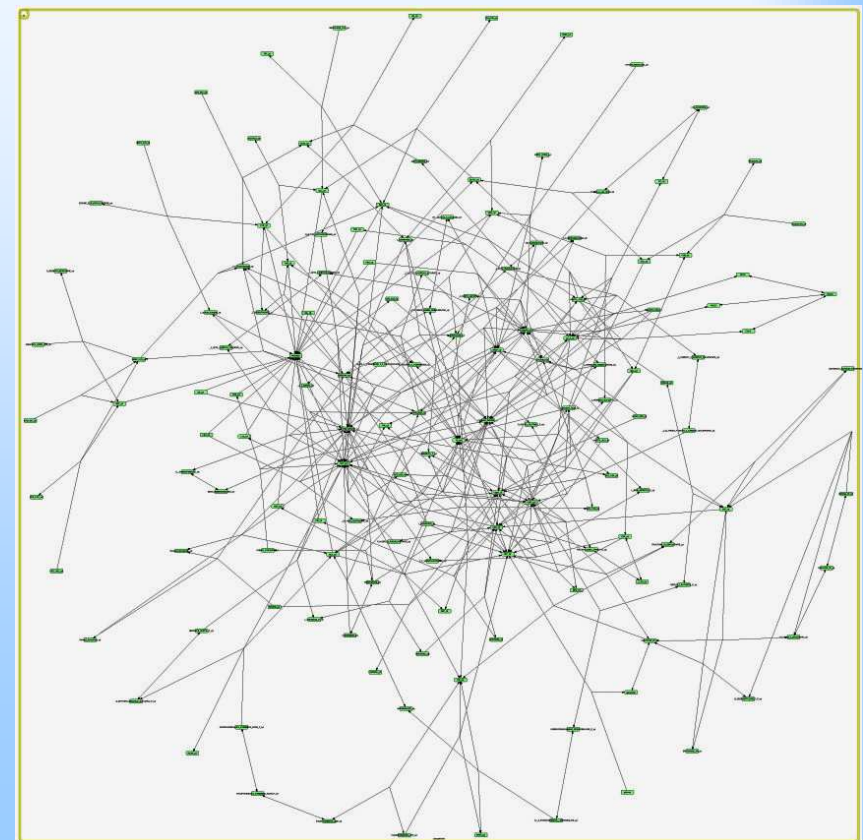
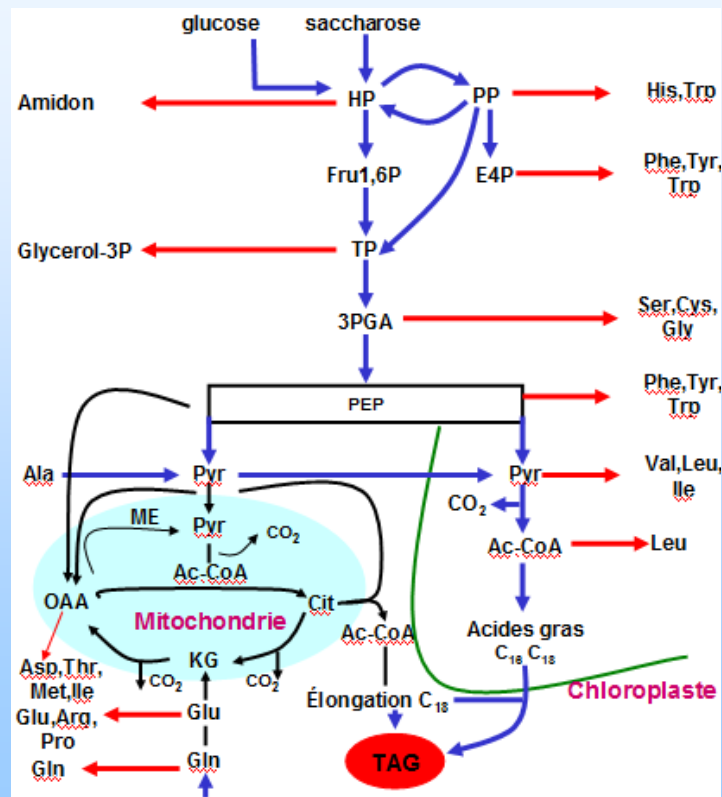
Relevant enzymatic machinery present and functional but the metabolism is not redistributed to the modified pathway

**Need of modeling in order to elucidate the regulation of lipid synthesis**

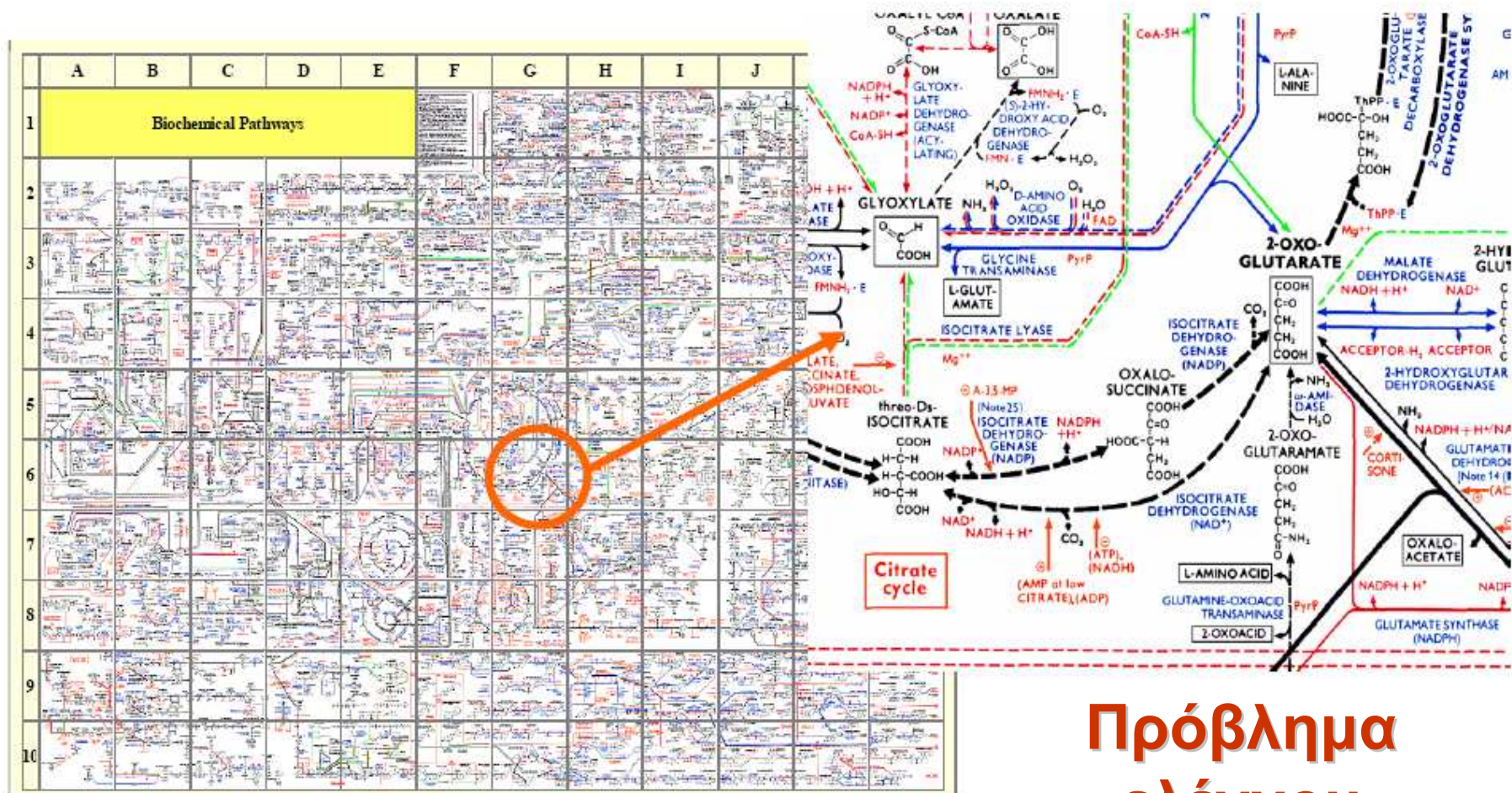


# In silico reconstruction of a large-scale network of central metabolism

- Simple schema of central carbon metabolism
- More realistic metabolic network



# Μεταβολικά μονοπάτια



**Πρόβλημα ελέγχου**

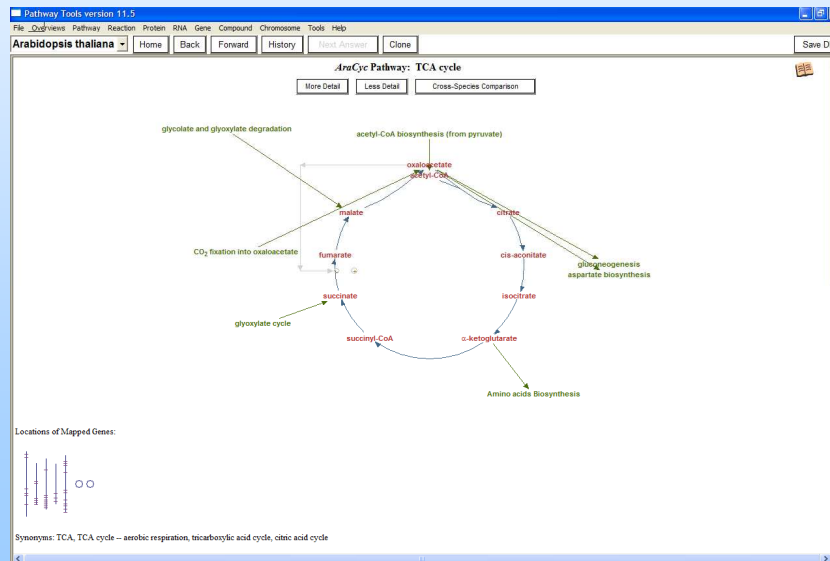


## In silico reconstruction of a large-scale network of central metabolism

- Acquisition of all known biochemical reactions
- Selection of reactions relevant to the pathways of interest (can be numerous)
- Definition of “systemic” reactions and metabolites
- Integration of experimental data

# Acquisition of known biochemical reactions

- Pathway Tools 11.5 ( P. Karp et al.) *Bioinformatics* 18:S225-32 2002.
- Aracyc 1.1 : Curated Arabidopsis thaliana pathway database



The screenshot displays the Pathway Tools 11.5 interface for the compound **α-ketoglutarate** in Arabidopsis thaliana.

**Arabidopsis thaliana** | Home | Back | Forward | History | New Answer | Clone | Save DB

**Arabidopsis Compound: α-ketoglutarate**

Synonyms: ketoglutarate, α-ketoglutarate, 2-oxoglutaric acid, α-ketoglutaric acid, α-oxoglutarate, 2-oxoglutarate, 2-ketoglutaric acid, 2-ketoglutarate, 2-oxopentanedioic acid, 2-oxopentane-dioate

Empirical Formula: C<sub>5</sub>H<sub>7</sub>O<sub>5</sub>

Molecular Weight: 146.1 daltons

SMILES: C(O)(=O)C(O)C(=O)C(=O)O

Unification Links: CAS:328-50-7, LIGAND:C00024

In Pathway Reactions as a Reactant:

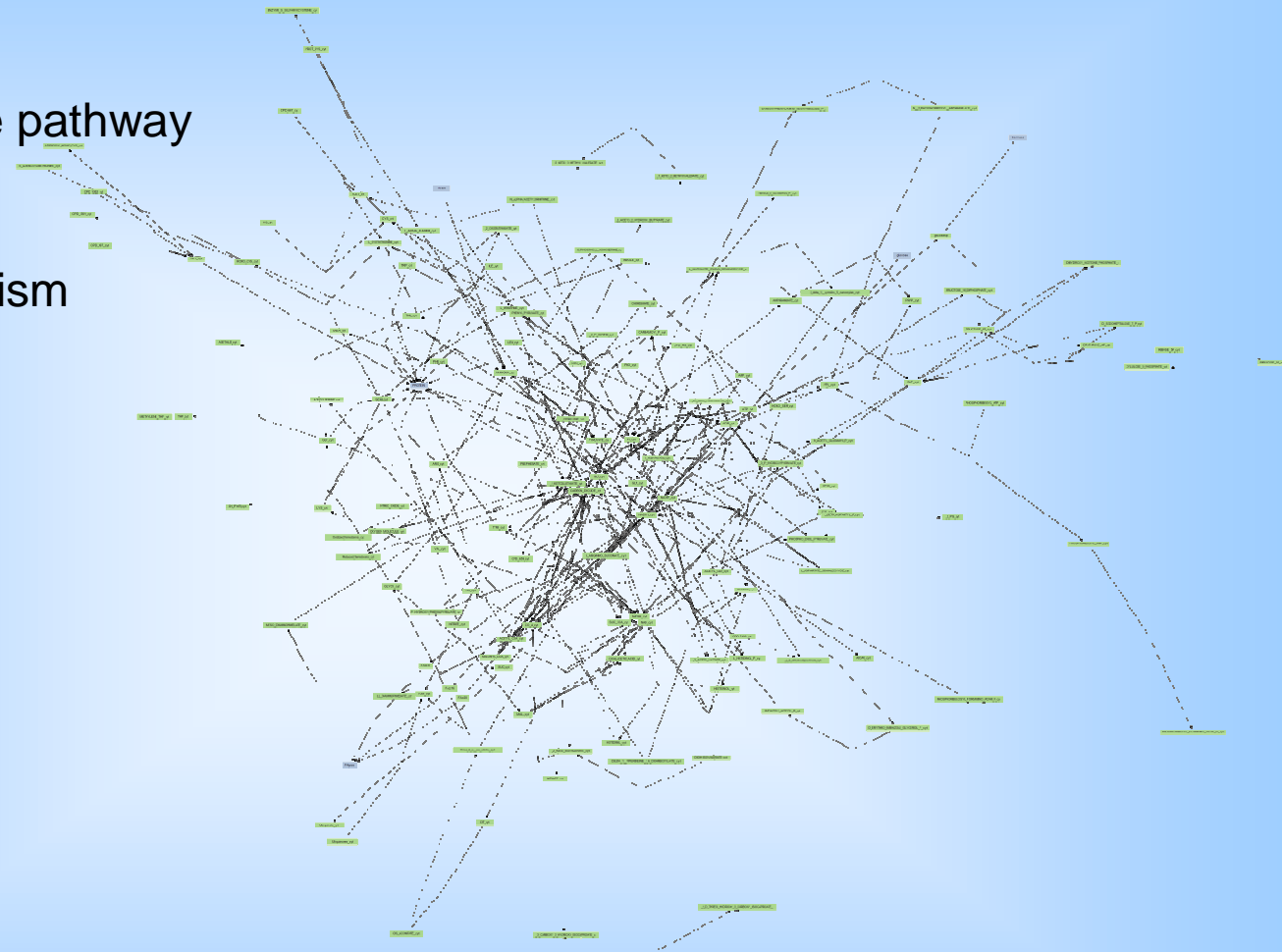
- α-ketoglutarate dehydrogenase complex:  
α-ketoglutarate + enzyme N<sup>5</sup>-(lipo)lysine = enzyme N<sup>5</sup>-(S-succinyl(lipo)lysine) + CO<sub>2</sub>
- 4-aminobutyrate degradation I:  
α-ketoglutarate + 4-aminobutyrate = L-glutamate + succinate semialdehyde
- alanine biosynthesis I:  
α-ketoglutarate + L-alanine = L-glutamate + pyruvate
- alanine degradation:  
α-ketoglutarate + L-alanine = L-glutamate + pyruvate
- anthocyanin biosynthesis (pelargonidin 3-O-glucoside, cyanidin 3-O-glucoside):  
leucocyanidin + α-ketoglutarate + O<sub>2</sub> = cyanidin + succinate + CO<sub>2</sub> + 2 H<sub>2</sub>O  
leucopelargonidin + α-ketoglutarate + O<sub>2</sub> = pelargonidin + succinate + CO<sub>2</sub> + 2 H<sub>2</sub>O
- arginine biosynthesis I:  
N-acetyl-L-ornithine + α-ketoglutarate = N-acetyl-L-glutamate S-semialdehyde + L-glutamate
- arginine biosynthesis II (acetyl cycle):  
N-acetyl-L-ornithine + α-ketoglutarate = N-acetyl-L-glutamate S-semialdehyde + L-glutamate
- arginine biosynthesis III:  
L-ornithine + α-ketoglutarate = L-glutamate + L-glutamate γ-semialdehyde
- arginine degradation I:  
α-ketoglutarate + 4-aminobutyrate = L-glutamate + succinate semialdehyde
- arginine degradation II:  
L-ornithine + α-ketoglutarate = L-glutamate + L-glutamate γ-semialdehyde
- asparagine biosynthesis II:  
L-asparagine + α-ketoglutarate = oxaloacetate + L-glutamate
- aspartate biosynthesis:  
L-aspartate + α-ketoglutarate = oxaloacetate + L-glutamate
- citrulline biosynthesis:

# Full network of Arabidopsis th. central metabolism

- Glycolysis
- Calvin cycle
- Pentoses-phosphate pathway
- Citric acid cycle
- Lipid biosynthesis
- Aminoacids metabolism

141 metabolites

151 reactions



# Reduced network of Arabidopsis th. central metabolism

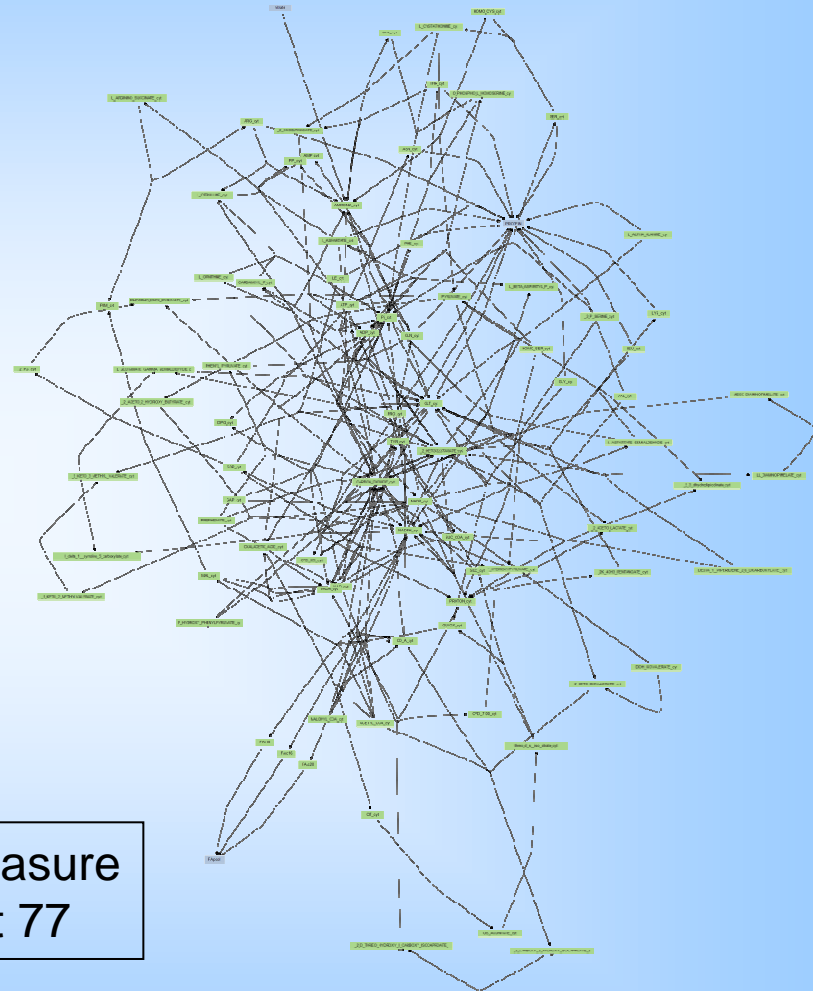
- Glycolysis
- Calvin cycle
- Pentoses-phosphate pathway
- Citric acid cycle
- Lipid biosynthesis
- Aminoacids metabolism

77 metabolites

110 reactions

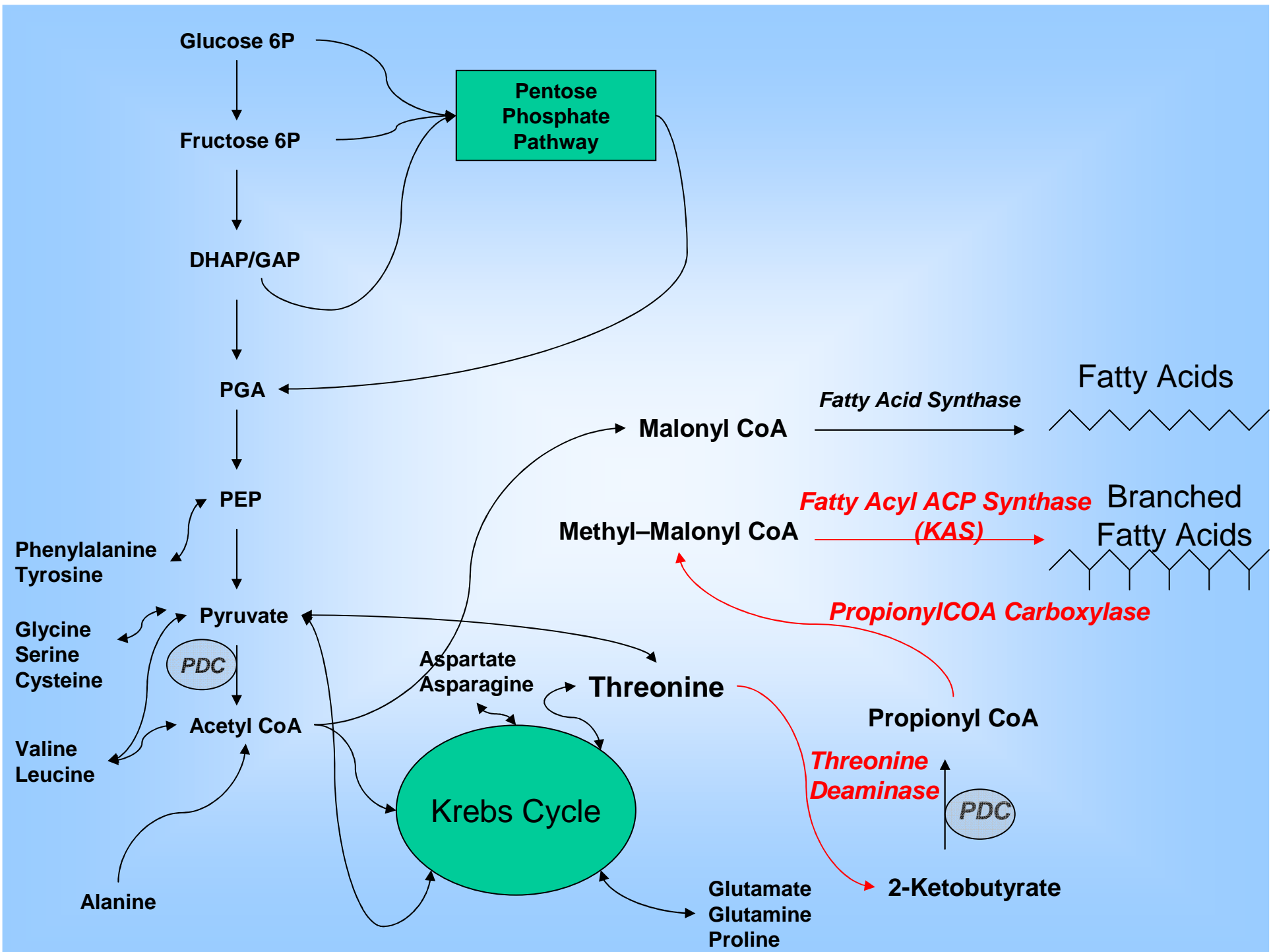
Degrees of freedom:  $110 - 77$   
 $= 33$

For a fully determined system we should measure  
33 steady state fluxes to calculate the rest 77



# Metabolic Flux Analysis on an under-determined system

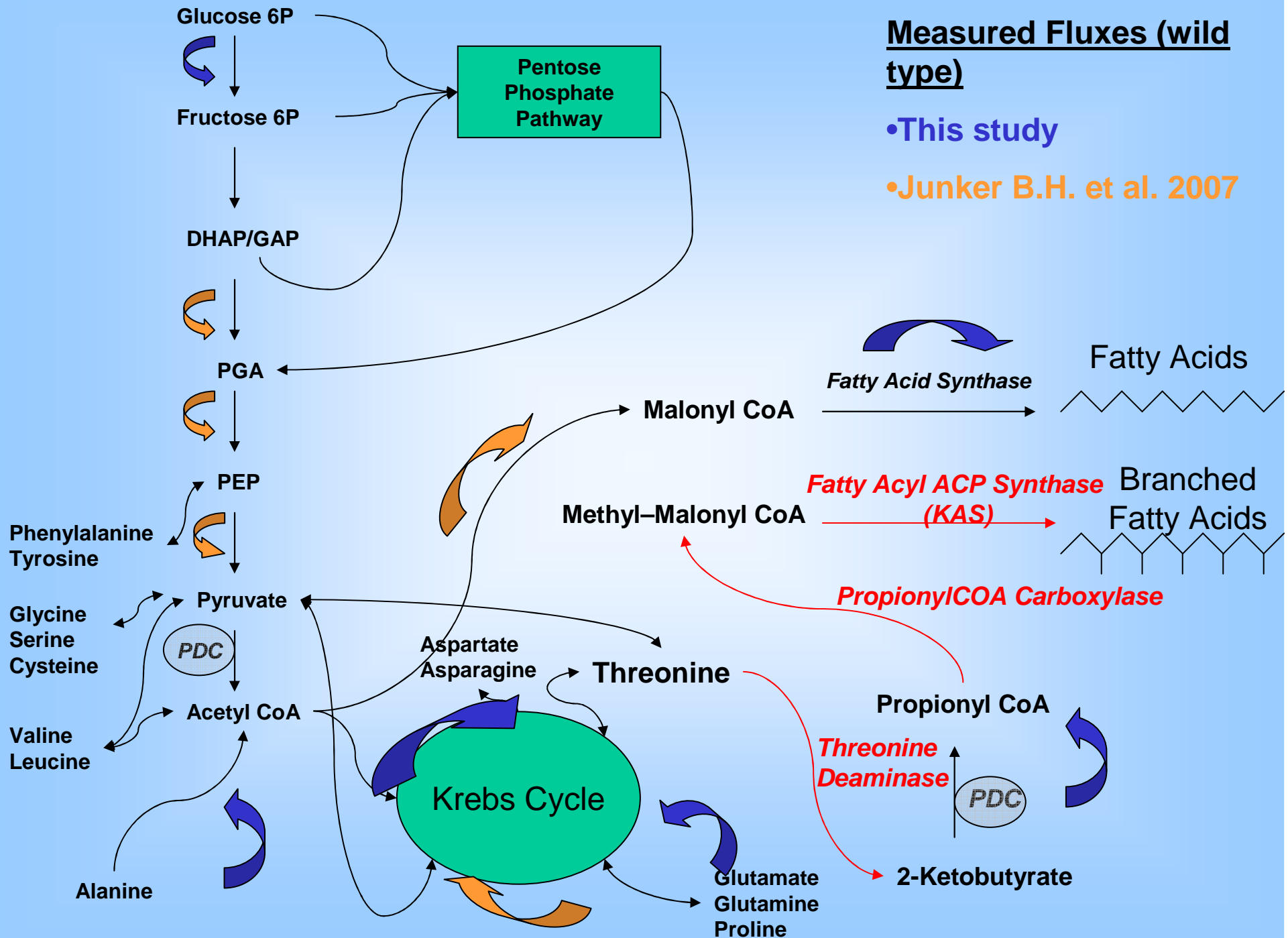
- 15 fluxes currently measured
  - Multiple solutions
- Use of constraints and linear optimization in order to minimize the solution space
  - Thermodynamic feasibility
  - Range of possible flux values
  - Hypotheses based on biochemical knowledge



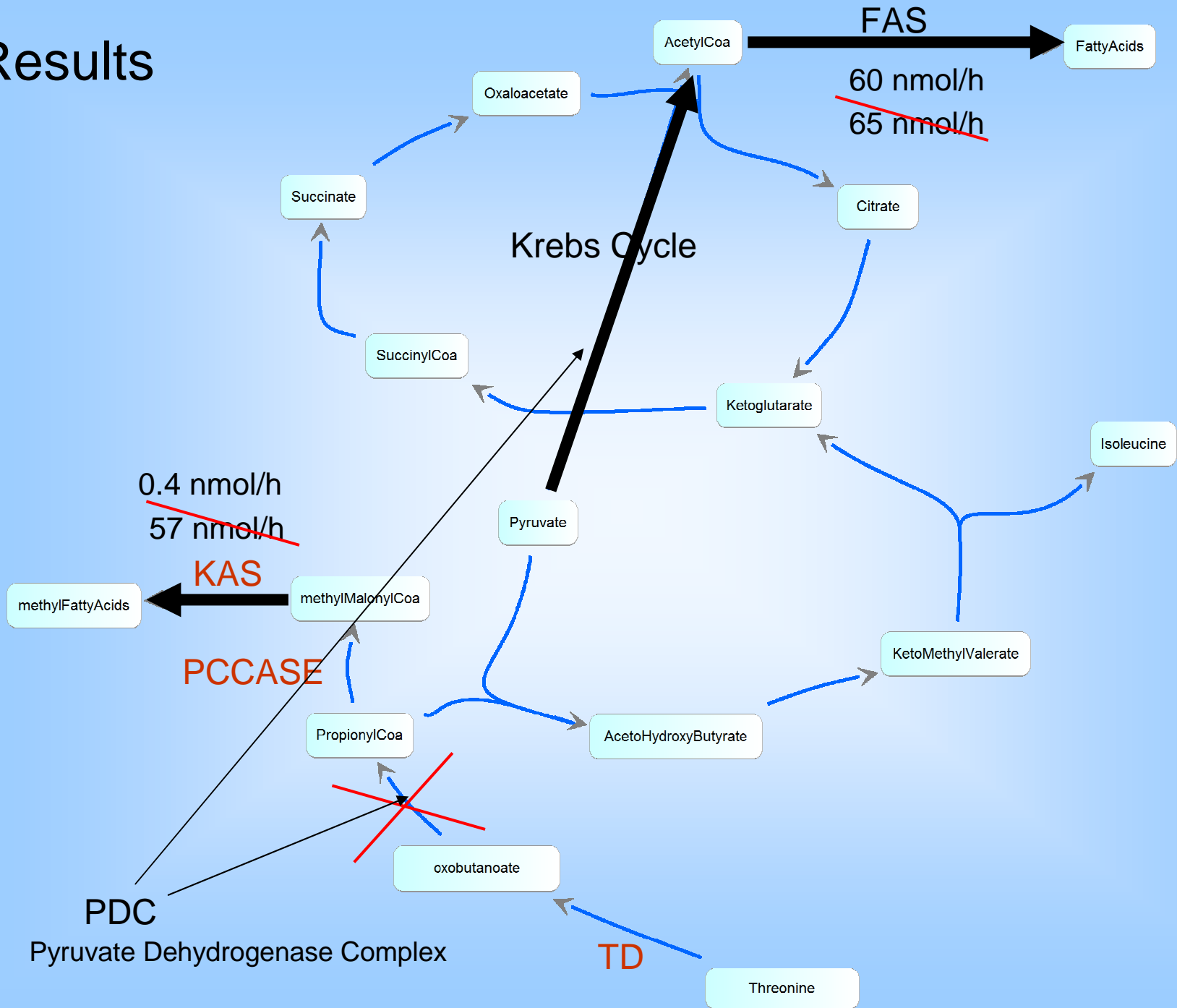
## Measured Fluxes (wild type)

•This study

•Junker B.H. et al. 2007

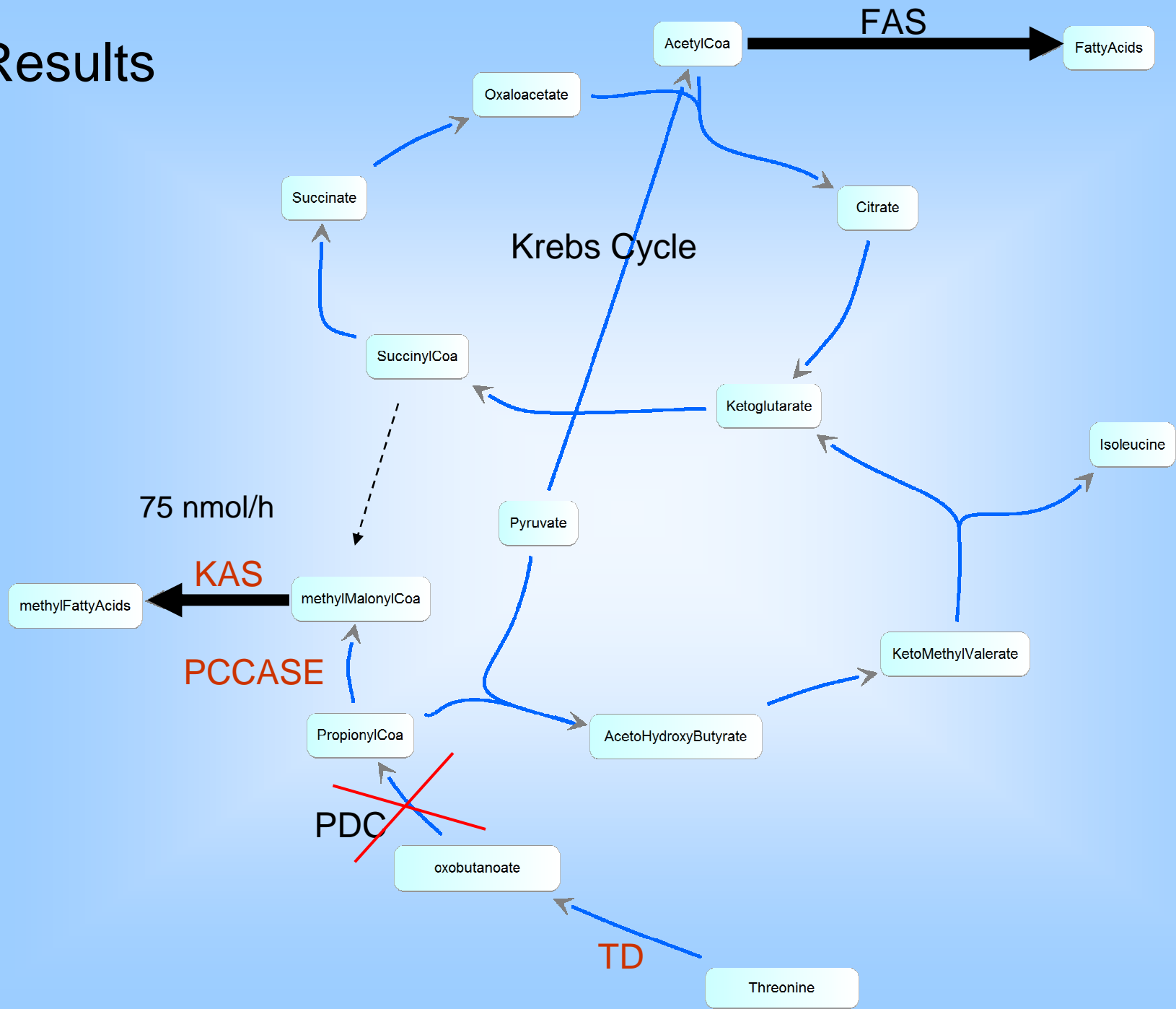


# Results





# Results



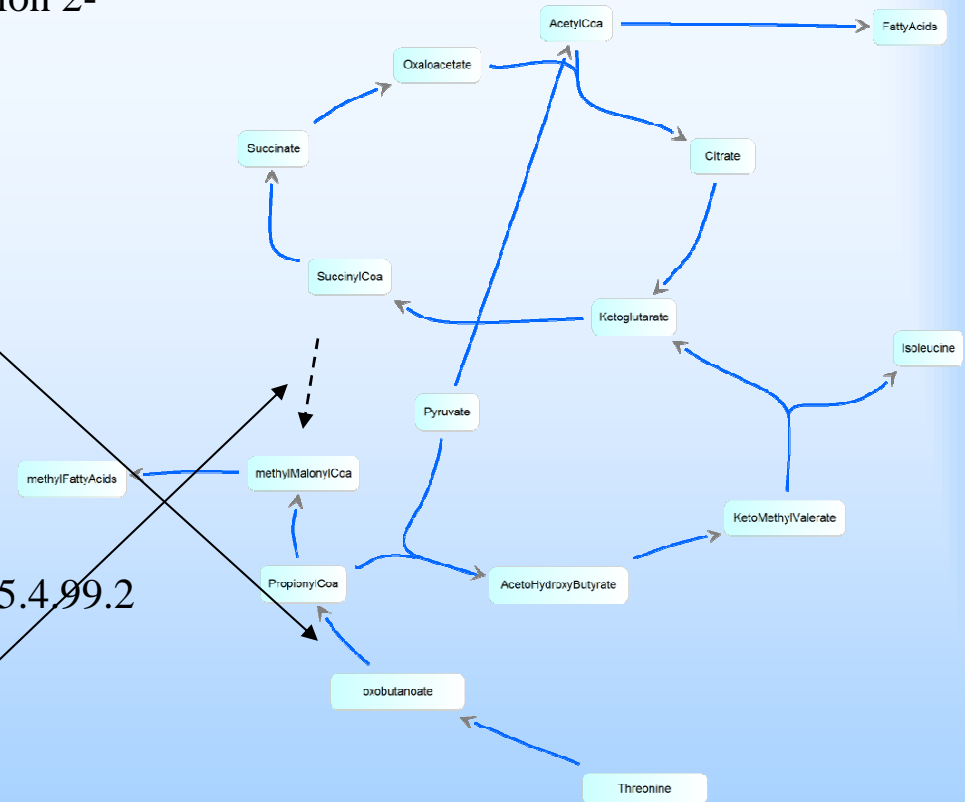
# Conclusion: Proposed strategies

- Introduction of enzyme specific for the reaction 2-oxobutanoate  $\rightarrow$  propionyl-coa

- 2-oxobutanoate dehydrogenase (1.2.4.4)
- 2-oxobutyrate synthase (1.2.7.2)

- Introduction of Methylmalonyl-coa mutase (5.4.99.2)

- Succinyl-coa  $\rightarrow$  methylmalonyl-coa



# The Potential of Biodiesel Production from Fatty Acid Methyl Esters of Some European/Mediterranean and Cosmopolitan Halophyte Seed Oils

*Vassilios T. Sotiroudis, Theodore G. Sotiroudis, and Fragiskos N. Kolisis*

**ABSTRACT:** Biodiesel fuel, mainly produced from edible vegetable oils, has been proposed as a renewable substitute for petroleum diesel. However, there is growing concern about its role in rising food prices, accelerating deforestation, and displacing existing agricultural production. Moreover, given the progressive shortages of freshwater resources and arable land, a major target of investigations is to evaluate the potential utilization of promising salt-tolerant halophytic non-food crops for the sustainable production of oil-rich biomass, which will be converted to fuel. In this paper, an attempt has been made to look into the potential of the exploitation of native halophytic plants in European and Mediterranean arid or semi-arid lands that can prosper in seawater or brackish waters for diesel production in Europe. Fatty acid FA profiles of seed oils of 37 European and Mediterranean halophytic plant species including some of cosmopolitan distribution were examined. The saponification number, iodine value IV, cetane index CI, and gross heat of combustion of FA methyl esters FAMES of oils were calculated from reported FAMES compositions, and they varied from 165.3 to 193.3, from 71.8 to 173.7, from 35.9 to 60.0, and from 39.86 to 40.41 MJ/kg, respectively. FA seed oil content and composition, IV, CI, linolenic acid ME, and polyunsaturated ME with  $\geq 4$  double bonds contents were used to predict the quality of FAME of oil for use as biodiesel, according to EN 14214 European standard. *Crithmum maritimum* and *Crambe maritima*, having more than 30 % fixed oil in their seeds, were found most suitable as alternative vegetable oil sources for the production of biodiesel.

**KEYWORDS:** biodiesel, fatty acid methyl esters, halophyte seed oils

Manuscript: accepted for publication January 13, 2010; published online xx xxxx.

Institute of Biological Research and Biotechnology IBRB, National Hellenic Research Foundation NHRF, 48 Vassileos Constantinou Ave., Athens 11635, Greece.

*Journal of ASTM International*, Vol. 7, No. 3

Paper ID JAI102565

Available online at [www.astm.org](http://www.astm.org)

Copyright © 2010 by ASTM International, 100 Barr Harbor Drive, PO Box C700, West Conshohocken, PA 19428-2959.

# Renewable Fuels and Chemicals

Plant of the Future



New York Times, July 14, 2009

# Exxon to Invest Millions to Make Fuel From Algae

By JAD MOUAWAD

On Tuesday, Exxon plans to announce an investment of \$600 million in producing liquid transportation fuels from algae — organisms in water that range from pond scum to seaweed. The biofuel effort involves a partnership with Synthetic Genomics, a biotechnology company founded by the genomics pioneer J. Craig Venter.

# Publicly available genome databases

- **Microbial genomes and annotation**
- DDBJ <http://www.ddbj.nig.ac.jp/>
- EBI <http://www.ebi.ac.uk/>
- EMBL <http://www.ebi.ac.uk/embl/>
- GenBank (NCBI) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>
- TIGR annotation software <http://www.tigr.org/software/>
- **Comparative genomics**
- ERGO <http://ergo.integratedgenomics.com/ERGO/>
- The SEED <http://theseed.uchicago.edu/FIG/index.cgi>
- GenDB <http://www.cebitec.uni-bielefeld.de/groups/brf/software/gendb/info/index.html>
- GeneQuiz <http://jura.ebi.ac.uk:8765/ext-genequiz/>
- MBGD <http://mbgd.genome.ad.jp/>
- Pedant <http://pedant.gsf.de/>
- Prolinks <http://128.97.39.94/cgi-bin/functionator/pronav>
- String <http://string.embl.de/>
- PUMA2 <http://compbio.mcs.anl.gov/puma2/cgi-bin/index.cgi>
- **Pathway/ Reconstruction tools**
- INSILICO discovery <http://www.insilico-biotechnology.com/fproducts.html>
- MetaFluxNet <http://mbel.kaist.ac.kr/mfn>
- MFAML (Metabolic Flux Analysis Markup Language) <http://mbel.kaist.ac.kr/mfam1>
- SimPheny <http://www.genomatica.com/solutions/simpheny.shtml>
- Pathfinder <http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/pathfinder/>
- PATIKA <http://www.patika.org/>
- **Pathway databases**
- BioSilico <http://biosilico.kaist.ac.kr> or <http://biosilico.org>
- KEGG <http://kegg.com/>
- MetaCyc <http://metacyc.org/>
- MRAD <http://capb.dbi.udel.edu/whisler/>
- Phylosopher <http://www.genedata.com/phylosopher.php>
- PUMA2 <http://compbio.mcs.anl.gov/puma2/cgi-bin/index.cgi>
- EMP <http://www.empproject.com/>
- **Enzymes**
- Brenda <http://www.brenda.uni-koeln.de/>
- KEGG <http://www.kegg.com/>
- IntEnz <http://www.ebi.ac.uk/intenz/>
- **Proteins**
- HAMAP project <http://www.expasy.org/sprot/hamap/>
- InterPro <http://www.ebi.ac.uk/interpro/>
- **E. coli-specific Databases**
- EcoCyc <http://ecocyc.org/>
- Colibri <http://genolist.pasteur.fr/Colibri/>
- GenProtEC <http://genprotec.mbl.edu/>
- CyberCell <http://redpoll.pharmacy.ualberta.ca/CCDB/index.html>
- EchoBase <http://www.ecoli-york.org/>
- **Yeast-specific Databases**
- CYGD <http://mips.gsf.de/genre/proj/yeast/>
- *Saccharomyces* Genome <http://www.yeastgenome.org/>
- Database
- **H. pylori-specific Databases**
- PyloriGene <http://genolist.pasteur.fr/PyloriGene/>
- hp-DPI <http://dpi.nhri.org.tw/protein/hp/ORF/index.php>

# Γενωμική και Βιοηθική

- Οι πληροφορίες που προκύπτουν από το Πρόγραμμα του Ανθρώπινου Γονιδιώματος δίνουν ελπίδες σε ασθενείς σχετικά με την αντιμετώπιση των ασθενειών τους (αλλά βέβαια και στις εταιρίες για την αύξηση των κερδών τους).
- ΕΞΑΤΟΜΙΚΕΥΜΕΝΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ
- ΦΑΡΜΑΚΟΓΕΝΩΜΙΚΗ
- ΠΡΟΒΛΕΨΗ: Τα Σύγχρονα Διαγνωστικά Εργαλεία οδηγούν στη δυνατότητα προ-συμπτωματικών ελέγχων με προφανή ευεργετήματα λόγω της πρώιμης διάγνωσης όσον αφορά τον ασθενή.
- Το **βιοηθικό** πρόβλημα αφορά τους ανθρώπους που δεν είναι μεν ασθενής αλλά διατρέχουν κάποιο κίνδυνο. Κινδυνεύουν από μία πιθανή μελλοντική ασθένεια, κινδυνεύουν όμως και από τον χαρακτηρισμό τους ως πιθανοί ασθενείς. Ακόμη η σκέψη κατευθύνεται στο απώτερο μέλλον και στη λίστα με τα βιοηθικά θέματα προστίθενται παλαιότερα και ξεχασμένα από τη κοινωνία όπως η ευγονική, η κλωνοποίηση, η «κατασκευή» παιδιών.

- **".....the patenting of a single human gene has nothing to do with the patenting of human life. Even if every gene in the human genome were cloned (and possibly patented) it would be impossible to reconstitute a human being from the sum of its genes".**
- **« ... το πατεντάρισμα ενός ανθρώπινου γονιδίου δεν έχει τίποτα να κάνει με το πατεντάρισμα της ανθρώπινης ζωής. Ακόμη και αν κάθε γονίδιο του ανθρώπινου γονιδιώματος κλωνοποιηθεί (και πιθανά πατενταρισθεί) είναι αδύνατο να ξανακατασκευασθεί μία ανθρώπινη ύπαρξη από το άθροισμα των γονιδίων της»**



# Παλιά ερωτήματα που πρέπει να ξαναϊδωθούν στο φως των σημερινών εξελίξεων

Η δυνατότητα Γενετικού Ελέγχου φέρνει στο προσκήνιο το ενδεχόμενο γενετικών διακρίσεων από κυβερνήσεις, ασφαλιστικές εταιρίες, εργοδότες, σχολεία, τράπεζες, κ.ά..

- Θα υπάρξει γενετική διάκριση από τις ασφαλιστικές εταιρείες και τους εργοδότες σχετικά με τη παροχή ασφάλειας ή εργασίας.
- Ποιές θα είναι οι επιπτώσεις στη ψυχολογική κατάσταση του ανθρώπου και στο πιθανό στιγματισμό του από την ανάλυση του γονιδιώματός του
- Ποιές θα είναι οι κοινωνικές επιπτώσεις από τη δυνατότητα γενετικής διάγνωσης της εφυΐας, της εγκληματικότητας, της ομοφυλοφιλίας κ.ά.

- ..... η αναζήτηση ενός ανοιχτού και ειλικρινή διαλόγου με την κοινωνία, ενός διαλόγου που δεν θα αναγνωρίζει “αφεντικά και δούλους “, αλλά ίσους συνεταιίρους μιας σύνθετης και σύγχρονης κοινωνίας που αποδέχεται τα ενδιαφέροντα του κάθε ενός και αναγνωρίζει ότι ο καθένας εξαρτάται από τον άλλο. Ένας τέτοιος διάλογος μπορεί να έχει επιτυχία μόνο αν ισχύσουν τα εξής δύο προαπαιτούμενα
- 1) ένα κοινό ελάχιστο επίπεδο γνώσης στη μία πλευρά και
- 2) μια δεδομένη ευαισθησία στους προβληματισμούς της κοινωνίας, ένα ευήκοον ούς στους ευρύτερους προσανατολισμούς των επιστημονικών πραγμάτων από την άλλη.

*George Cohen*, Γάλλος Ακαδημαϊκός, από την ομιλία του κατά την αναγόρευσή του σε επίτιμο διδάκτορα του ΕΜΠ, Ανοιξη 2005