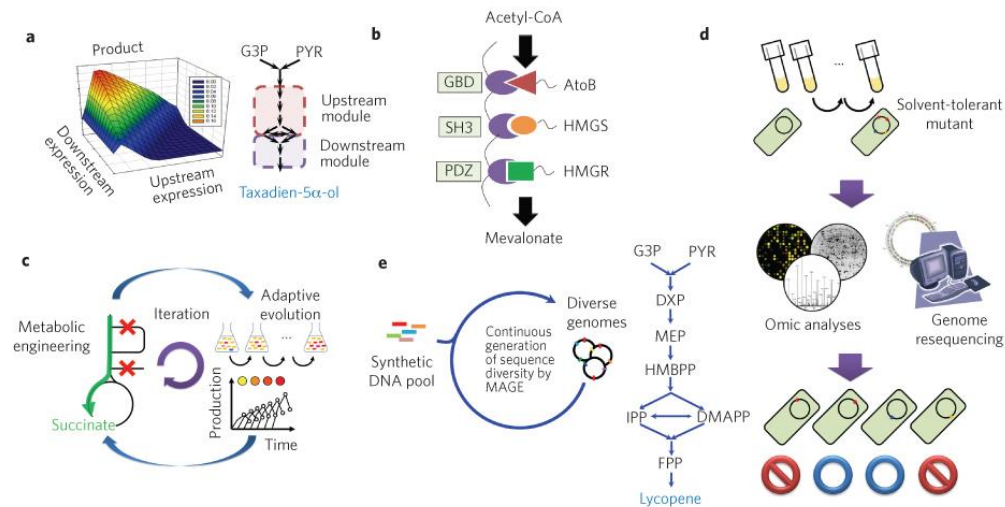




Εισαγωγή στη μεταβολική μηχανική



Καθηγητής
Δημοσθένης Σαρηγιάννης

Εργαστήριο Περιβαλλοντικής Μηχανικής



Περιεχόμενα μαθήματος

1. Εισαγωγή στη μεταβολική μηχανική
2. Κυτταρικός μεταβολισμός
3. Μοντέλα κυτταρικών αντιδράσεων
4. Ισοζύγια μάζας και ενέργειας στα κύτταρα
5. Ρύθμιση μεταβολικών μονοπατιών
6. Παραδείγματα μεταβολικής χειραγώγησης - η μεταβολική μηχανική στην πράξη
7. Σύνθεση μεταβολικών μονοπατιών
8. Ανάλυση μεταβολικών ροών και εφαρμογές
9. Ανάλυση ελέγχου του μεταβολισμού
10. Δομική ανάλυση μεταβολικών δικτύων
11. Δυναμική ανάλυση των ροών μεταβολικών δικτύων
12. Κυτταρική μηχανική και η συνολική λειτουργία των μεταβολικών δικτύων



Τι είναι η μεταβολική μηχανική

- Μεταβολική μηχανική είναι το πεδίο το οποίο στοχεύει στην τροποποίηση γενετικών και ρυθμιστικών κυτταρικών διεργασιών προκειμένου να αυξηθεί η παραγωγή συγκεκριμένων ουσιών μέσα στο κύτταρο.
- Η μεταβολική μηχανική δημιουργεί εξελιγμένους βιοκαταλύτες ικανούς:
 1. να ενισχύσουν την παραγωγή ενός προϊόντος που είναι ενδογενές ενός μικροοργανισμού,
 2. να δημιουργήσουν χρήσιμα προϊόντα τα οποία ο μικροοργανισμός δεν είχε ποτέ παράξει στο παρελθόν,
 3. να συνθέσουν εντελώς καινοφανή προϊόντα.



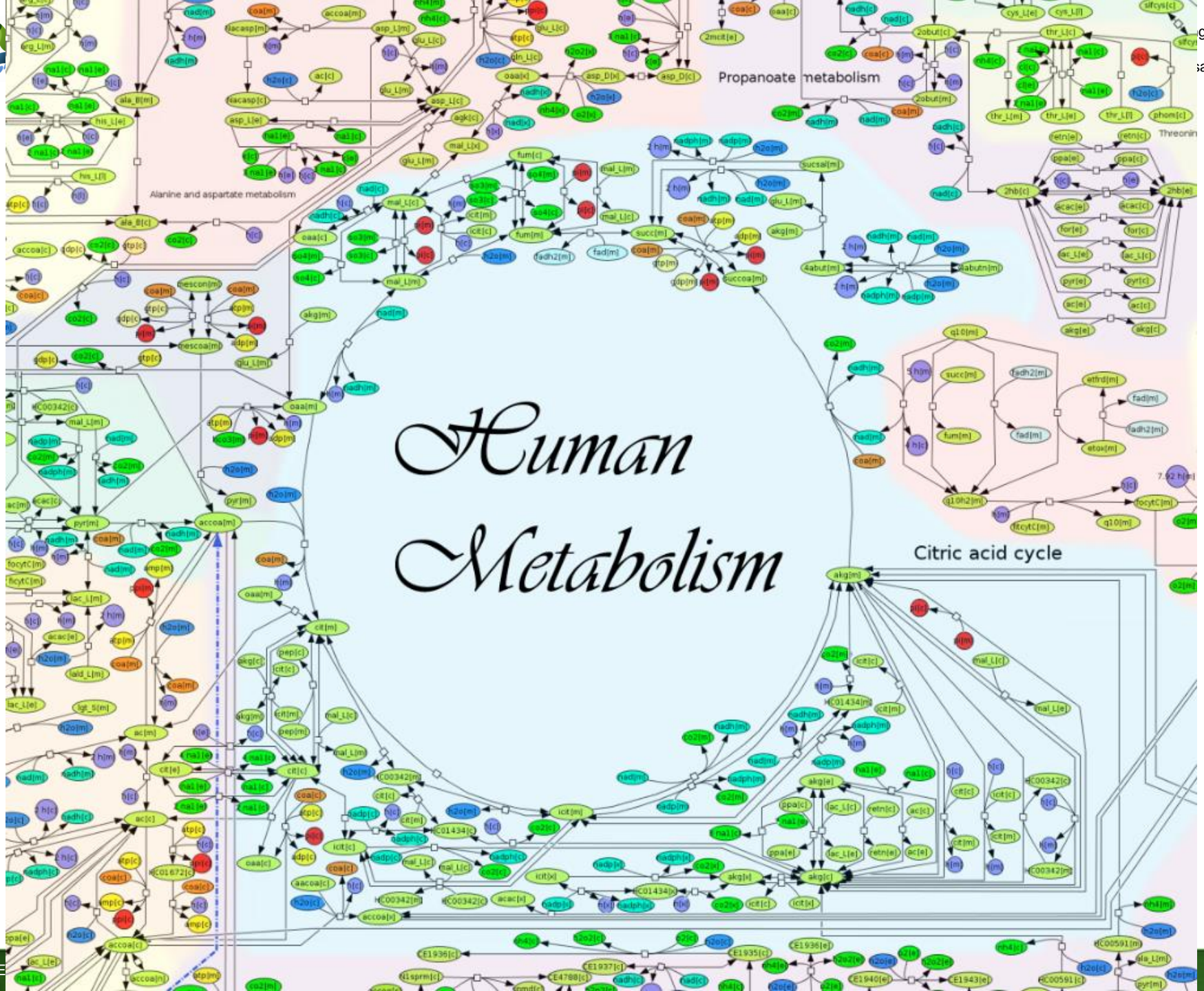
Ρόλος μεταβολικής μηχανικής

- Η μεταβολική μηχανική ασχολείται με τις ιδιότητες ολόκληρων μεταβολικών δικτύων και όχι μεμονωμένων γονιδίων ή ενζύμων,
- Σχετίζεται περισσότερο με τη βιολογία συστημάτων, καθώς ενέχει την ολιστική προσέγγιση.
- Για τη βελτιστοποίηση της απόδοσης των μεταβολικών μονοπατιών κάνει ευρεία χρήση μοριακής βιολογίας αλλά και λειτουργεί με σκεπτικό αντίστοιχο με εκείνο της χημικής μηχανικής.



Τι κάνει ο επιστήμονας

- Χρησιμοποιεί κατάλληλες τεχνολογίες για να μετρήσει τη ροή των μεταβολικών δικτύων στα κύτταρα και εντοπίζει πιθανά σημεία όπου η ροή εμποδίζεται.
- Μετρά τον ρυθμό με τον οποίο ένα προϊόν A γίνεται B με τη βοήθεια ενός ενζύμου E1, τον ρυθμό με τον οποίο το B γίνεται Γ με τη βοήθεια ενός ενζύμου E2, κτλ. ως ένα τελικό προϊόν.
- Η μελέτη καταδεικνύει πιθανά σημεία που λειτουργούν ως περιοριστικοί παράγοντες για τον σχηματισμό ή όχι του τελικού προϊόντος το οποίο μπορεί να βρίσκεται αρκετά βήματα πιο μακριά. Έτσι, μπορεί κανείς να εντοπίσει ποια είναι τα σημεία στα οποία θα πρέπει να παρέμβει για να έχει το επιθυμητό αποτέλεσμα.
- Η παρέμβαση αυτή γίνεται με διάφορες μεθόδους, πολλές από τις οποίες προέρχονται από τη μοριακή βιολογία και βιοτεχνολογία με τα μεταβολικά δίκτυα να είναι συνήθως διακλαδιζόμενα και όχι γραμμικές αλληλουχίες αντιδράσεων.



Human Metabolism



Επιμέρους στόχοι της ενζυμικής μηχανικής

- Η τροποποίηση της εκλεκτικότητας ως προς το υπόστρωμα (αλλαγή στην τοπο-εκλεκτικότητα ή την εναντιο-εκλεκτικότητα)
- Η αύξηση της θερμο-ανθεκτικότητας και της λειτουργικής σταθερότητας
- Η τροποποίηση της εξάρτησης από το pH. (μέσω της μεταβολής του ηλεκτροστατικού περιβάλλοντος στο ενεργό κέντρο του ενζύμου αποτέλεσμα της εισαγωγής/ αντικατάστασης ενός ή περισσότερων αμινοξέων)
- Η αύξηση της αντοχής σε οξειδωτικά αντιδραστήρια. (εισαγωγή μέσω κατευθυνόμενων μεταλλάξεων, αμινοξέων λιγότερο ευαίσθητων σε οξειδωτικές συνθήκες
- Βελτίωση της δραστηριότητας και σταθερότητας σε μη υδατικά διαλύματα
- Η αύξηση της σταθερότητας των ενζύμων σε πρωτεολυτική υδρόλυση
- Ο σχεδιασμός και η εφαρμογή μίμων ενζύμων (Κατασκευή μορίων που παρουσιάζουν καταλυτική δράση μιμούμενα
- Το ένζυμο)
- Η συγχώνευση ενζύμων που συμμετέχουν σε μια βιοχημική οδό σε ένα νέο βιομόριο με πολλαπλή καταλυτική δράση



Σύνδεση με την οικονομία

- Η μεταβολική μηχανική αποτελεί πλατφόρμα ανάπτυξης μια νέας βιώσιμης οικονομίας που στηρίζεται σε ανανεώσιμες πρώτες ύλες αντί σε μη ανανεώσιμα καύσιμα (πετρέλαιο, άνθρακα ή φυσικό αέριο).
- Τα βιοκαύσιμα όπως το βιοντίζελ που παράγεται σήμερα προέρχεται από έλαια. Αν και η παραγωγή βιοκαυσίμων είναι ιδιαίτερα σημαντική, η χρήση πιθανών τροφίμων για την παραγωγή καυσίμων προκαλεί φαινόμενα μειωμένης επάρκειας και αύξησης των τιμών. Για να είναι βιώσιμη η παραγωγή βιοκαυσίμων, θα πρέπει να βασίζεται στους υδατάνθρακες. Χάρη στη μεταβολική μηχανική είναι δυνατή η παραγωγή λιπών από σάκχαρα μέσω μικροβιακών διεργασιών με πολύ ικανοποιητική απόδοση.
- Οι μικροοργανισμοί που έχουν δημιουργηθεί έχουν τη δυνατότητα να παράγουν έλαια για βιοκαύσιμα με κόστος συναγωνίσιμο αυτού των πετρελαιοκαυσίμων. Γενικά, η μεταβολική μηχανική μπορεί να συμβάλει καθοριστικά ώστε να επέλθει απεμπλοκή από τις κλασικές πηγές που ολοένα μειώνονται, ενώ ταυτόχρονα θα παράσχει λύσεις για την προστασία του περιβάλλοντος.



Γιατί αναπτύσσουμε τη μεταβολική μηχανική?



- Έλεγχος
- Χημικοί λόγοι
- Κόστος
- Παραγωγή, παραγωγικότητα και απόδοση
- Φάρμακα
- Πρόδρομες ενώσεις ή δομικά υλικά
- Βιοκαύσιμα



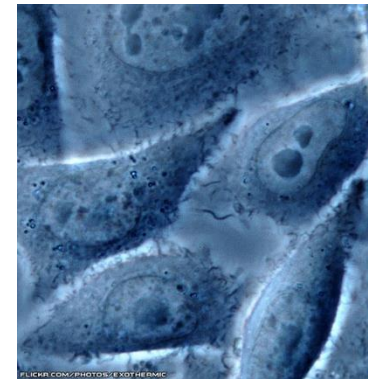
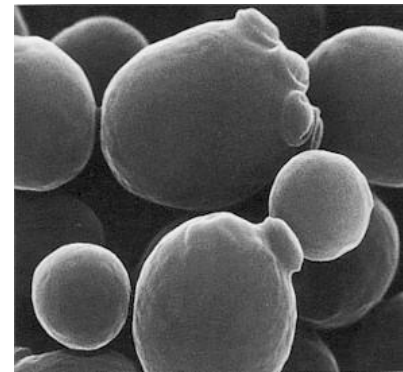
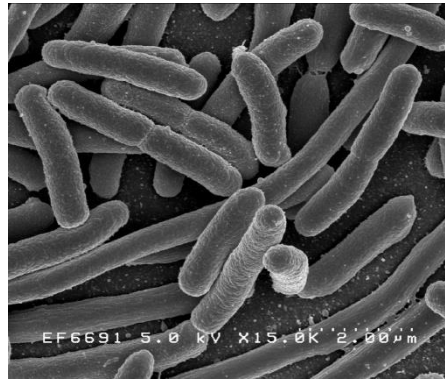
Βασικές αρχές βιοτεχνολογίας



- Επιλογή του κατάλληλου κυττάρου
- Παραγωγή ή προμήθεια DNA το οποίο περιέχει τους επιθυμητούς φαινότυπους
- Εισαγωγή του DNA στον φορέα δέκτη
- Εισαγωγή του φορέα στον οργανισμό στόχο
- Απομόνωση μόνο των κυττάρων που περιέχουν το νέο DNA
- Ανάπτυξη και αξιοποίηση των κυττάρων αυτών
- Όφελος

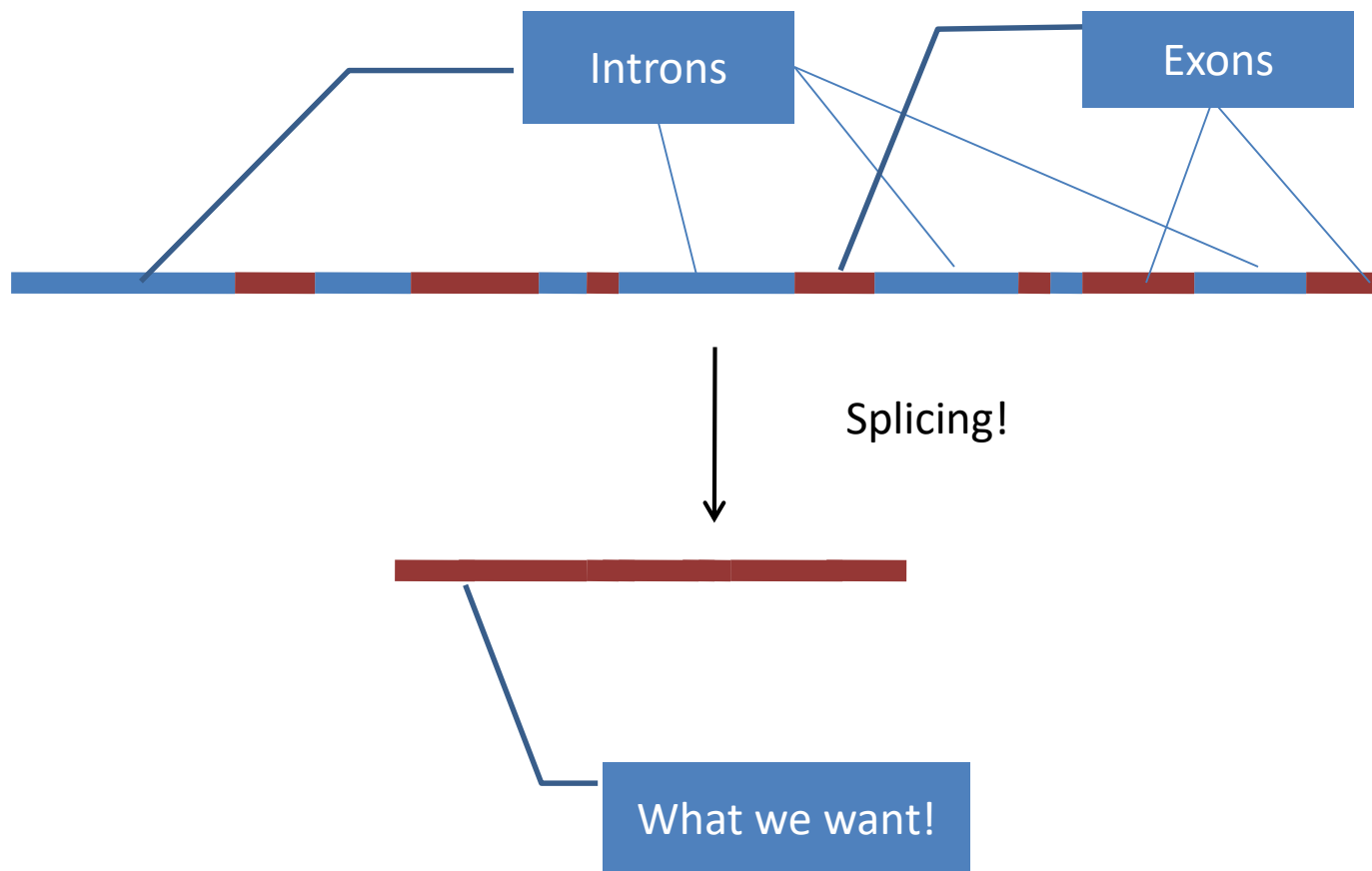
Επιλογή στελέχους

- Συμβατότητα
- Κόστος
- Ταχύτητα
- Ασφάλεια



	Doubling Time	Cost	Glycosylation
E. coli	30 min	Low	None
S. cerevisiae	1-2 hours	Low	Yes, but often incompatible with human
Mammalian (CHO/BHK)	~ day	Very High	Yes, and more similar with human

Obtain some DNA





Κλωνοποίηση και υπερέκφραση

Εισαγωγή του νέου τμήματος DNA



Πλασμιδίο

Τμήμα DNA

Εισαγωγή στα κύτταρα δέκτες



Νέο ανασυνδισμένο πλασμιδίο

Επιλογή



Μετασχηματισμός

Πολλαπλασιασμός

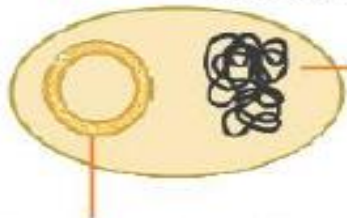


Επιλογή



Κλώνοι

Βακτήριο



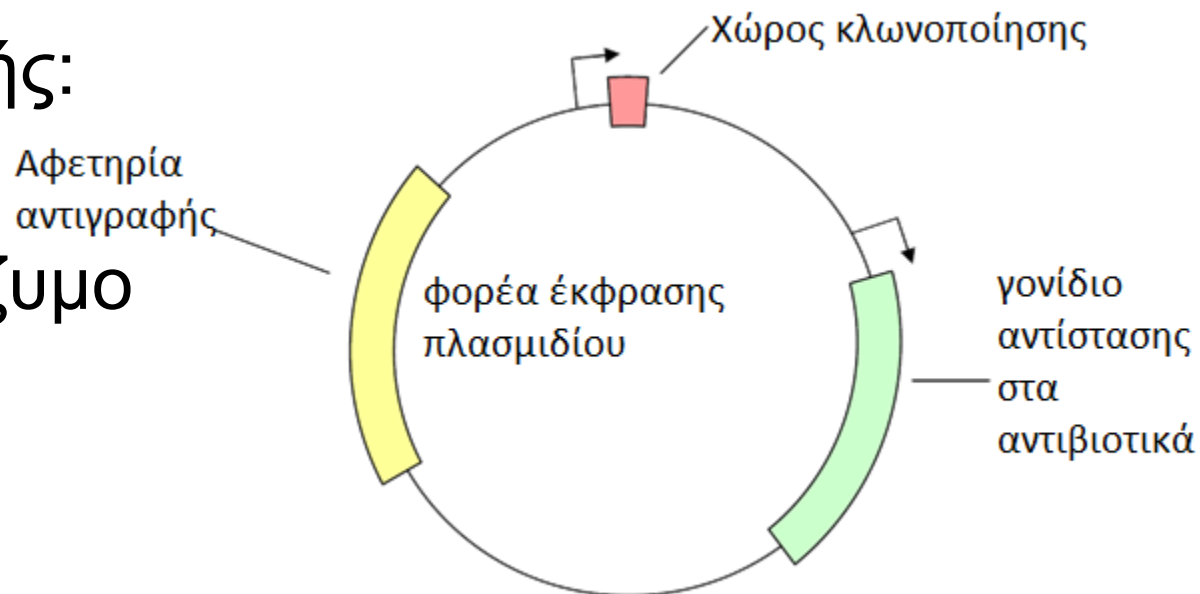
Γενωμικό (DNA)
Γενετική βασική πληροφορία

Πλασμιδιακό (DNA)
Γενετική επιπλέον πληροφορία



Εισαγωγή DNA στον ξενιστή

- PCR για την παραγωγή περισσότερου DNA
- Εργαλεία εισαγωγής:
 - Λιγάσες
 - Περιοριστικό ένζυμο
 - Ρεκομπινάσες





Απομόνωση των επιθυμητών κυττάρων

- Ανασυνδιασμός του πλασμιδίου και του κυττάρου- ξενιστή
- Ελπίζουμε για το καλύτερο

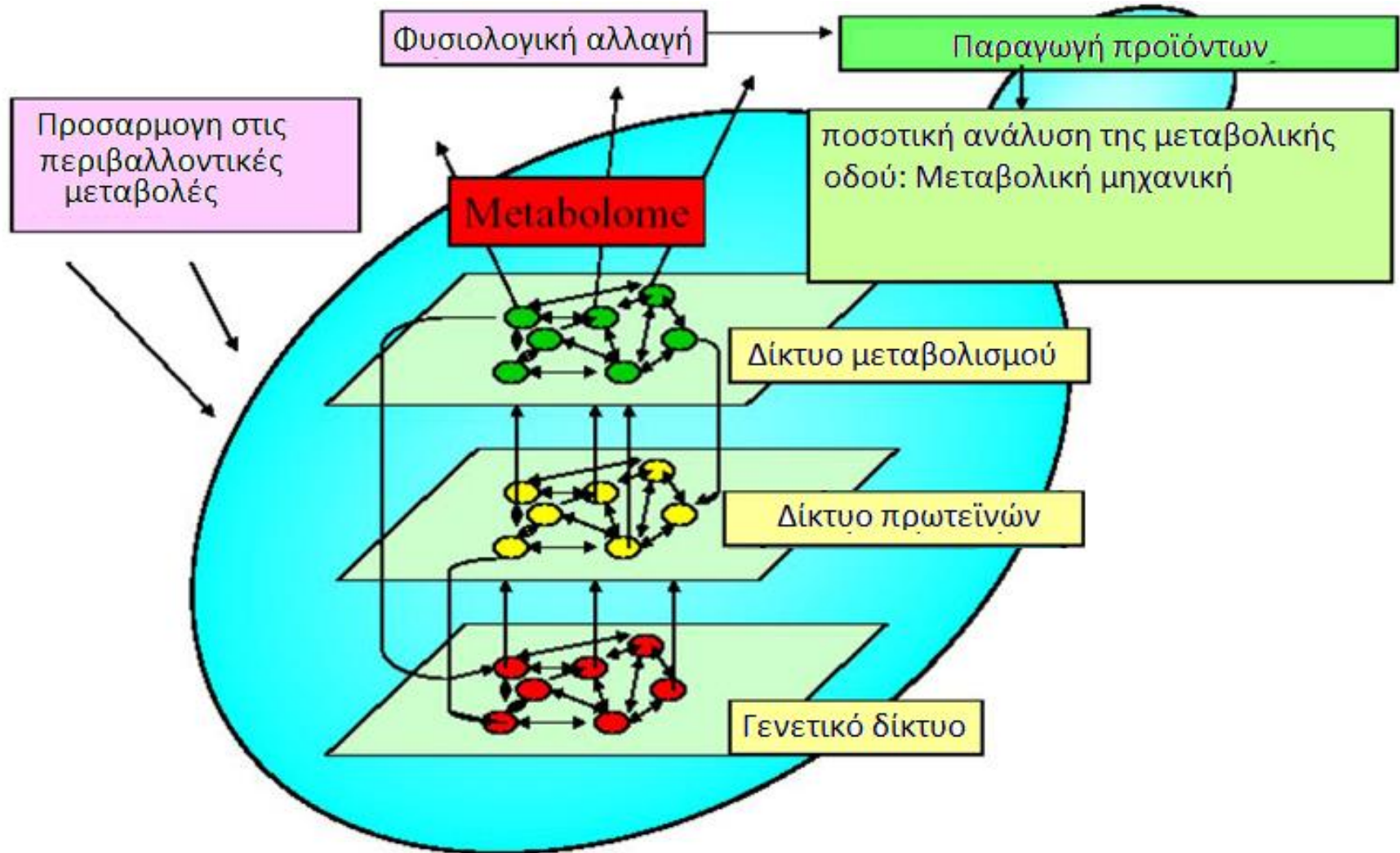


- Θανάτωση κυττάρων με χρήση αντιϊκών
- Κύτταρα που παρουσιάζουν αντίσταση επιβιώνουν
- Ανάπτυξη των κυττάρων
 - Σε τρυβλία
 - Σε αντιδραστήρα





κατανοώντας τον κυτταρικό μεταβολισμό





Genomics

Τι είναι δυνατό



Transcriptomics

Τι φαίνεται ότι συμβαίνει



Proteomics

Τι το κάνει να συμβεί



Metabolomics

Τι συμβαίνει



Phenotypes

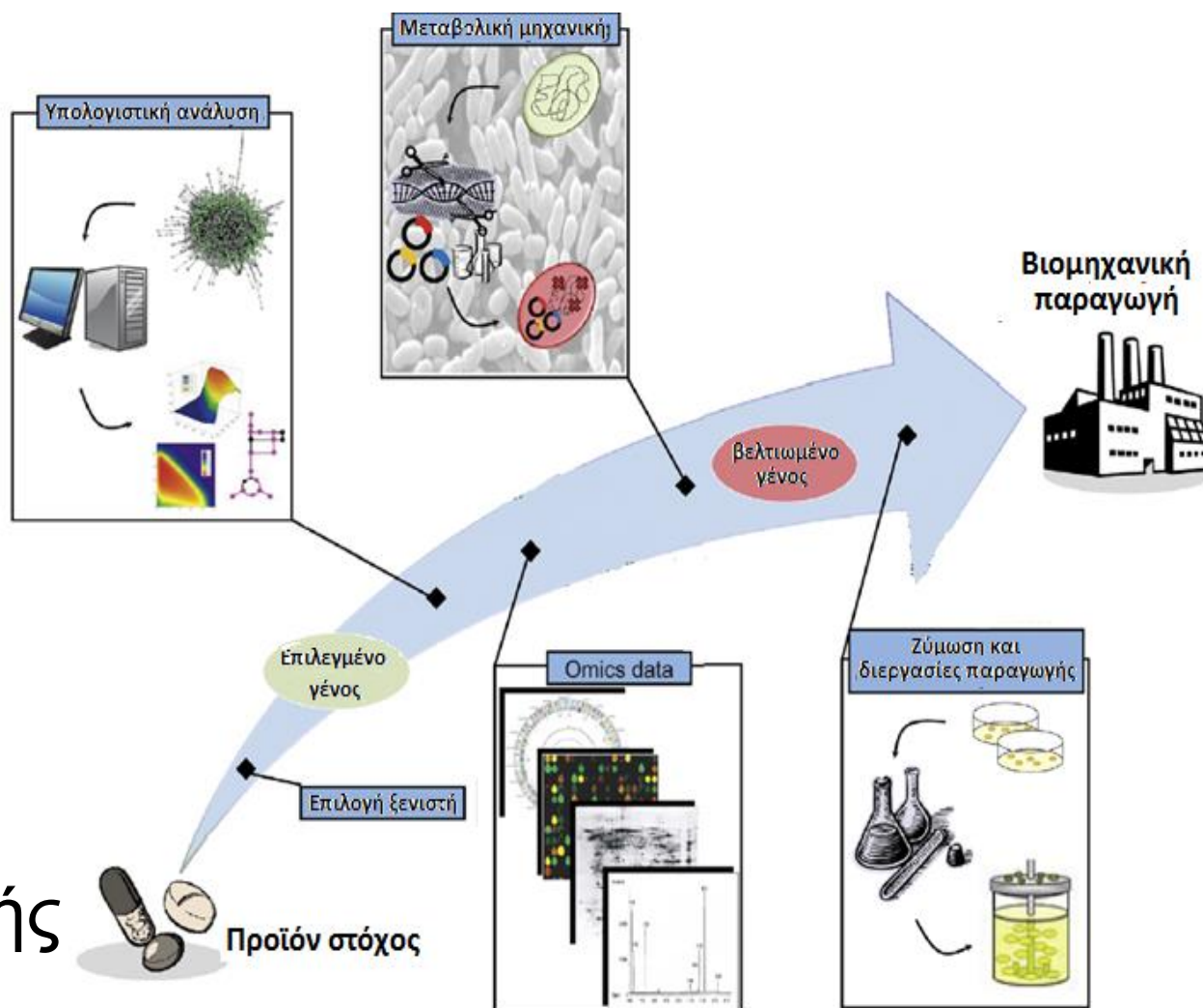
Τι φαίνεται



Στρατηγική μεταβολικής μηχανικής

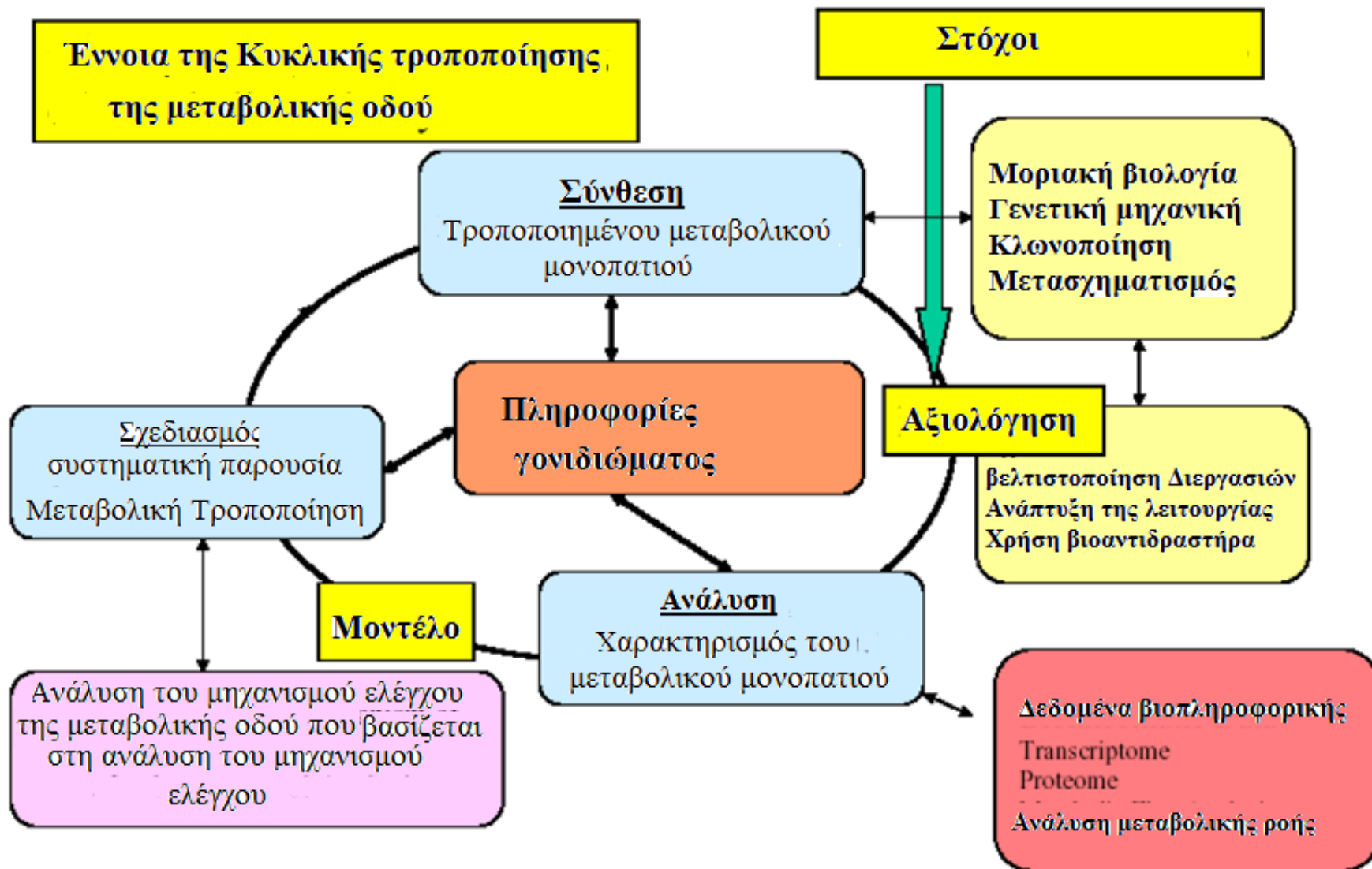


- Τεχνικές Γονιδιωματικής ανάλυσης
- Προσομοίωση πολύπλοκων μονοπατιών
- - Ανάλυση μεταβολικής ροής



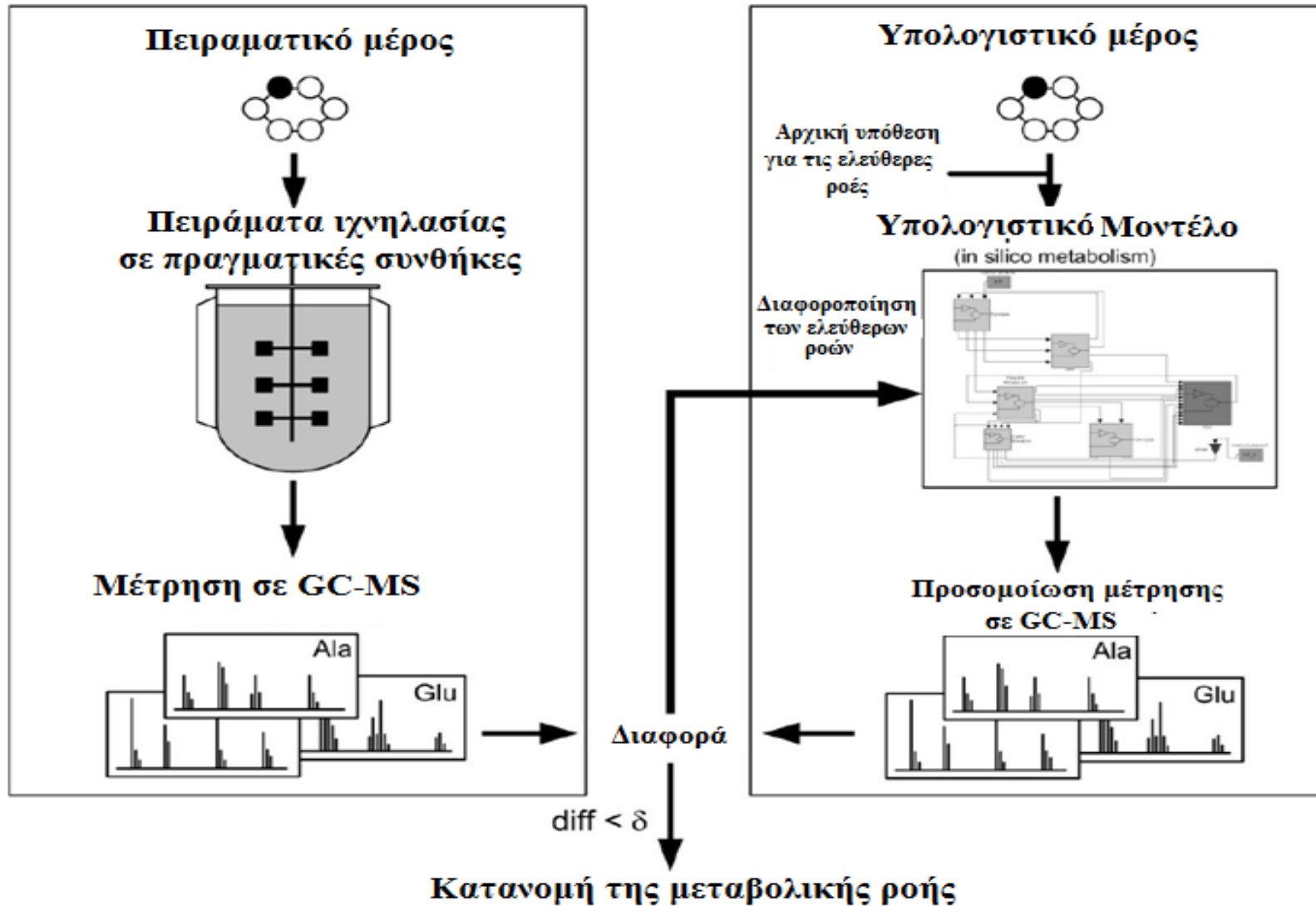


Στρατηγική μεταβολικής μηχανικής





Στρατηγική μεταβολικής μηχανικής





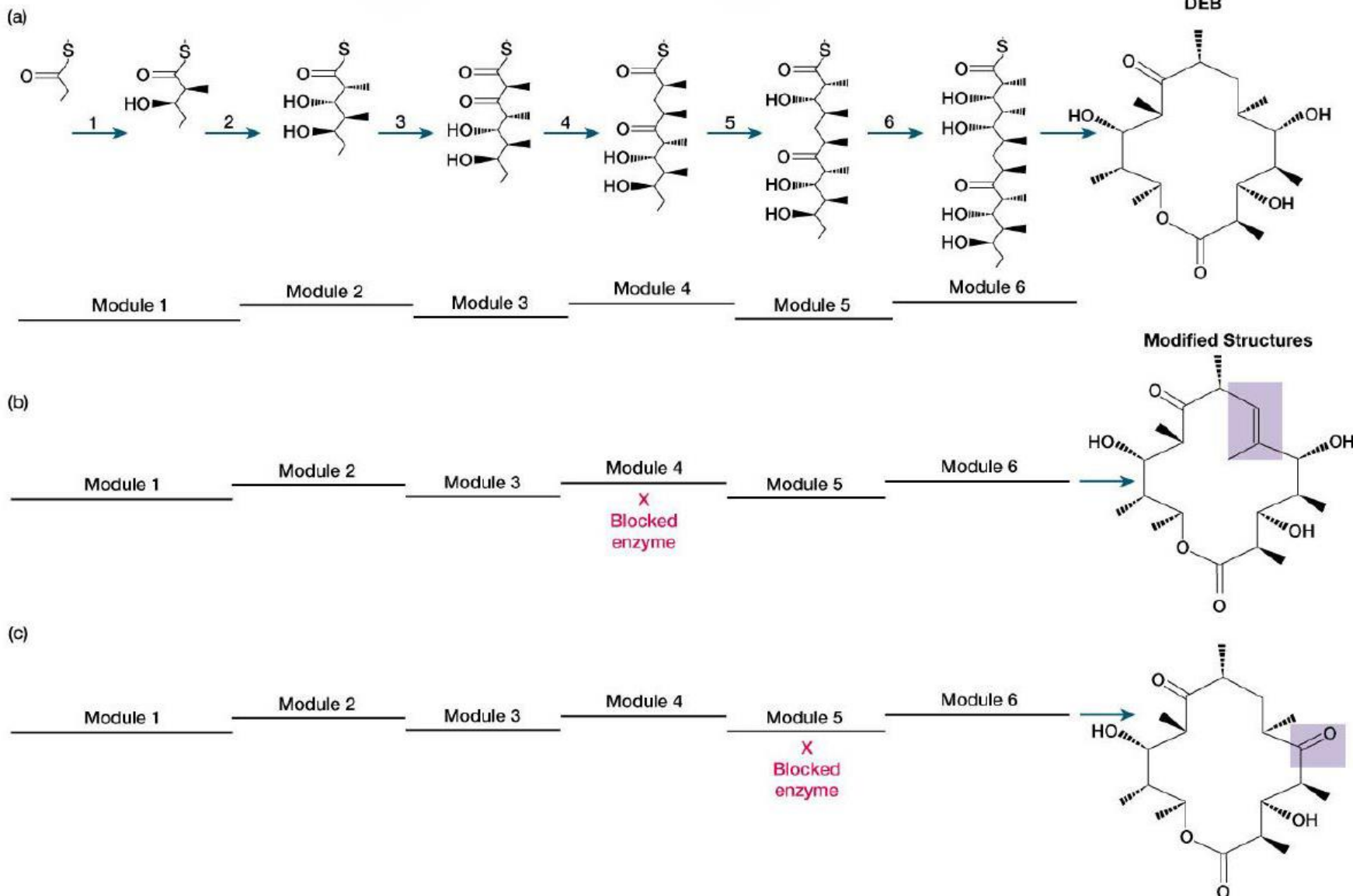
Μεθοδολογίες μεταβολικής μηχανικής



- Ανάλυση μεταβολικής ροής και παρατήρηση της μεταβολικής οδού
- Ανάλυση των ικανοτήτων του κυττάρου
- Ανάλυση της μεταβολικής ροής σε πραγματικό χρόνο
- Μεταβολική ανάλυση και έλεγχος περίπλοκων βιοδικτύων
- Πειραματικός προσδιορισμός της ροής και διανομής με ισοτοπική σήμανση
- Κινητική ανάλυση
- Ενσωμάτωση της βιοπληροφορικής

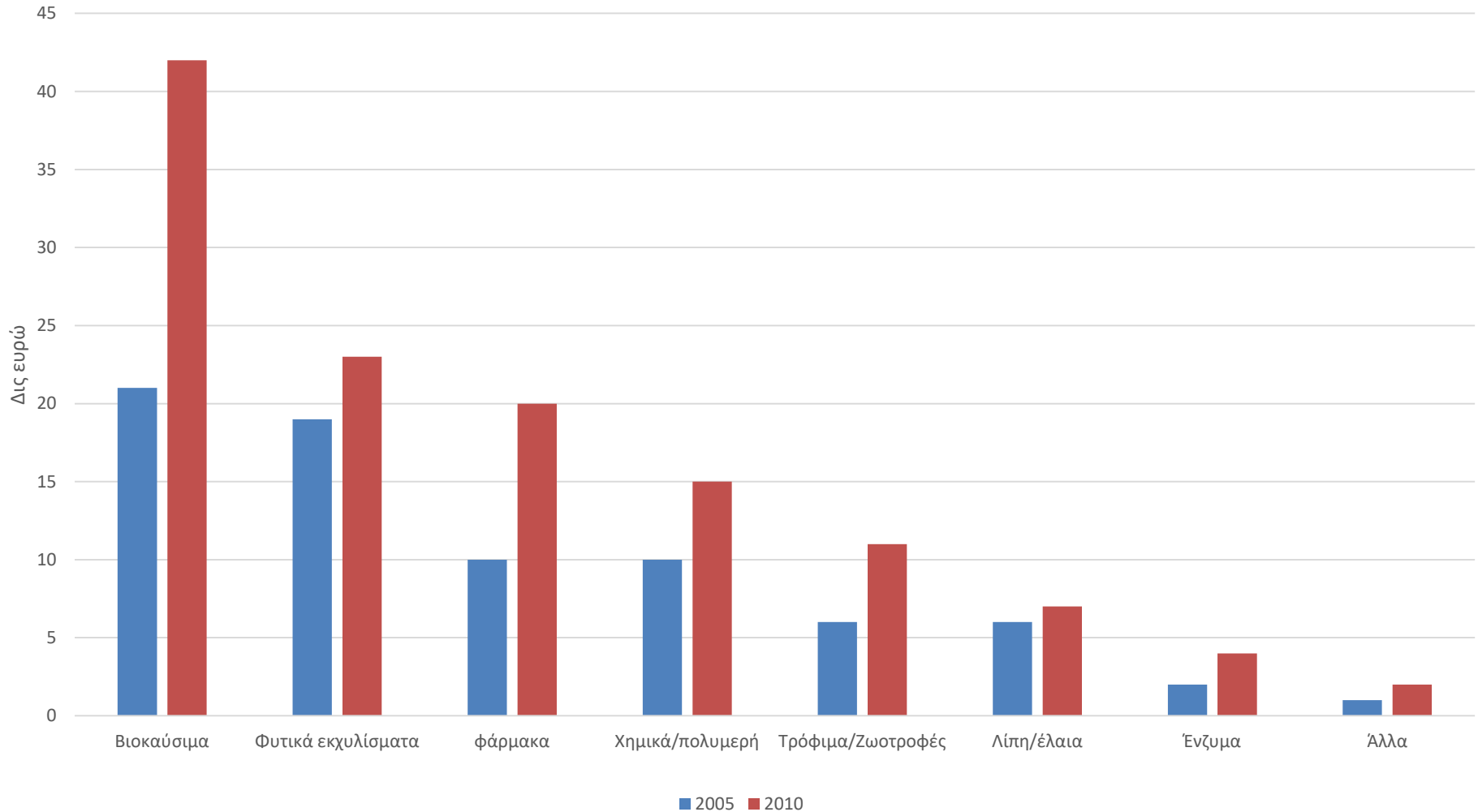


Εφαρμογή μεταβολικής μηχανικής





Λευκή βιοτεχνολογία ετήσιος τζίρος





***Thank you for your kind
attention***



www.enve-lab.eu

A connectivity perspective to environmental health