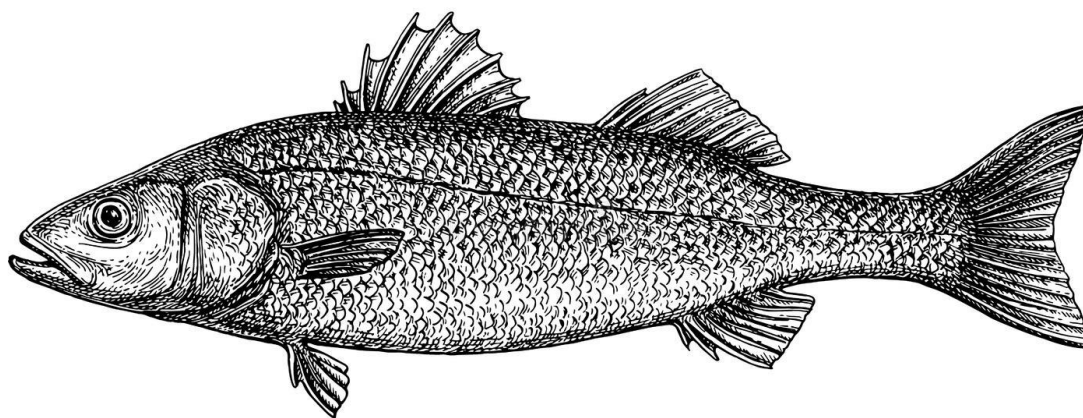


## Η γενετική βάση της φρεσκότητας

Μίνως Σοφούλης



Λάρισα, 2022

**Η γενετική βάση της φρεσκότητας**

**The genetic basis of freshness**

## **Επιβλέπουσα καθηγήτρια**

Σαραφίδου Θεολογία,  
Επίκουρος Καθηγήτρια Μοριακής Γενετικής Ζωικών Οργανισμών,  
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

## **Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή**

Σαραφίδου Θεολογία,  
Επίκουρος Καθηγήτρια Μοριακής Γενετικής Ζωικών Οργανισμών,  
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Μούτου Αικατερίνη,  
Καθηγήτρια Βιολογίας Σπονδυλωτών,  
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Στάγκος Δημήτριος,  
Επίκουρος Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών,  
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

## Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας, υπό την επίβλεψη της Επ. Καθηγήτριας κ. Θεολογίας Σαραφίδου, την οποία και θέλω να ευχαριστήσω θερμά για την ευκαιρία που μου έδωσε, καθώς και για την βοήθεια και την καθοδήγηση της.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω ιδιαίτέρως και τα μέλη της τριμελούς εξεταστικής επιτροπής, την Καθηγήτρια κ. Αικατερίνη Μούτου, και τον Επ. Καθηγητή κ. Δημήτριο Στάγκο, για την καθοδήγηση και τις σημαντικές συμβουλές τους.

Θέλω επίσης να ευχαριστήσω όλα ανεξαιρέτως τα μέλη του εργαστηρίου, τα οποία, δημιουργώντας ένα κλίμα εξαιρετικά φιλικό και συνεργατικό, έκαναν την κάθε ημέρα καλύτερη, και ιδιαιτέρως τον υποψήφιο διδάκτορα Ραφαήλ Αγγελακόπουλο, με τον οποίο συνεργάστηκα για την εκπόνηση της διπλωματικής, και ο οποίος με βοήθησε με κάθε τρόπο, στο τεχνικό, στο επιστημονικό και στο ψυχολογικό κομμάτι, για μια ακόμη φορά.

Τέλος, θέλω να ευχαριστήσω τους φίλους και την οικογένεια μου, για την συνεχή υποστήριξη τους, στα εύκολα και στα δύσκολα.

## Περίληψη

Η πρωτεόλυση του λευκού μυός μετά την θανάτωση του λαβρακιού έχει μεγάλη επίδραση στην ποιότητα και την φρεσκότητα του φιλέτου του, και συνεπώς στην επιλογή του από τον καταναλωτή και την εμπορική του αξία. Η ποιότητα του φιλέτου επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό από την αποικοδόμηση του μυϊκού ινιδίου και του κολλαγόνου του συνδετικού ιστού.

Δυο οικογένειες πρωτεασών με έντονη ανάμειξη στην *post mortem* πρωτεόλυση είναι η οικογένεια των καλπαϊνών και η οικογένεια των μεταλλοπρωτεϊνών (MMPs) του εξωκυττάριου πλέγματος. Οι καλπαΐνες ανήκουν στην υπεροικογένεια των παπαϊνών, και είναι εξαρτώμενες από το  $\text{Ca}^{2+}$  ενδοπεπτιδάσες κυστεΐνης, των οποίων η *post mortem* δράση έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση πρωτεϊνών από το μυϊκό ινίδιο. Οι MMPs είναι μια οικογένεια εξαρτώμενων από το  $\text{Zn}^{2+}$  ενδοπεπτιδασών, οι οποίες συνολικά διαθέτουν την ικανότητα πρωτεόλυσης όλων των στοιχείων του εξωκυττάριου πλέγματος, συμπεριλαμβανομένου και του κολλαγόνου.

Όταν μια διαδικασία, όπως αυτή της *post mortem* πρωτεόλυσης, επηρεάζει ένα τόσο σημαντικό χαρακτηριστικό ενός τροφίμου, είναι ιδιαίτερης σημασίας να γνωρίζουμε τα γονίδια που το επηρεάζουν, καθώς και τους πολυμορφισμούς οι οποίοι μπορούν να τροποποιήσουν την δραστικότητα των ενζύμων που το προκαλούν. Σε αυτήν την αναζήτηση, πολύ βοηθητικός είναι ο εντοπισμός SNPs των οποίων ο γονότυπος δείχνει να έχει επιρροή στην έκταση του φαινομένου. Έτσι, μπορούμε μελλοντικά να προχωρήσουμε σε επιλογή ή και σε γενετική τροποποίηση των ψαριών, ώστε να επιτευχθεί χαμηλότερη δραστικότητα των ενζύμων αυτών.

Σε αυτό το πλαίσιο, βασικός στόχος της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η μελέτη των παρανοηματικών SNPs δυο γονιδίων που κωδικοποιούν ένζυμα των παραπάνω οικογενειών, του *CAPN15b* (καλπαΐνη) και του *MMP13a* (μεταλλοπρωτεϊνάση), και η αναζήτηση πιθανής συσχέτισης των διαφορετικών γονοτύπων των SNPs με διαφορές στην δραστικότητα των ενζύμων.

Λέξεις κλειδιά: καλπαΐνες, MMPs, *post mortem* πρωτεολυτική δραστικότητα, συσχέτιση SNPs

# Abstract

Post mortem white muscle proteolysis has a profound effect on the European seabass fillet's quality and freshness, which consequently affects the chance of it getting picked by the consumer, as well as its economic value. A great part of the post mortem proteolytic activity is the degradation of the myofibril and the connective tissue's collagen.

Calpains and MMPs (matrix metalloproteinases) are two families of enzymes involved in post mortem proteolysis. Calpains are  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent cysteine endopeptidases that belong to the papain superfamily. Their post mortem proteolytic activity leads to the release of certain myofibrillar proteins. MMPs are  $\text{Zn}^{2+}$ -dependent endopeptidases that have the cumulative ability to proteolyze all the components of the extracellular matrix, including collagen.

In the case of a procedure with an effect as important as the one post mortem proteolysis exerts on a major quality characteristic of a food product, it is important to discover the genes responsible for it, as well as any polymorphisms that may impact the activity of the enzymes causing the procedure. Finding SNPs whose genotype apparently affects the procedure can be extremely helpful in this pursuit, allowing us to select or genetically edit fish, in order for them to present lower enzymatic activities.

In this context, the main goal of this thesis was to study the missense SNPs found in two genes encoding enzymes of the families mentioned before, i.e., CAPN15b and MMP13a, a calpain and an MMP, respectively, and to discover whether these genes' genotypes can be associated with changes in the enzymatic activity.

**Keywords:** calpains, MMPs, *post mortem* proteolytic activity, SNPs association

## Πίνακας Περιεχομένων

<b>1. Βιβλιογραφική ανασκόπηση .....</b>	<b>9</b>
1.1 Το λαβράκι .....	9
1.1.1 Γενικά χαρακτηριστικά του λαβρακιού .....	9
1.1.2 Το γονιδίωμα του λαβρακιού .....	12
1.2 Η αλλοίωση του φιλέτου και ο ρόλος των πρωτεασών .....	12
1.2.1 Οι πρωτεΐνες του μυός του ψαριού .....	13
1.2.2 Τα πρωτεολυτικά συστήματα του κυττάρου .....	15
1.2.3 Καλπαΐνες και <i>post mortem</i> αλλοίωση.....	16
1.2.4 Μεταλλοπρωτεάσες και <i>post mortem</i> αλλοίωση.....	18
1.3 Επίδραση των SNPs στην έκφραση και την δραστικότητα.....	21
1.3.1 Κατηγοριοποίηση SNPs.....	21
1.3.2 SNPs και έρευνα.....	22
1.4 Μέθοδοι θανάτωσης .....	23
1.4.1 Ασφυξία .....	24
1.4.2 Υποθερμία σε παγόνερο (ice slurry) .....	24
1.4.3 Ηλεκτραναισθησία και υποθερμία σε παγόνερο (ice slurry) .....	24
1.4.4 Υγρός Πάγος (Slurry Ice).....	25
<b>2. Στόχος της μελέτης .....</b>	<b>26</b>
<b>3. Υλικά και μέθοδοι .....</b>	<b>27</b>
3.1 Πειραματική μέθοδος.....	27
3.2 Επιλογή ψαριών.....	27
3.3 Χαρτογράφηση SNPs .....	27
3.3.1 Ανίχνευση μη συνώνυμων SNPs.....	28
3.3.2 Εντοπισμός των μη συνώνυμων SNPs και της αμινοξικής θέσης που επηρεάζουν.....	28
3.4 Προετοιμασία cDNA .....	29

3.4.1 Απομόνωση RNA.....	29
3.4.2 Καθαρισμός δείγματος με DNάση .....	30
3.4.3 Αντίστροφη μεταγραφή προς cDNA.....	30
3.5 Ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου .....	31
3.5.1 Εύρεση βέλτιστης συγκέντρωσης εκκινητών και υπολογισμός απόδοσης.....	31
3.5.2 Ποσοτικοποίηση της γονιδιακής έκφρασης .....	32
3.5.3 Υπολογισμός αρχικού φθορισμού και κανονικοποίηση δεδομένων .....	32
3.6 Μέτρηση ενζυμικής δραστηριότητας .....	33
3.7 Μελέτη συσχέτισης γονοτύπου και δραστηριότητας.....	34
<b>4 Αποτελέσματα.....</b>	<b>35</b>
4.1 Μελέτη έκφρασης των γονιδίων ενδιαφέροντος.....	35
4.2 Εντοπισμός παρανοηματικών SNPs στα γονίδια ενδιαφέροντος .....	38
4.3 Μελέτη ενζυμικής δραστηριότητας .....	38
4.3 Συσχέτιση γονοτύπου συγκεκριμένου SNP με δραστηριότητα.....	39
<b>5 Συζήτηση .....</b>	<b>42</b>
5.1 Μελέτες έκφρασης .....	42
5.2 Παρανοηματικά SNPs .....	43
5.3 Ενζυμική δραστηριότητα.....	44
5.4 Σύγκριση διαφορών στην έκφραση και την δραστηριότητα .....	45
5.5 Ανάλυση συσχέτισης συγκεκριμένου γονοτύπου και δραστηριότητας .....	47
5.6 Συμπεράσματα και μελλοντικές προοπτικές.....	49
<b>6 Βιβλιογραφία</b>	

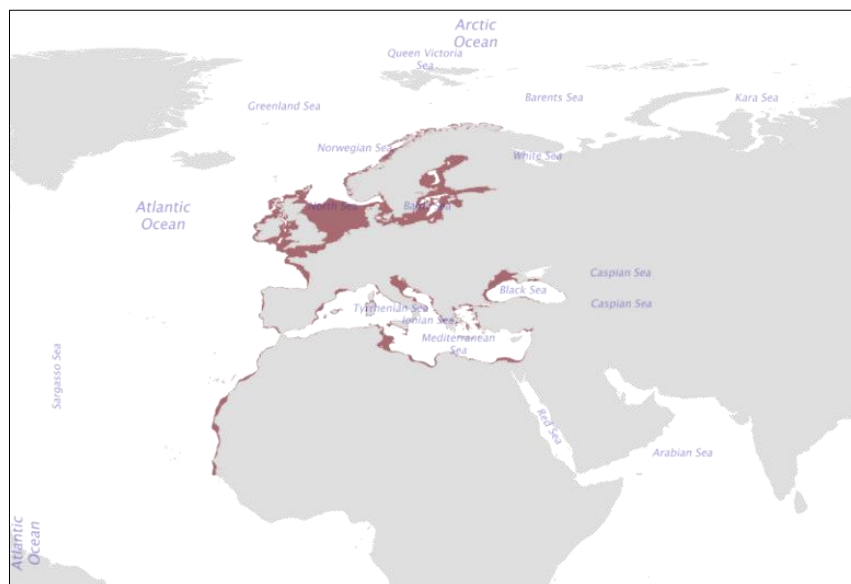


# 1. Βιβλιογραφική ανασκόπηση

## 1.1 Το λαβράκι

### 1.1.1 Γενικά χαρακτηριστικά του λαβρακιού

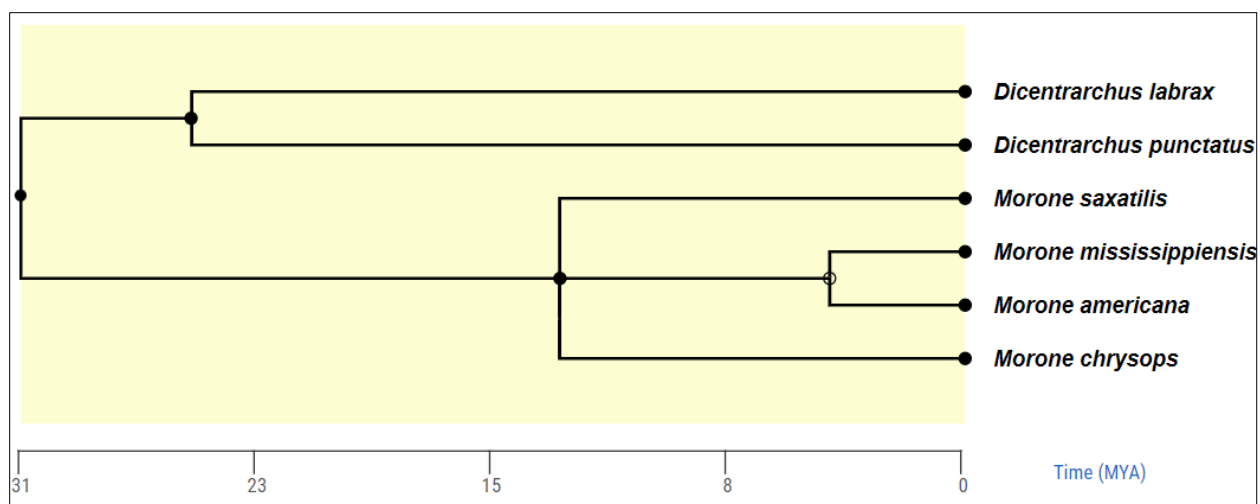
Το λαβράκι (*Dicentrarchus labrax*) είναι ένα ψάρι του θαλασσινού νερού, που συναντάται σε δύο ξεχωριστές γενεαλογίες, η μία εκ των οποίων εντοπίζεται στον βορειοανατολικό Ατλαντικό Ωκεανό (από την Σενεγάλη και τις Κανάριες Νήσους μέχρι την Μεγάλη Βρετανία και την Νορβηγία), και η δεύτερη στα παράλια της Μεσογείου και της Μαύρης Θάλασσας (Εικόνα 1). Οι δύο γενεαλογίες ωστόσο συναντώνται και αναπαράγονται φυσιολογικά στην θάλασσα του Αλμποράν, στο δυτικό άκρο της Μεσογείου, ανάμεσα στην Ιβηρική χερσόνησο και την Αφρική. Εξελικτικά, ανήκει στην κλάση των ακτινοπτερυγίων (*Actinopterygii*), και συγκεκριμένα στην υποκλάση των τελεοστέων (*Teleostei*) και την οικογένεια των Μορονίδων (*Moronidae*) (Kottelat & Freyhof 2007; Tine et al. 2014; FAO 2020). Στον Πίνακα 1 παρουσιάζεται η ταξινόμηση του *D. labrax*, ενώ στην Εικόνα 2 το φυλογενετικό δέντρο των *Moronidae*.



Εικόνα 1: Γεωγραφική κατανομή των πληθυσμών λαβρακιού στις θάλασσες της Ευρώπης (FAO 2020)

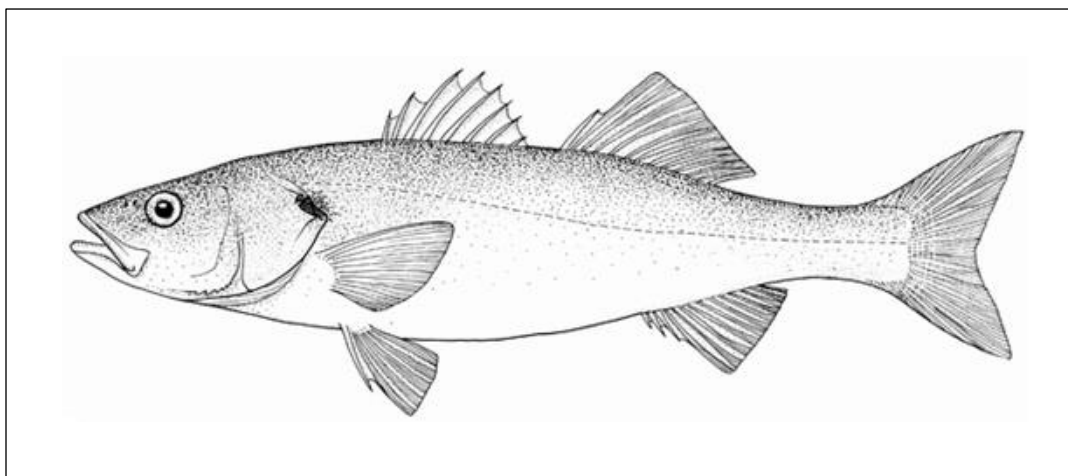
Πίνακας 1: Η ταξινόμηση του *D. labrax*

Βασίλειο	Φύλο	Υπερκλάση	Κλάση	Τάξη	Οικογένεια	Γένος	Είδος
<i>Animalia</i>	<i>Chordata</i>	<i>Actinopterygii</i>	<i>Teleostei</i>	<i>Perciformes</i>	<i>Moronidae</i>	<i>Dicentrarchus</i>	<i>D. labrax</i>



Εικόνα 2: Το φυλογενετικό δέντρο των Moronidae (timetree.org)

Το ενήλικο λαβράκι (Εικόνα 3), όταν είναι ελεύθερο, έχει συνήθως μήκος περίπου 50 εκατοστά, αν και μπορεί να φτάσει μέχρι και το ένα μέτρο. Έχει επίμηκες σχήμα, με δύο ραχιαία πτερύγια, και με ελαφρώς διχαλωτό ουραίο πτερύγιο. Το χρώμα του σώματος του είναι ασημί, και διαθέτει κάποιες μπλε αποχρώσεις στην ραχιαία πλευρά, και κάποια κίτρινα στοιχεία στην κοιλιακή. Συχνά παρατηρούνται στα νεαρά άτομα κηλίδες, οι οποίες όμως μέχρι την ενηλικίωση έχουν εξαφανιστεί (FAO 2020).



Εικόνα 3: Το λαβράκι (FAO 2020)

Το λαβράκι είναι είδος ευρύθερμο και ευρύαλο. Μπορεί, δηλαδή, να επιβιώσει σε ένα μεγάλο εύρος θερμοκρασιών και συγκεντρώσεων άλατος. Όσον αφορά την θερμοκρασία, ενώ ιδανικά προτιμά θερμοκρασίες άνω των 9 βαθμών Κελσίου, μπορεί να επιβιώσει σε ύδατα με θερμοκρασίες 2-32 βαθμών Κελσίου. Παράλληλα, αναφορικά με την αλατότητα των υδάτων, μπορεί να επιβιώσει τόσο στην ανοιχτή θάλασσα, όσο και σε ποταμούς και υφάλμυρα ύδατα, όπως εκβολές ποταμών και λιμνοθάλασσες, καθώς εμφανίζει ανθεκτικότητα σε αλατότητες από 0 έως 40 ppt (Vandeputte et al. 2019). Ζει κοντά στον πυθμένα της θάλασσας, και προτιμά τα πιο ρηχά νερά, αν και μπορεί να φτάσει μέχρι και στα 100 μέτρα βάθος (FAO 2020). Το πιο σύνηθες σημείο στο οποίο εντοπίζεται είναι σε παράκτια ύδατα, όπου και λαμβάνει χώρα η αναπαραγωγή του (Tine et al. 2014).

Τα θηλυκά λαβράκια φτάνουν σε αναπαραγωγική ωριμότητα στα 3-4 έτη, ενώ για τα αρσενικά η ελάχιστη ηλικία είναι τα 2-3 έτη. Κατά την αναπαραγωγική διαδικασία, τα θηλυκά λαβράκια απελευθερώνουν τα αυγά τους, τα οποία γονιμοποιούνται εξωτερικά από τα αρσενικά. Η εκκόλαψη των αυγών διαρκεί από 3 έως 5 ημέρες, και ύστερα από αυτήν, απελευθερώνονται από αυτά οι προνύμφες. Για τα άγρια λαβράκια, η διαδικασία της αναπαραγωγής λαμβάνει χώρα κατά την διάρκεια του χειμώνα και της αρχής της άνοιξης (Δεκέμβριος - Μάρτιος) για την μεσογειακή γενεαλογία, και κατά την διάρκεια της άνοιξης και της αρχής του καλοκαιριού για την γενεαλογία του Ατλαντικού Ωκεανού (González & Piferrer 2003, Vandeputte et al. 2019). Αντίθετα με την αναπαραγωγή των ελεύθερων λαβρακιών, τα λαβράκια εκτροφής μπορούν, εν δυνάμει, να οδηγηθούν στην αναπαραγωγή καθ' όλη τη διάρκεια του έτους, μέσω τροποποίησης της φωτοπερίοδου τους και της θερμοκρασίας στην οποία εκτίθενται (Devauchelle & Coves 1988). Στην υδατοκαλλιέργεια, τα αρσενικά λαβράκια αποτελούν το 70-90% των συνολικών ατόμων (Zanuy et al. 2001). Τα λαβράκια, κατά τα πρώιμα στάδια της ανάπτυξης τους, τρέφονται με πλαγκτόν, λόγω του μικρού τους μεγέθους, αλλά καθώς μεγαλώνουν αρχίζουν να κυνηγούν για την τροφή τους, η οποία πλέον αποτελείται από ασπόνδυλα όπως καρκινοειδή, μαλάκια και γαρίδες, αλλά και από άλλα, μικρότερα ψάρια (FAO 2020). Στην υδατοκαλλιέργεια, οι τροφές των ψαριών αποτελούνται σε μεγάλο βαθμό από ιχθυάλευρο και ιχθυέλαιο, ενώ παράλληλα γίνονται προσπάθειες για αντικατάσταση αυτών με τροφές πλούσιες σε φυτικές πρώτες ύλες (Vandeputte et al. 2019).

Το λαβράκι είναι ψάρι ιδιαίτερα μεγάλης εμπορικής σημασίας στην Ευρώπη. Συγκαταλέγεται στα πλέον δημοφιλή ψάρια, και είναι το τέταρτο σε παραγωγή στην υδατοκαλλιέργεια ψάρι. Η καλλιέργεια του ξεκίνησε το 1990, και ήταν το πρώτο μη σολωμοειδές που εντάχθηκε στις ευρωπαϊκές υδατοκαλλιέργειες. Εκτρέφεται κυρίως στην Τουρκία, την Ελλάδα, την Αίγυπτο και την Ισπανία (Tine et al. 2014, Vandeputte et al. 2019, EUMOFA 2019). Ταυτόχρονα, η σημασία του λαβρακιού είναι πολύ

μεγάλη και για την ελληνική υδατοκαλλιέργεια, καθώς αποτελεί το 44% των πωλήσεων της (52000 τόνοι το 2020), πίσω μόνο από την τσιπούρα (*Sparus aurata*) η οποία αποτελεί το 52% (ΕΛΟΠΥ 2021).

### 1.1.2 Το γονιδίωμα του λαβρακιού

Το βασικότερο βήμα το οποίο έπρεπε να επιτευχθεί για την πραγματοποίηση λειτουργικών και γονιδιωματικών μελετών στο λαβράκι έγινε το 2014, με την πρώτη αλληλούχηση και τον σχολιασμό του γονιδιώματος του (Tine et al. 2014), με μία νέα έκδοση του γονιδιώματος να δημοσιεύεται το 2021 (NCBI\_Assembly\_2021). Η αρχική αλληλούχηση είχε coverage 30x, και αποτελούταν από 37,781 contigs, τα οποία εκτείνονταν σε ένα μήκος 676 δισεκατομμυρίων ζευγών βάσεων, ενώ το γονιδίωμα χωριζόταν σε 25 scaffolds. Τα γονίδια για τα οποία είχε γίνει annotation ήταν 26.719, και το περιεχόμενο του γονιδιώματος σε GC είχε υπολογιστεί στο 40,4%, ποσοστό αρκετά κοντινό με τα αντίστοιχα ποσοστά που παρατηρούνται στα γονιδιώματα άλλων τελεοστέων (Tine et al. 2014, NCBI\_Assembly\_2014). Το χαμηλό αυτό ποσοστό GC, το οποίο και παρουσιάζει ομοιομορφία σε όλο το γονιδίωμα του *D. labrax*, διευκολύνει τις ποσοτικές μελέτες έκφρασης στο λαβράκι. Γονιδιώματα με πιο μεγάλες περιεκτικότητες σε GC καθιστούν δυσκολότερο τον σχεδιασμό κατάλληλων εκκινητών, οι οποίοι να είναι αρκετά μεγάλου μήκους (ώστε να προσδίδεται η απαραίτητη εξειδίκευση), αλλά και να διαθέτουν θερμοκρασία τήξης συμβατή με την ιδανική για την DNA πολυμεράση θερμοκρασία.

Η έκδοση του 2021 διαθέτει coverage 80x, συντέθηκε από 574 contigs, και περιέχει 696 δισεκατομμύρια ζεύγη βάσεων, τα οποία χωρίζονται σε 302 scaffolds, με το περιεχόμενο σε GC να υπολογίζεται στο 40% (NCBI\_Assembly\_2021).

Το γονιδίωμα του λαβρακιού έχει υποστεί τρεις γύρους γονιδιωματικού διπλασιασμού (Whole Genome Duplication - WGD). Οι δύο πρώτοι εξ αυτών είναι οι δύο κοινοί για όλα τα σπονδυλωτά, ενώ ο τρίτος είναι ο TS-WGD (Teleost-Specific Whole Genome Duplication), που διαχωρίζει τους τελεόστεους από τους υπόλοιπους ακτινοπτερυγίους (Ohno et al. 1967, Tine et al. 2014).

## 1.2 Η αλλοίωση του φιλέτου και ο ρόλος των πρωτεασών

Η δημοφιλία και η εμπορικότητα του λαβρακιού καθιστούν την διατήρηση της καλής ποιότητας του φιλέτου του πολύ σημαντική. Η υφή του φιλέτου, ένας από τους σημαντικότερους παράγοντες που

επηρεάζουν την ποιότητα του ψαριού, αλλοιώνεται σημαντικά μετά την θανάτωση. Η αποικοδόμηση αυτή ξεκινάει από υδρολυτικές βιοχημικές αντιδράσεις, οι οποίες, πέρα από τις αλλοιώσεις που προκαλούν οι ίδιες, στην συνέχεια προσφέρουν και τα απαραίτητα θρεπτικά στοιχεία για την ανάπτυξη μικροοργανισμών που συνεχίζουν την αλλοίωση του μυός (Verrez-Bagnis et al. 2002). Σε αυτήν την διαδικασία, μεγάλο ρόλο διαδραματίζουν πρωτεάσες, οι οποίες καταστρέφουν τόσο τις πρωτεΐνες του μυϊκού ινιδίου (καλπαΐνες, καθεψίνες), όσο και το κολλαγόνο του συνδετικού ιστού (MMP κολλαγενάσες και ζελατινάσες) (Pornrat et al. 2007, Sriket et al. 2010, Sriket 2014, Ahmed 2015, Shen et al. 2022). Αυτές οι πρωτεάσες μπορεί να προέρχονται από τον μυϊκό ιστό, αλλά και από το πεπτικό σύστημα, εάν αυτό δεν αφαιρεθεί μετά την θανάτωση του ψαριού (Sriket 2014).

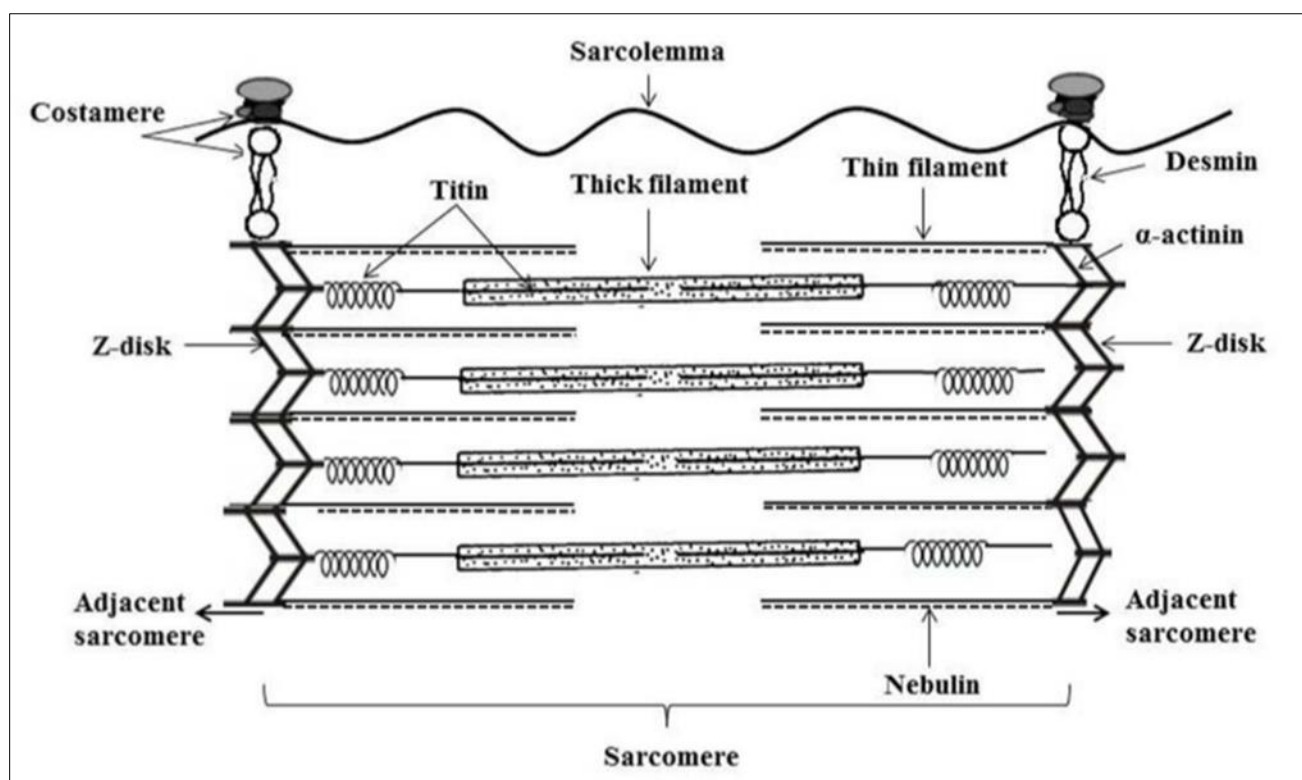
### 1.2.1 Οι πρωτεΐνες του μυός του ψαριού

Οι πρωτεΐνες του σκελετικού μυός μπορούν να χωριστούν σε τρεις κατηγορίες αναφορικά με την κυτταρική τους τοποθέτηση/κατανομή. Οι σαρκοπλασματικές πρωτεΐνες (30-35%), είναι οι ενδοκυτταρικές πρωτεΐνες, οι οποίες είναι υπεύθυνες για την σωστή λειτουργία του κυττάρου (π.χ. κατάλυση μεταβολικών μονοπατιών). Οι πρωτεΐνες του μυϊκού ινιδίου (55-60%) είναι αυτές οι οποίες αποτελούν το μυϊκό ινίδιο, δηλαδή την δομή η οποία επιτρέπει στον σκελετικό μυ να συστέλλεται. Βρίσκονται και αυτές εξ ολοκλήρου ενδοκυτταρικά. Τέλος, υπάρχουν και οι πρωτεΐνες του στρώματος, όπως το κολλαγόνο και οι πρωτεΐνες της εξωκυττάριας ουσίας (10-15%). Η ομάδα, λοιπόν, στην οποία περιλαμβάνεται το μεγαλύτερο ποσοστό των πρωτεϊνών του μυός κατά βάρος, αλλά και οι υπεύθυνες για την κινητική λειτουργία του μυός πρωτεΐνες, είναι η ομάδα των πρωτεϊνών του μυϊκού ινιδίου. Οι πρωτεΐνες του μυϊκού ινιδίου είναι επίσης και αυτές με την μεγαλύτερη σημασία για την κατανάλωση του μυός ως τρόφιμο (Goll et al. 2018).

Η δομή του μυός των ψαριών διαφέρει εμφανώς σε σχέση με την δομή των μυών των θηλαστικών. Χαρακτηριστικό είναι το γεγονός ότι στα ψάρια απουσιάζει το τενόντιο σύστημα, το οποίο στα θηλαστικά, στα οποία και εντοπίζεται, έχει τον ρόλο της σύνδεσης των μυών με τα οστά. Στην περίπτωση των ψαριών, τα μυϊκά κύτταρα σχηματίζουν μυοτόμια, τα οποία διαχωρίζονται μεταξύ τους από τα μυοκόμματα (λεπτές μεμβράνες συνδετικού ιστού). Τα μυοκόμματα είναι αυτά που συνδέονται με τον

σκελετό του ψαριού, καθώς και με το δέρμα του, διαδραματίζοντας τον σταθεροποιητικό ρόλο των τενόντων (Venugopal & Shahidi 1996, Delbarre-Ladrat et al. 2006).

Όπως αναφέρθηκε, οι μύες του ψαριού χωρίζονται σε μυοτόμια. Με την σειρά τους, τα μυοτόμια απαρτίζονται από μυϊκές ίνες, και οι μυϊκές ίνες από 1000-2000 δεσμίδες μυϊκών ινιδίων (Venugopal & Shahidi 1996). Το κάθε μυϊκό ινίδιο χωρίζεται σε σαρκομερίδια (Εικόνα 4), καθένα εκ των οποίων πλαισιώνεται από δύο δίσκους Z, και αποτελεί την λειτουργική μονάδα του μυϊκού ινιδίου. Τα σαρκομερίδια αποτελούνται από ινίδια ακτίνης και μυοσίνης, επιφορτισμένα με την συστολή του μυός, και από μεγάλο αριθμό άλλων πρωτεϊνών, οι οποίες διαδραματίζουν ρυθμιστικούς και βοηθητικούς ρόλους, οι οποίοι αναλύονται παρακάτω.



Εικόνα 4: Δομή σαρκομερούς (Ahmed et al. 2015).

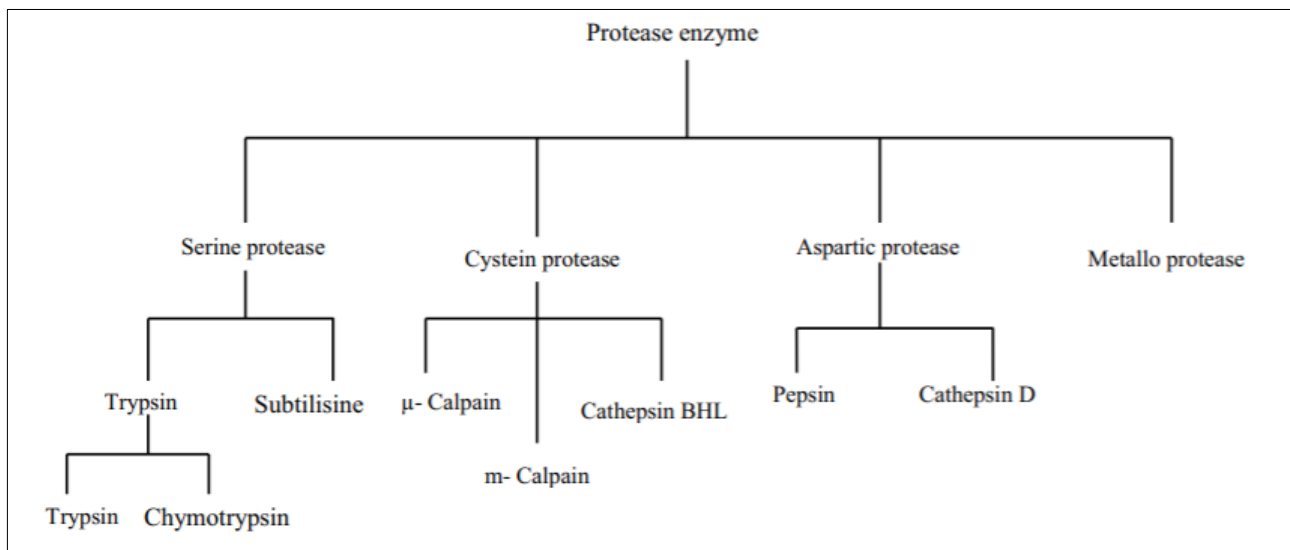
Μία από τις πιο σημαντικές βοηθητικές πρωτεΐνες του σαρκομεριδίου είναι η α-ακτινίνη, η οποία αποκολλάται από το μυϊκό ινίδιο λόγω της δράσης των καλπαϊνών. Η α-ακτινίνη είναι επιφορτισμένη με την πρόσδεση των ινιδίων της ακτίνης μεταξύ τους, αλλά και με τους δίσκους Z των σαρκομεριδίων (Sjoblom et al. 2008). Παράλληλα, η τιτίνη είναι υπεύθυνη για την πρόσδεση της μυοσίνης στους δίσκους

Z, και συνεπώς για την θέση της μυοσίνης σε σχέση με την ακτίνη, και έτσι επιμελείται μαζί με την  $\alpha$ -ακτινίνη την σταθεροποίηση του συμπλόκου ακτίνης-μυοσίνης (Horowitz et al. 1986). Η νεμπουλίνη φροντίζει για την ελαστικότητα και την σταθερότητα της μυοσίνης (Horowitz et al. 1986), και το σύμπλεγμα των τροπονινών C, I και T και της τροπομυοσίνης ρυθμίζει την ικανότητα των μορίων μυοσίνης να προσδένονται και να μετακινούνται κατά μήκος του ινιδίου ακτίνης, κατά την συστολή του μυός (Farah & Reinach 1975, Sherwood 2016). Τέλος, η δεσμίνη προσδίδει σταθερότητα στους δίσκους Z, οι οποίοι οριοθετούν το κάθε σαρκομερίδιο (Paulin & Li 2004).

Μία άλλη ιδιαίτερα σημαντική πρωτεΐνη του μυός, η οποία και πρωτεολύεται από τις μεταλλοπρωτεάσες (MMPs) είναι το κολλαγόνο. Το κολλαγόνο περιέχεται στον συνδετικό ιστό στο επίμυιο, το περίμυιο, το ενδομύιο, αλλά και στον συνδετικό ιστό των μυοκομμάτων (Delbarre-Ladrat et al. 2006), κάτι που το καθιστά πρωτεΐνη μεγάλης σημασίας για την σταθερότητα του μυός των ψαριών.

### 1.2.2 Τα πρωτεολυτικά συστήματα του κυττάρου

Κατά την διάρκεια ζωής ενός κυττάρου, είναι καίριας σημασίας η ικανότητα του να αποδομεί τις πρωτεΐνες του και να ανακυκλώνει και να επαναχρησιμοποιεί τα αμινοξέα τους. Για τον σκοπό αυτόν τα μυϊκά κύτταρα των σκελετικών μυών διαθέτουν αρκετά συστήματα αποδόμησης πρωτεϊνών. Τέτοια συστήματα είναι το πρωτεάσωμα, το σύστημα των κασπασών, το λυσόσωμα, το σύστημα των καλπαϊνών



Εικόνα 5: Η ταξινόμηση των κυριότερων πρωτεασών (Homaei et al. 2016)

(Goll et al. 2008), καθώς και υδρολυτικά ένζυμα του συνδετικού ιστού, όπως οι ελαστάσες και οι κολλαγενάσες. Από αυτά, σημαντικό ρόλο στην *post mortem* πρωτεόλυση του μυός παρουσιάζουν οι κολλαγενάσες, και οι πρωτεάσες των πρωτεϊνών του μυϊκού ινιδίου, οι λυσοσωμικές καθεψίνες και οι καλπαΐνες. Η δράση των πρωτεασών αυτών μετά την θανάτωση του ψαριού έχει ως αποτέλεσμα ο μύς να αποκτά μαλακή υφή, η οποία παρότι αρεστή και ζητούμενη στο κρέας των θηλαστικών, δεν είναι επιθυμητή στο φιλέτο ενός ψαριού (Chéret et al. 2007). Το ευκαρυωτικό κύτταρο διαθέτει έναν μεγάλο αριθμό πρωτεασών. Αυτές μπορούν να κατηγοριοποιηθούν ανάλογα με το σημείο στο οποίο τέμνουν την πρωτεΐνη στόχο (ενδοπεπτιδάσες και εξωπεπτιδάσες), ανάλογα με τον τρόπο δράσης του ενεργού τους κέντρου (πρωτεάσες ασπαρτικού, σερίνης, κυστεΐνης και μεταλλοπρωτεάσες) και ανάλογα με τις ιδανικές τιμές pH για την δράση τους (όξινες και αλκαλικές). Οι εξωπεπτιδάσες μπορούν περαιτέρω να διαχωριστούν σε αμινοπεπτιδάσες και καρβοξυπεπτιδάσες (Singh & Benjakul 2018). Στο σχήμα παραπάνω (Εικόνα 5) φαίνονται κάποιες από τις κυριότερες κατηγορίες πρωτεασών.

### 1.2.3 Καλπαΐνες και *post mortem* αλλοίωση

#### 1.2.3.1 Καλπαΐνες

Οι καλπαΐνες είναι μια οικογένεια κυτταροπλασματικών, εξαρτώμενων από το  $\text{Ca}^{2+}$ , πρωτεασών κυστεΐνης και ανήκουν στην υπεροικογένεια της παπαΐνης. Εντοπίζονται σε όλους σχεδόν τους ευκαρυώτες, και σε κάποια βακτήρια, και είναι ιδιαίτερα συντηρημένες ανάμεσα στα διάφορα είδη. Για την λειτουργία τους είναι απαραίτητη η παρουσία κατιόντων ασβεστίου, σε συγκεντρώσεις της τάξης των mM ή των  $\mu\text{M}$ , για τις καλπαΐνες m και  $\mu$  αντίστοιχα (Pandurangan & Hwang, 2012). Σε μια μελέτη τους που δημοσιεύθηκε το 2000, οι Ladrat et al. (Ladrat et al. 2000), απομόνωσαν και σχολίασαν τρεις διαφορετικές, εκφραζόμενες στον λευκό μυ του λαβρακιού, καλπαΐνες. Οι δύο από αυτές χαρακτηρίστηκαν m καλπαΐνες και η μία  $\mu$  καλπαΐνη, βάση των αναγκών τους σε δισθενή κατιόντα ασβεστίου για την δραστηριότητά τους. Επιπλέον, έχει δειχθεί για το λαβράκι ότι οι καλπαΐνες διαθέτουν διαφοροποιούμενα ανάλογα με την εποχή προφίλ έκφρασης [Delbarre-Ladrat et al. 2004 (2)].

Η πρωτεολυτική δράση των καλπαϊνών διαφέρει σημαντικά από αυτήν των άλλων πρωτεολυτικών στοιχείων του κυττάρου (πρωτεάσωμα, αυτοφαγία, κασπάσες). Κατ' αρχάς, η δράση των καλπαϊνών στα υποστρώματα τους δεν έχει ως αποτέλεσμα την πλήρη αποδόμηση των υποστρωμάτων, αλλά την τομή



τους σε μεγάλα τμήματα, τα οποία αποικοδομούνται περαιτέρω από άλλους μηχανισμούς. Αντίθετα, η δράση των αυτοφαγικών μηχανισμών και του πρωτεασώματος οδηγούν σε πλήρη αποδόμηση της πρωτεΐνης - στόχου. Σημαντική διαφορά αποτελεί και το γεγονός ότι η οικογένεια των καλπαϊνών διαθέτει την δυνατότητα αναγνώρισης των στόχων της, συμμετέχοντας έτσι ενεργά στον εντοπισμό του υποστρώματος, χωρίς να εξαρτάται από άλλα συστήματα αναγνώρισης, όπως αυτό της ουβικουιτινιλίωσης στην περίπτωση του πρωτεασώματος, ή την αναγνώριση μικρών αλληλουχιών καταλοίπων από τις κασπάσες (Ono & Sorimachi 2012).

Οι καλπαΐνες μελετώνται ως δύο διαφορετικές ομάδες. Οι κλασικές καλπαΐνες ( $\mu$  και  $m$ ) είναι όσες, πέρα από την καταλυτική υπομονάδα CysPc, η οποία είναι κοινή για όλες τις καλπαΐνες, διαθέτουν ακόμη μία υπομονάδα C2 για την πρόσδεση ασβεστίου, και πέντε EF-hands, επίσης για την πρόσδεση των δισθενών κατιόντων ασβεστίου.

Η δράση κάποιων, αλλά όχι όλων των καλπαϊνών, ρυθμίζεται είτε θετικά είτε αρνητικά από δύο μόρια: την CAPNS1 [30KDa] και την καλπαστατίνη. Η CAPNS1 φαίνεται να λειτουργεί σαν μοριακός συνοδός που βοηθάει στην σωστή αναδίπλωση καταλυτικών υπομονάδων κάποιων κλασικών καλπαϊνών. Η καλπαστατίνη από την άλλη αποτελεί τον μοναδικό εξειδικευμένο ενδογενή αναστολέα των κλασικών καλπαϊνών που έχει βρεθεί. Κάθε μόριο καλπαστατίνης διαθέτει τέσσερις κατασταλτικές υπομονάδες, των οποίων η δομική πλαστικότητα τις βοηθά να προσδένονται ισχυρά στα μόρια των καλπαϊνών, και να καταστέλλουν την δράση τους, με διαφοροποιούμενη αποτελεσματικότητα η κάθε μία. Η αλληλουχία της καλπαστατίνης εμφανίζει χαμηλή συντήρηση ανά τα είδη, ενώ το ένζυμο πρωτεολύεται και καταστέλλεται αποτελεσματικά από την καλπαΐνη 3 (CAPN3), μια καλπαΐνη η οποία εμφανίζει χαμηλή εξάρτηση από το ασβέστιο για την δραστηριότητα της (Ono & Sorimachi 2012, Pandurangan & Hwang, 2012).

#### *1.2.3.2 Δράση των καλπαϊνών και post mortem πρωτεόλυση*

Ο καταβολισμός των πρωτεϊνών του μυϊκού ινιδίου πραγματοποιείται κατά 80-90% από το πρωτεάσωμα. Απαραίτητο βήμα πριν από τον πλήρη καταβολισμό των πρωτεϊνών είναι η αφαίρεση τους από το ινίδιο, με το ινίδιο να παραμένει ωστόσο ακέραιο και λειτουργικό. Αυτή, όμως, είναι μία διεργασία την οποία δεν μπορεί να καταλύσει το ίδιο το πρωτεάσωμα, καθώς αυτό στηρίζεται στην εισχώρηση αποδιαταγμένων πεπτιδικών αλυσίδων στον καταλυτικό του πυρήνα, για να προχωρήσει

στην πρωτεόλυση τους. Σε αυτό το σημείο φαίνεται να βοηθούν οι καλπαΐνες, οι οποίες καταλύουν την αποικοδόμηση των πρωτεϊνών που σταθεροποιούν την δομή του μυϊκού ινιδίου, απομακρύνοντας το έτσι από την μυϊκή ίνα (Goll et al. 2008). Συγκεκριμένα, οι καλπαΐνες έχει δειχθεί ότι συμμετέχουν στην απομάκρυνση της α-ακτινίνης {και συγκεκριμένα στο λαβράκι, η m-καλπαΐνη [Delbarre-Ladrat et al. 2004 (1)]}, μέσω της πρωτεόλυσης της τιτίνης και της νεμπουλίνης (Goll et al. 2003, Delbarre-Ladrat et al. 2006), αλλά και της μυοσίνης μέσω πρωτεόλυσης της τροπομυοσίνης και της τροπονίνης (Verrez-Bagnis et al. 2002).

Η *post mortem* δραστικότητα των καλπαϊνών προκύπτει λόγω των αλλαγών τις οποίες υφίστανται τα κύτταρα του λευκού μυός, όπως η απώλεια σταθερότητας των κυτταρικών μεμβρανών, η οποία οδηγεί στην εισχώρηση κατιόντων ασβεστίου στο κυτταρόπλασμα. Σε μελέτες που αφορούν θηλασικά μάλιστα, η m-καλπαΐνη έχει φανεί ότι χάνει λίγη ή και καθόλου από την δραστικότητα της κατά την αποθήκευση μετά την θανάτωση, σε αντίθεση με την μ-καλπαΐνη, της οποίας η δραστικότητα μειώνεται σταδιακά [Delbarre-Ladrat et al. 2004 (1)]. Η ίδια μελέτη παρέχει επίσης δεδομένα που υποστηρίζουν ότι η μ καλπαΐνη δεν εμφανίζεται στον λευκό μυ του λαβρακιού κατά την *post mortem* αποθήκευση.

#### 1.2.4 Μεταλλοπρωτεάσες και *post mortem* αλλοίωση

##### 1.2.4.1 Μεταλλοπρωτεάσες

Οι MMPs (Matrix MetalloProteinases – μεταλλοπρωτεϊνάσες του εξωκυττάριου χώρου) είναι μια μεγάλη οικογένεια ενδοπεπτιδασών, οι οποίες εξαρτώνται από το ασβέστιο, και περιέχουν ένα καταλυτικό άτομο ψευδαργύρου (Zn) (Sriket 2014). Υπάγονται στην υπεροικογένεια των metzincins, και περιλαμβάνουν τόσο ένζυμα τα οποία εντοπίζονται σε διαλυτή μορφή, όσο και ένζυμα που βρίσκονται προσδεμένα στην κυτταρική μεμβράνη.

Η έκκριση των MMPs έχει παρατηρηθεί από πολλά προφλεγμονώδη κύτταρα και κύτταρα του συνδετικού ιστού, όπως ινοβλάστες, οστεοβλάστες, ενδοθηλιακά κύτταρα, μακροφάγα, ουδετερόφιλα και λεμφοκύτταρα (Verma & Hansch, 2007).

Οι MMPs έχουν ως βασικά δομικά τους στοιχεία την καταλυτική τους επικράτεια και ένα προπεπτίδιο. Συχνά περιέχεται και μια επικράτεια παρόμοια με την αιμοπηξίνη (hemorexin-like), και

κάποιες φορές μια επικράτεια παρόμοια με την φιβρονεκτίνη (fibronectin-like), ενώ σε αρκετές MMPs υπάρχει και μια επικράτεια παρόμοια με επικράτεια πρόσδεσης πεπτιδογλυκάνης ή πρωτεογλυκάνης (peptidoglycan ή proteoglycan binding-like domain – PGBD-like) (Y. Jiang et al. 2010; Dolmatov et al. 2021). Το προπεπτίδιο έχει ρυθμιστικό ρόλο, καθώς η ενεργοποίηση της πρωτεάσης γίνεται μόνο μετά την αποκοπή του. Αυτή μπορεί να πραγματοποιείται από την πλασμίνη, από άλλες MMPs, ή και μέσω αυτόλυσης. Στην ρύθμιση της δραστηριότητας των MMPs σημαντικό ρόλο διαθέτουν και οι αναστολείς τους, όπως οι TIMPs 1 έως 4 (tissue inhibitors of MMPs), και η α2 μακροσφαιρίνη, ένας αναστολέας πρωτεϊνών του ορού (Lee & Murphy, 2004).

Στα σπονδυλωτά έχουν εντοπιστεί 28 πρωτεάσες-μέλη της οικογένειας των MMPs, με τις 23 από αυτές να εκφράζονται στον άνθρωπο (Cui et al. 2017; Cabral-Pacheco et al. 2020). Ομόλογα τους έχουν βρεθεί σε πολλά είδη ζώων, αλλά και σε φυτά και άλγες (Lee & Murphy, 2004).

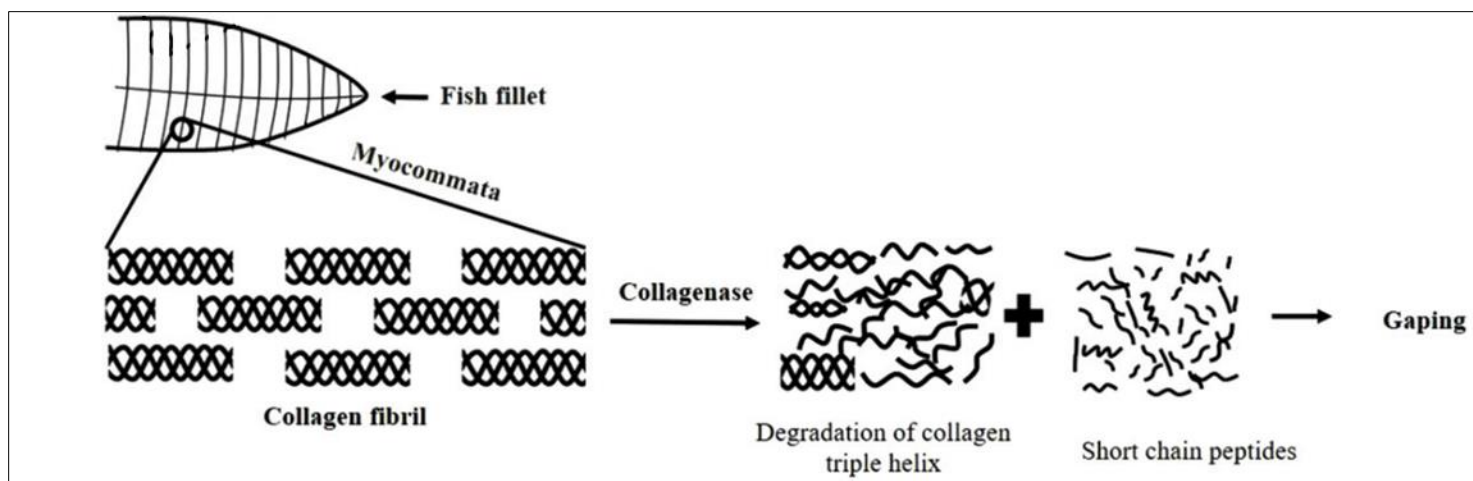
Η οικογένεια των MMPs συνολικά διαθέτει την ικανότητα πρωτεόλυσης όλων των διακριτών στοιχείων του εξωκυττάριου χώρου, τροποποιώντας έτσι τη δομή του ιστού, ώστε να διευκολύνει την αναδιαμόρφωση του και την μετανάστευση των κυττάρων (Lee & Murphy, 2004; Verma & Hansch, 2007). Συγκεκριμένα, έχει παρατηρηθεί, μεταξύ άλλων, η πρωτεόλυση κολλαγόνων, ελαστίνων, ζελατίνης, φιβρονεκτίνης, λαμινίνης, γλυκοπρωτεϊνών και πρωτεογλυκανών. Βάση του στόχου τους, οι MMPs κατηγοριοποιούνται σε κολλαγενάσες (MMPs 1, 8 και 13, οι οποίες πρωτεολύουν ίνες κολλαγόνου τύπου I, II και III), ζελατινάσες (MMPs 2 και 9, υπεύθυνες για την πρωτεόλυση ζελατίνης αλλά και κολλαγόνου), στρομελυσίνες (MMPs 3 και 10, με ποικίλους στόχους, όπως κολλαγόνο II, IV και IX, πρωτεογλυκάνες, ελαστίνη, λαμινίνη, φιβρονεκτίνη, αλλά και τα προένζυμα των MMPs) και ματριλυσίνες (MMPs 7, 11 και 26, οι οποίες πρωτεολύουν πρωτεογλυκάνες, φιβρονεκτίνη, ζελατίνες I, II, IV και V, κολλαγόνο IV, φιβρονεκτίνη και ινωδογόνο) (Pedersen et al. 2015, Cui et al. 2017). Σημαντικό είναι να αναφερθεί πως, όσον αφορά το κολλαγόνο, στους μύες των τελεοστέων εμφανίζεται κυρίως κολλαγόνο τύπου I και τύπου V. Έχει παρατηρηθεί ακόμη η πρωτεόλυση μορίων προσκόλλησης, αυξητικών παραγόντων, κυτοκινών, χημειοκινών και υποδοχέων (Lee & Murphy, 2004).

#### 1.2.4.2 Δράση των MMPs και *post mortem* πρωτεόλυση

Ο συνδετικός ιστός που περιβάλλει την κάθε μυϊκή ίνα αποκαλείται ενδομύιο, και αποτελείται κυρίως από κολλαγόνο, το οποίο είναι και το 0.2-1.4% των συνολικών πρωτεϊνών του μυός. Διαθέτει πολύ σημαντικό ρόλο στην εύρυθμη λειτουργία της μυϊκής ίνας, παρέχοντας μηχανική υποστήριξη και

σταθερότητα στα μυοκόμματα (Pedersen et al. 2015). Πλήθος μελετών έχουν δείξει ότι η *post mortem* αποικοδόμηση των πρωτεϊνών του εξωκυττάριου χώρου ευθύνεται και αυτή, μαζί με την αποδόμηση του μυϊκού ινιδίου, για την μαλακή υφή του μύος των ψαριών (Delbarre-Ladrat et al. 2006), καθώς η καταστροφή των πρωτεϊνών της τριπλής έλικας του κολλαγόνου τύπου I και V έχει ως αποτέλεσμα της τον διαχωρισμό των μυϊκών ινών (Sriket 2014). Η δραστικότητα των MMPs να πρωτεολύουν τα συστατικά του εξωκυττάριου χώρου, και κυρίως το κολλαγόνο I και V του συνδετικού ιστού, έχει παρατηρηθεί και κατά την *post mortem* αποθήκευση των εξαλιευμένων ψαριών. Οι πιο συχνά ευρισκόμενες MMPs είναι κυρίως οι ζελατινάσες, με δραστικότητα και έναντι του κολλαγόνου, MMP2 και MMP9 (Pedersen et al. 2015).

Οι MMPs-κολλαγενάσες έχουν συνδεθεί, και φαίνονται να είναι η κύρια αιτία (Sriket 2014) για το φαινόμενο του gaping, κατά το οποίο οι μυϊκές ίνες αποσυνδέονται από τα μυοκόμματα στην διάρκεια της αποθήκευσης του ψαριού, λόγω της αποδόμησης του κολλαγόνου του συνδετικού ιστού (Delbarre-Ladrat et al. 2006). Στην Εικόνα 6 φαίνεται η διαδικασία που οδηγεί στο gaping. Περαιτέρω, οι MMPs έχουν την ικανότητα διάσπασης, πέραν του κολλαγόνου, και των κυτταροσκελετικών πρωτεϊνών που συνδέουν και σταθεροποιούν το σαρκόλημμα (δηλαδή την κυτταρική μεμβράνη του μυϊκού κυττάρου) με τον συνδετικό ιστό (Delbarre-Ladrat et al. 2006).



Εικόνα 6: Η αποικοδόμηση της τριπλής έλικας του κολλαγόνου, η οποία οδηγεί στο φαινόμενο του gaping (τροποποιημένη από Singh & Benjakul 2018).

## 1.3 Επίδραση των SNPs στην έκφραση και την δραστικότητα

### 1.3.1 Κατηγοριοποίηση SNPs

Τα SNPs (single nucleotide polymorphism - πολυμορφισμοί μονού νουκλεοτιδίου) είναι η απλούστερη και η πιο συχνά απαντώμενη μορφή μετάλλαξης, καθώς στον άνθρωπο εντοπίζεται ένα SNP ανά περίπου 1000 ζεύγη βάσεων του γονιδιώματος (Shastry 2009). Ορίζονται ως οι μεταλλάξεις μιας μόνο βάσης, οι οποίες εντοπίζονται τουλάχιστον στο 1% του πληθυσμού (Hunt et al. 2009). Ένα SNP μπορεί να έχει πολλών ειδών διαφορετικές επιδράσεις στην έκφραση του γονιδίου στο οποίο εντοπίζεται, αλλά και στην λειτουργικότητα της πρωτεΐνης η οποία παράγεται από αυτό.

Όσον αφορά την μεταγραφή του γονιδίου, ένα SNP μπορεί να εντοπίζεται στον υποκινητή ή σε κάποια άλλη ρυθμιστική της έκφρασης του γονιδίου περιοχή (ενισχυτές), και να τροποποιεί την ικανότητα σύνδεσης μεταγραφικών παραγόντων, αλλάζοντας έτσι και το προφίλ έκφρασης του γονιδίου, ενισχύοντας, καταστέλλοντας ή αλλάζοντας τις συνθήκες υπό τις οποίες πραγματοποιείται η έκφραση του, ενώ παράλληλα μπορεί να επηρεάζει την σταθερότητα του παραγομένου mRNA, την αποτελεσματικότητα της μεταγραφής και της μετάφρασης, και τον υποκυτταρικό εντοπισμό του mRNA (Hunt et al. 2009, Shastry 2009). Επιπλέον, μπορεί να βρίσκεται σε σημείο ματίσματος, στο οποίο να εμποδίζει την διαδικασία, έχοντας ως αποτέλεσμα την ανικανότητα του κυττάρου να παραγάγει κάποια ή και όλα τα ώριμα mRNAs, και κατ' επέκταση κάποια ή και όλα τα ισόμορφα πολυπεπτίδια του γονιδίου (Hunt et al. 2009; Kim et al. 2012; Robert & Pelletier 2018).

Οι παραπάνω περιπτώσεις αφορούν αποκλειστικά την αλληλουχία του DNA και του RNA. Για να επηρεάζουν την πεπτιδική αλληλουχία, τα SNPs πρέπει να βρίσκονται στην κωδική περιοχή, και οι κατηγορίες στις οποίες ταξινομούνται είναι οι ακόλουθες.

Τα παρανοηματικά (missense) SNPs είναι μεταλλάξεις οι οποίες έχουν ως αποτέλεσμα τους την αλλαγή του αμινοξέος το οποίο παράγεται από ένα κωδικόνιο. Η επίδραση στην παραγόμενη πρωτεΐνη εξαρτάται από την θέση και τον ρόλο του αμινοξέος, καθώς αυτό μπορεί να εμπλέκεται σε ρυθμιστική περιοχή (σταθεροποίηση πρωτεΐνης, αναδίπλωση στον χώρο, ενεργοποίηση, πρόσδεση υποστρώματος, υποκυτταρική τοποθέτηση), ή στο καταλυτικό κέντρο ή την λειτουργική περιοχή της πρωτεΐνης, εμποδίζοντας σε κάθε περίπτωση την σωστή λειτουργία της (Shastry 2009; Robert & Pelletier 2018; Emadi et al. 2020).

Ως ανοηματικά (nonsense) SNPs ορίζονται τα SNPs τα οποία με την παρουσία τους δημιουργούν ένα πρόωρο κωδικόνιο λήξης της μετάφρασης. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα μια μικρότερου μήκους πρωτεΐνη, η οποία, ανάλογα με την θέση στην οποία δημιουργήθηκε το κωδικόνιο λήξης, ενδέχεται να μην είναι λειτουργική, λόγω απώλειας ρυθμιστικών ή καταλυτικών περιοχών της, ή και να αποικοδομηθεί πλήρως (Robert & Pelletier 2018). Αντίθετα, τα μη τερματικά (nonstop) SNPs είναι υπεύθυνα για την απαλοιφή του υπάρχοντος κωδικονίου λήξης, και ως εκ τούτου, την μετάφραση τμήματος ή όλης της 3' UTR. Έτσι, προκαλούν την παραγωγή μεγαλύτερων πολυπεπτιδικών αλυσίδων, που ενδεχομένως να έχουν προβλήματα στην συναρμολόγηση ή την αναδίπλωση και να μην μπορούν ως αποτέλεσμα αυτού να είναι λειτουργικές (Hamby et al. 2011).

Τέλος, τα συντηρητικά (conservative) και τα σιωπηλά (silent) SNPs είναι δύο παρόμοιες κατηγορίες SNPs. Τα συντηρητικά έχουν ως αποτέλεσμα την αντικατάσταση του κωδικονίου με ένα άλλο, το οποίο όμως οδηγεί στην προσθήκη αμινοξέος ίδιων βιοχημικών ιδιοτήτων, το οποίο μπορεί πιθανώς να λειτουργήσει χωρίς να δημιουργήσει πρόβλημα στην πολυπεπτιδική αλυσίδα (Zhang 2000), μπορεί ωστόσο να προκαλέσει αλλαγή του ρυθμού μετάφρασης ή της σταθερότητας του mRNA (Robert & Pelletier 2018). Τα σιωπηλά SNPs, από την άλλη, δεν φαίνονταν να δημιουργούν πρόβλημα στο επίπεδο της πρωτεΐνης, καθώς οδηγούν στην προσθήκη του ίδιου αμινοξέος παρά την αλλαγή του νουκλεοτιδίου, λόγω του εκφυλισμού του γενετικού κώδικα (Shastry 2009). Έχει παρατηρηθεί ωστόσο, ότι τέτοια σιωπηλά SNPs μπορεί να οδηγήσουν σε προβλήματα στο μάτισμα, την σταθερότητα και τη δομή του mRNA, αλλά ακόμα και στην αναδίπλωση της ίδιας της πρωτεΐνης (Hunt et al. 2009).

### 1.3.2 SNPs και έρευνα

Όπως αναλύθηκε, τα SNPs έχουν την ικανότητα, ανάλογα με την θέση τους, να τροποποιήσουν την έκφραση ενός γονιδίου και την λειτουργικότητα της παραγόμενης πρωτεΐνης σε κάθε επίπεδο. Όσον αφορά το ανθρώπινο γονιδίωμα, η φαινοτυπική ποικιλομορφία πηγάζει από το 0,5% της αλληλουχίας, με τις διαφορές να προκύπτουν λόγω ποικιλομορφίας αριθμού αντιγράφων (Copy Number Variation - CNVs), πολυμορφισμών προσθήκης ή διαγραφής και SNPs. Τα SNPs, συγκεκριμένα, είναι η πιο συχνή αιτία γενετικής ποικιλομορφίας, με πάνω από 10 εκατομμύρια SNPs στο ανθρώπινο γονιδίωμα (Robert & Pelletier, 2018). Φαίνεται ακόμη, ότι αυτά είναι το αίτιο πολλών χαρακτηριστικών και ασθενειών, και ως εκ τούτου αποτελεί στόχο της επιστημονικής κοινότητας το να ταυτοποιηθούν SNPs τα οποία συσχετίζονται με συγκεκριμένα χαρακτηριστικά και παθογένειες (Emadi et al. 2020). Για να συμβεί αυτό,

απαραίτητη προϋπόθεση είναι η ικανότητα μας να εντοπίζουμε την επίδραση ενός SNP στην γονιδιακή έκφραση, την μετάφραση και την πρωτεϊνική λειτουργικότητα (Robert & Pelletier, 2018).

Για την διαλεύκανση της σχέσης SNPs και συγκεκριμένων φαινοτύπων ακολουθούνται διάφορες ερευνητικές προσεγγίσεις. Μια από αυτές είναι αυτή των GWAS, κατά τις οποίες επιχειρείται να βρεθεί συσχέτιση ανάμεσα στην ύπαρξη συγκεκριμένων SNPs στο σύνολο του γονιδιώματος, και την εμφάνιση συγκεκριμένων φαινοτύπων ή ασθενειών (Pearson 2008; Manolio 2010), με μελέτες να έχουν πραγματοποιηθεί ήδη και σε ψάρια (Gutierrez et al. 2015; Li et al. 2018). Με την μέθοδο GWAS εξετάζονται μαζικά πολλά SNPs από όλο το γονιδίωμα, και τα αποτελέσματα σχετικά με την ύπαρξη τους ή μη συσχετίζονται με συγκεκριμένα χαρακτηριστικά. Στην παρούσα μελέτη εξετάστηκαν συγκεκριμένα SNPs που εντοπίστηκαν στα γονίδια ενδιαφέροντος για την *post mortem* αλλοίωση του λευκού μυός του λαβρακιού, και συσχετίστηκαν με την δραστηριότητα των παραγομένων ενζύμων.

#### 1.4 Μέθοδοι θανάτωσης

Η θανάτωση των προς κατανάλωση ψαριών πραγματοποιείται με διάφορες μεθόδους. Οι παλαιότερες εξ αυτών, όπως η ασφυξία και η υποθερμία σε παγόνερο, δεν είναι συμβατές με τις σύγχρονες αρχές ευζωίας των ψαριών (van de Vis et al. 2003, Lines & Spence 2014), αλλά συνεχίζουν παρά ταύτα να εφαρμόζονται στις μέρες μας. Η χρήση αυτών των μεθόδων είναι εξαιρετικά επίπονη και στρεσογόνος για τα ψάρια, κάτι το οποίο τις καθιστά, πέρα από βάνουσες, και προβληματικές για την ποιότητα του ψαριού ως τρόφιμο.

Συγκεκριμένα, η βίαιη αναταραχή του ψαριού κατά την θανάτωση οδηγεί σε εξάντληση των αποθεμάτων των μυών σε ATP, και στην παραγωγή γαλακτικού οξέος, επιταχύνοντας έτσι την καταστροφή των μυϊκών ινών και αλλοιώνοντας την υφή του φιλέτου του ψαριού και την αξία του (Poli et al. 2005, Hultmann et al. 2012). Αυτός ο, εμπορικής φύσης, προβληματισμός σε συνδυασμό με την αναπτυσσόμενη ευαισθησία ως προς την κακομεταχείριση των ψαριών (van de Vis et al. 2003, Lines & Spence 2014), οδηγούν την προσπάθεια για ανάπτυξη νέων μεθόδων θανάτωσης των ψαριών.



#### 1.4.1 Ασφυξία

Η θανάτωση των ψαριών μέσω ασφυξίας είναι ίσως η πιο άσπλαχνη προς τα ψάρια μέθοδος θανάτωσης. Συγκεκριμένα, κάποια ψάρια διατηρούν τις αισθήσεις τους εκτός του θαλασσινού νερού για 15' (*Oncorhynchus mykiss*), έως και 60' (*Dicentrarchus labrax*) (Poli et al. 2005). Παραμένει ωστόσο δημοφιλής, καθώς αποτελεί και την πιο εύκολη και φθηνή στην εφαρμογή της μέθοδο θανάτωσης.

#### 1.4.2 Υποθερμία σε παγόνερο (ice slurry)

Η υποθερμία σε παγόνερο αποτελεί την δεύτερη πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδο θανάτωσης μετά την ασφυξία (Lines & Spence 2014). Σε αυτήν την περίπτωση, ο θάνατος του ψαριού επέρχεται λόγω του θερμικού σοκ το οποίο αυτό υφίσταται. Χαρακτηρίζεται ως πιο ανώδυνη μέθοδος, σε σχέση με την ασφυξία, αλλά συνεχίζει να είναι βάνουση προς τα ψάρια. Για παράδειγμα, το λαβράκι έχει φανεί ότι διατηρεί τις αισθήσεις του για 20' μέσα σε παγόνερο (Poli et al. 2005).

Ως απάντηση στις πιο βάνουσες αυτές τακτικές, διάφορες νέες μέθοδοι θανάτωσης έχουν προταθεί, οι οποίες και αναλύονται παρακάτω.

#### 1.4.3 Ηλεκτραναισθησία και υποθερμία σε παγόνερο (ice slurry)

Στην συγκεκριμένη περίπτωση, η μέθοδος θανάτωσης εξακολουθεί να είναι η πρόκληση υποθερμίας μέσα σε παγόνερο. Ωστόσο, σε αυτήν την παραλλαγή της αρχικής μεθόδου, τα ψάρια υπόκεινται πρώτα ηλεκτροσόκ, μέσω του οποίου, εφόσον πραγματοποιηθεί σωστά, επιτυγχάνεται άμεσα η αναισθησία στα ψάρια, τα οποία έπειτα μεταφέρονται στο παγόνερο. Η τάση του ρεύματος που εφαρμόζεται και η χρονική διάρκεια της εφαρμογής του ορίζεται από την αγωγιμότητα του νερού, το είδος και τον προσανατολισμό των ψαριών (EFSA 2004, Lines & Spence 2014).



#### 1.4.4 Υγρός Πάγος (Slurry Ice)

Η θανάτωση σε υγρό πάγο (slurry ice) αποτελεί μια εξέλιξη της υποθερμίας σε παγόνερο. Ο υγρός πάγος είναι ένα μείγμα νερού και πολύ μικρών σωματιδίων πάγου (Kauffeld et al. 2010). Το κύριο ανταγωνιστικό πλεονέκτημα του υγρού πάγου είναι η ταχεία ψύξη που επιτυγχάνεται λόγω της ομοιογενούς κατανομής των σωματιδίων πάγου (4 φορές ταχύτερα), αλλά και η καλύτερη κάλυψη του ψαριού, και η μη πρόκληση αμυχών στο ψάρι, σε αντίθεση με τον θρυμματισμένο πάγο (Losada et al. 2007, Medina et al. 2009, Kauffeld et al. 2010).

## 2. Στόχος της μελέτης

Το λαβράκι είναι είδος υψηλής οικονομικής σημαντικότητας για την Ελλάδα, με σημαντική ανάπτυξη της εκτροφής του σε υδατοκαλλιέργειες τις τελευταίες τρεις δεκαετίες. Εμπόδιο στην πλήρη αξιοποίηση του προϊόντος αυτού της ελληνικής υδατοκαλλιέργειας μπορεί να σταθεί η χαμηλή ποιότητα του φιλέτου του, όχι λόγω των μεθόδων εκτροφής, αλλά λόγω των βιοχημικών αλλαγών που διαδραματίζονται κατά την αποθήκευση, μετά από την θανάτωση, κεντρικό ρόλο στις οποίες κατέχουν πρωτεολυτικά ένζυμα, όπως είναι οι καλπαΐνες και οι MMPs, μέσω της αποδόμησης του μυϊκού ινιδίου και του συνδετικού ιστού.

Στόχος της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής είναι η διαλεύκανση του αντίκτυπου που έχει η ύπαρξη συγκεκριμένων μη συνώνυμων SNPs των γονιδίων των πρωτεασών αυτών, στην έκφραση και στη δραστικότητα των προϊόντων ενζύμων.

### 3. Υλικά και μέθοδοι

#### 3.1 Πειραματική μέθοδος

Για την εύρεση των πιθανών συσχετίσεων μεταξύ της ύπαρξης συγκεκριμένων παρανοηματικών SNPs και της δραστικότητας των προϊόντων ενζύμων, ακολουθήθηκε η εξής πειραματική στρατηγική. Αρχικά, εντοπίστηκαν, μέσω variant calling, SNPs στα γονίδια ενδιαφέροντος στο λαβράκι. Μετά από αλληλούχηση, τα SNPs αυτά χαρτογραφήθηκαν και χαρακτηρίστηκαν. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε Real Time PCR για την ανίχνευση των επίπεδων έκφρασης, και προσδιορισμός της ενζυμικής δραστικότητας, και τα δεδομένα αυτά συσχετίστηκαν με την εμφάνιση ή μη των παρανοηματικών SNPs σε κάθε άτομο.

#### 3.2 Επιλογή ψαριών

Για την παρούσα διπλωματική εργασία χρησιμοποιήθηκαν 130 ψάρια από τις μονάδες υδατοκαλλιέργειας Α και Ρ. Τα άτομα ήταν εμπορικού μεγέθους, και θανατώθηκαν με μία από τις 6 παρακάτω μεθόδους: σε παγόνερο έπειτα από ηλεκτραναισθησία σε χαμηλή ή υψηλή τάση (1.3V/cm + 1.6m/sec και 1.5V/CM + 1.6m/sec, αντίστοιχα), σε παγόνερο, μέσω ασφυξίας, και σε υγρό πάγο (slurry ice), είτε 100% είτε 1:1 με παγόνερο.

#### 3.3 Χαρτογράφηση SNPs

Για την συσχέτιση των SNPs με την γονιδιακή έκφραση και την ενζυμική δραστικότητα, πρώτο βήμα ήταν η εύρεση των σημειακών, μη συνώνυμων μεταλλάξεων που εντοπίζονται στα γονίδια ενδιαφέροντος, και ο έλεγχος για την ύπαρξη αυτών στο γονιδίωμα των ατόμων που συμπεριλήφθηκαν στην μελέτη. Τα δεδομένα των οποίων η παραγωγή και επεξεργασία περιγράφεται στην ενότητα αυτήν δεν παρήχθησαν στα πλαίσια αυτής της διπλωματικής εργασίας, αλλά αποτελούν δεδομένα του εργαστηρίου Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας (BIOZ), στο οποίο αυτή πραγματοποιήθηκε.

### 3.3.1 Ανίχνευση μη συνώνυμων SNPs

Τα δεδομένα για τις μη συνώνυμες μεταλλάξεις στο γονιδίωμα του *D. labrax* αντλήθηκαν από την σύγκριση WGS δεδομένων από πέντε άτομα λαβρακιού προερχόμενα από την εταιρία P με το γονιδίωμα αναφοράς (Tine et al. 2014), με την διαδικασία του variant calling. Για την ανάλυση των δεδομένων ακολουθήθηκαν οι εξής διαδικασίες: Πρώτον, χρησιμοποιήθηκε το FASTQC (Wingett & Andrews 2018) για την ποιοτική ανάλυση των δεδομένων WGS. Στη συνέχεια, χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα Trimmomatic (Bolger et al. 2014), αλληλουχίες με χαμηλό σκορ ποιότητας PHRED (<30) απορρίφθηκαν. Στη συνέχεια, το γονιδίωμα αναφοράς ανακτήθηκε από τη βάση δεδομένων Ensembl (Cunningham et al. 2022) και κατηγοριοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα bwa (Li & Durbin 2009). Οι αλληλουχίες που επιλέχθηκαν από τον έλεγχο FASTQC χαρτογραφήθηκαν στο γονιδίωμα αναφοράς, χρησιμοποιώντας το εργαλείο bwa-mem (Li 2014). Τα αρχεία SAM που περιείχαν τα δεδομένα στοίχισης μετατράπηκαν σε αρχεία BAM (δυαδικού συστήματος) και ταξινομήθηκαν με το SAMtools (Li et al. 2009).

Η ανίχνευση πολυμορφισμών στα γονιδιώματα (variant calling) βασίστηκε στα αρχεία BAM και έγινε με χρήση του προγράμματος freeBayes (Garrison & Marth 2012). Στη συνέχεια, τα SNPs πέρασαν από ποιοτικό έλεγχο με τη βοήθεια του προγράμματος vcfTools (Danecek et al. 2011). Το τελευταίο βήμα ήταν ο σχολιασμός (annotation) των γονιδίων που περιλαμβάνονταν στα variant calling files, για την απεικόνιση της πλήρους πληροφορίας στα δεδομένα.

### 3.3.2 Εντοπισμός των μη συνώνυμων SNPs και της αμινοξικής θέσης που επηρεάζουν

Από το σύνολο των SNPs που εντοπίστηκαν μέσω του variant calling, επιλέχθηκαν οι μη συνώνυμες μεταλλάξεις, αυτές, δηλαδή, οι οποίες έχουν ως αποτέλεσμα την αλλαγή της πεπτιδικής αλυσίδας. Από αυτά αποκλείστηκαν όσα δεν βρίσκονταν σε κάποια καταλυτική πρωτεϊνική επικράτεια, όσα ήταν σε γονίδια τα οποία δεν εκφράζονται στον λευκό μυ, αλλά και όσα δεν ήταν συμβατά ώστε να τρέξουν σε multiplex στο MassArray. Η θέση των SNPs που τελικά χρησιμοποιήθηκαν ανιχνεύθηκε πάνω στο γονιδίωμα αναφοράς, και σημειώθηκε η θέση της μετάλλαξης και το νουκλεοτίδιο που εντοπίστηκε στην θέση αυτήν, μαζί με 200 νουκλεοτίδια ανοδικά και καθοδικά της θέσης.

Στη συνέχεια ανακτήθηκε η αλληλουχία των γονιδιακών προϊόντων των γονιδίων αυτών, και σημειώθηκε σε αυτήν το αμινοξύ το οποίο αντικαταστάθηκε λόγω της μη συνώνυμης μετάλλαξης, και το

νέο αμινοξύ που προέκυψε από αυτήν. Η αλληλουχίες αυτές εισάχθηκαν στην βάση δεδομένων InterPro (Blum et al. 2021), από την οποία αντλήθηκαν δεδομένα σχετικά με την θέση του κάθε αμινοξέος που επηρεάστηκε από την μη συνώνυμη μετάλλαξη στην πρωτεϊνική αλληλουχία, με πιο σημαντικές τις μεταλλάξεις που εντοπίστηκε ότι επηρεάζουν θέσεις σε κάποια πρωτεϊνική επικράτεια, ή ακόμη και σε κάποιο ενεργό κέντρο.

Τέλος, η γονιδιωματική πληροφορία συντάχθηκε σε αρχεία κειμένου συμβατά με το λογισμικό του MassArray, στο οποίο πραγματοποιήθηκε η μελέτη για την ύπαρξη ή μη των μη συνώνυμων μεταλλάξεων στα γονίδια ενδιαφέροντος των δειγμάτων.

### 3.4 Προετοιμασία cDNA

#### 3.4.1 Απομόνωση RNA

Για να μελετηθεί η έκφραση των ιδιοστατικά εκφραζόμενων γονιδίων και των γονιδίων ενδιαφέροντος, το πρώτο βήμα ήταν η απομόνωση RNA από λευκό μυ των ψαριών.

Η απομόνωση RNA πραγματοποιήθηκε με βάση το ακόλουθο πρωτόκολλο:

1. Προσθήκη 10-15 mg λευκού μυός από κάθε δείγμα σε σωληνάρια, μαζί με γυάλινα και ατσάλινα σφαιρίδια, και αντιδραστήριο Nucleozol (740404 200). Το αντιδραστήριο αυτό περιέχει θειοκυανική γουανιδίνη και φαινόλη, οι οποίες επιτελούν την λύση των κυττάρων και τον εκφυλισμό των RNAσών, και τον εκφυλισμό και την απομάκρυνση του DNA, αντίστοιχα.
2. Ομογενοποίηση του μίγματος στον ομογενοποιητή Precellys (2x15 δευτερόλεπτα στα 6500 rpm).
3. Προσθήκη DEPC (diethyl pyrocarbonate) και έντονη ανάδευση για 15 δευτερόλεπτα.
4. Επώαση σε RT για 10 λεπτά και φυγοκέντριση στα 12000 g για 15 λεπτά. Με την φυγοκέντριση αυτήν κατακρημνίζονται βιομόρια όπως οι πρωτεΐνες, οι πολυσακχαρίτες και το DNA.
5. Στην συνέχεια, λήψη του υπερκείμενου και μεταφορά σε νέα σωληνάρια, με ίση ποσότητα ισοπροπανόλης. Επώαση για 10 λεπτά σε RT, ώστε να κατακρημνιστεί το RNA, και φυγοκέντριση στα 12000 g για 10 λεπτά. Απόρριψη του υπερκείμενου.
6. Προσθήκη EtOH (75% σε DEPC), φυγοκέντριση στα 8000 g για 3 λεπτά και απόρριψη του υπερκείμενου. Επανάληψη του βήματος.

7. Στέγνωμα του RNA για 10 λεπτά, και διαλυτοποίηση σε DEPC.
8. Έντονο vortex και αποθήκευση στους -80° C.
9. Μέτρηση της συγκέντρωσης RNA με φωτόμετρο Quawell (Q5000).

#### 3.4.2 Καθαρισμός δείγματος με DNάση

Για τον καθαρισμό του απομονωμένου RNA από τυχόν υπολείμματα DNA, πριν την αντίστροφη μεταγραφή προς cDNA, τα δείγματα κατεργάστηκαν με DNάση, με χρήση του DNA-free kit της Ambion (AM1906), και ακολουθώντας τα εξής βήματα:

1. Προσθήκη σε κάθε δείγμα 0,1V DNase buffer, και 1,5 μl DNase.
2. Επώαση στους 37° C για 30 λεπτά.
3. Προσθήκη σε κάθε αντίδραση 0,1V DNase inactivation reagent, και επώαση σε RT για 2-3 λεπτά, με τακτική ανακίνηση.
4. Φυγοκέντριση (10.000 g, 90'') και μεταφορά του υπερκειμένου, στο οποίο βρίσκεται το RNA, σε νέα σωληνάρια.
5. Μέτρηση της συγκέντρωσης RNA με φωτόμετρο Quawell (Q5000).

#### 3.4.3 Αντίστροφη μεταγραφή προς cDNA

Η αντίστροφη μεταγραφή του RNA προς cDNA πραγματοποιήθηκε με το High Capacity cDNA Reverse Transcription kit της Applied Biosystems (4375575). Για την διαδικασία ακολουθήθηκαν τα εξής βήματα:

1. Προετοιμασία 2x Master Mix, με προσθήκη των εξής όγκων αντιδραστηρίων ανά αντίδραση:

Αντιδραστήριο	Ποσότητα ανά αντίδραση (μl)
10x RT Buffer	2
25x dNTP Mix (100 mM)	0,8
10x RT Random Primers	2
MultiScribe Reverse Transcriptase	1
RNase inhibitor	1
Nuclease-free H <sub>2</sub> O	3,2

Συνολικός όγκος M.M. ανά αντίδραση	10
------------------------------------	----

2. Ανάμιξη ίσων όγκων (10  $\mu$ l) Master Mix και δείγματος RNA (σε κατάλληλη αραιώση ώστε να περιέχει 1  $\mu$ g RNA) σε 96-well plate.
3. Φυγοκέντριση για την απομάκρυνση τυχόν σταγόνων από το κάλυμμα του plate, και τοποθέτηση σε θερμοκυκλοποιητή, ρυθμισμένο στις ακόλουθες συνθήκες:

	Στάδιο 1	Στάδιο 2	Στάδιο 3	Στάδιο 4
<b>Θερμοκρασία (°C)</b>	25	37	85	4
<b>Χρόνος (min)</b>	10	120	5	$\infty$

4. Αποθήκευση στους -20° C.

### 3.5 Ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου

Μετά και από την αντίστροφη μεταγραφή του RNA, είχε πλέον παραχθεί το τελικό cDNA το οποίο και χρησιμοποιήθηκε στις αντιδράσεις qPCR.

#### 3.5.1 Εύρεση βέλτιστης συγκέντρωσης εκκινητών και υπολογισμός απόδοσης

Πρώτο βήμα για την ποσοτικοποίηση της έκφρασης των γονιδίων ενδιαφέροντος και των ιδιοστατικά εκφραζόμενων γονιδίων ήταν η εξακρίβωση της ιδανικής συγκέντρωσης εκκινητών για κάθε περίπτωση. Η ιδανική συγκέντρωση εκκινητών για κάθε γονίδιο ήταν και αυτή για την οποία βρέθηκε η καλύτερη απόδοση ( $0,95 < e < 1,05$ ), δηλαδή η απόδοση πιο κοντά στην μονάδα.

Για τις αντιδράσεις αυτές χρησιμοποιήθηκαν ως δείγματα επτά σειριακές αραιώσεις ενός pool, το οποίο προέκυψε από ανάμιξη 1  $\mu$ l από κάθε δείγμα. Οι αραιώσεις που χρησιμοποιήθηκαν ήταν 1/5, 1/10, 1/20, 1/50, 1/100, 1/200 και 1/500. Για αυτές τις αντιδράσεις, όπως και για τις ακόλουθες, χρησιμοποιήθηκε ο θερμοκυκλοποιητής Step One Plus, και χρησιμοποιήθηκαν 2  $\mu$ l δείγματος και 8  $\mu$ l Master Mix, για έναν τελικό όγκο αντίδρασης 10  $\mu$ l. Το Master Mix της αντίδρασης αποτελούνταν από 5  $\mu$ l αντιδραστήριου SYBR Green (cat no: KK4618), στο οποίο συμπεριλαμβάνονται πέρα από την χρωστική και dNTPs, Mg, και πολυμεράση, 0,3  $\mu$ l από τον forward εκκινητή και 0,3  $\mu$ l από τον reverse εκκινητή και

2,4 μl water for injection (WFI). Η ποσότητα των 0,3 μl από τον κάθε εκκινητή αντιστοιχεί με τελική συγκέντρωση της τάξης των 300 nM, η οποία και προσδιορίστηκε ως η βέλτιστη για όλα τα γονίδια που εξετάστηκαν.

Στα αποτελέσματα αυτών των δοκιμαστικών αντιδράσεων qPCR βασιστήκαμε για τον υπολογισμό της απόδοσης κάθε ζεύγους εκκινητών. Συγκεκριμένα, τα Ct (αριθμός κύκλων στον οποίον ο φθορισμός του δείγματος ξεπέρασε το οριζόμενο κατώφλι) τοποθετούνται στον άξονα y ενός διαγράμματος, και οι δεκαδικοί λογάριθμοι των συγκεντρώσεων που χρησιμοποιήθηκαν τοποθετούνται στον άξονα x. Από τις τιμές αυτές σχηματίζεται ένα διάγραμμα, η γραμμή τάσης. Χρησιμοποιώντας την κλίση της γραμμής τάσης υπολογίζουμε την απόδοση της αντίδρασης, με βάση τον παρακάτω τύπο:

$$E = 10^{-\frac{1}{slope}} - 1$$

### 3.5.2 Ποσοτικοποίηση της γονιδιακής έκφρασης

Έχοντας συγκεντρώσει τα δεδομένα από τις δοκιμαστικές αντιδράσεις που συζητήθηκαν στην προηγούμενη ενότητα, το επόμενο βήμα ήταν η μέτρηση της έκφρασης των ιδιοστατικών γονιδίων (με βάση την οποία κανονικοποιούνται τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων ενδιαφέροντος) και των γονιδίων ενδιαφέροντος. Τα ιδιοστατικά γονίδια θα πρέπει να ρυθμίζονται ανεξάρτητα από τα γονίδια ενδιαφέροντος, αλλά και ανεξάρτητα το ένα από τα άλλα. Μελετήθηκαν συνολικά 3 ιδιοστατικά γονίδια και 2 γονίδια ενδιαφέροντος (*actB*, *RPL13a*, *FAU* και *MMP13a*, *CAPN15b*). Από τα ιδιοστατικά γονίδια επιλέχθηκε, με χρήση του RefFinder (Xie et al. 2012), να χρησιμοποιηθούν η *actB* και το *RPL13a* για την κανονικοποίηση των δεδομένων. Για τις αντιδράσεις αυτές χρησιμοποιήθηκε το ίδιο πρωτόκολλο και το ίδιο μηχάνημα με τις δοκιμαστικές, ενώ το δείγμα cDNA αραιώθηκε κατά 1/5 πριν από την χρήση του. Η συγκέντρωση των εκκινητών ήταν για όλες τις αντιδράσεις 300 nM.

### 3.5.3 Υπολογισμός αρχικού φθορισμού και κανονικοποίηση δεδομένων

Τα δεδομένα τα οποία παράγονται από την qPCR αφορούν τον κύκλο της αντίδρασης κατά τον οποίο ο φθορισμός που παράγεται από την SYBR Green ξεπέρασε ένα κατώφλι, το οποίο εμείς θέσαμε στις 35000 μονάδες. Οι πληροφορίες αυτές, για να μας είναι χρήσιμες, θα πρέπει να μετατραπούν σε



δεδομένα φθορισμού, και συγκεκριμένα σε δεδομένα αρχικού φθορισμού, δηλαδή να υπολογιστεί ο φθορισμός ο οποίος θα παραγόταν από την αρχική, μη ενισχυμένη ποσότητα cDNA στο κάθε δείγμα. Η μετατροπή αυτή έγινε με βάση την παρακάτω εξίσωση (Čikoš et al. 2007):

$$R_0 = R_{Ct} / (E + 1)^{Ct}$$

όπου ως  $R_0$  ορίζεται ο αρχικός φθορισμός, ως  $R_{Ct}$  ο φθορισμός που παράγεται στο κατώφλι, ως  $E$  η απόδοση της αντίδρασης και ως  $Ct$  ο κύκλος της αντίδρασης στον οποίον ο φθορισμός του δείγματος υπερέβη το κατώφλι.

Έχοντας πλέον τις τιμές αρχικού φθορισμού, το τελευταίο βήμα που απαιτείται για την συσχέτιση των τιμών έκφρασης των γονιδίων ενδιαφέροντος με τα υπόλοιπα δεδομένα είναι να τις κανονικοποιήσουμε. Η κανονικοποίηση γίνεται χρησιμοποιώντας τις τιμές αρχικού φθορισμού των ιδιοστατικών γονιδίων [(εν προκειμένω τα *actB* και *RPL13a*, (Patruno et al. 2008, Mitter et al. 2009)]. Η τιμή αρχικού φθορισμού κάθε δείγματος διαιρείται με τον παράγοντα κανονικοποίησης (Normalization Factor - NF), ο οποίος επί της ουσίας είναι ο γεωμετρικός μέσος των τιμών αρχικού φθορισμού των ιδιοστατικών γονιδίων, και πάλι για το κάθε δείγμα. Χρησιμοποιείται ο γεωμετρικός μέσος όρος, έναντι του αριθμητικού, καθώς παράγει πιο αξιόπιστα αποτελέσματα σε περιπτώσεις όπου υπάρχουν μεγάλες αποστάσεις ανάμεσα στις τιμές των οποίων ο μέσος όρος υπολογίζεται (Vandesompele et al. 2002). Στην παρούσα εργασία, ο NF αποκαλείται NF2, καθώς προκύπτει από τις τιμές αρχικού φθορισμού των δυο γονιδίων τα οποία επιλέχθηκαν για την κανονικοποίηση.

Από τις τελικές αυτές τιμές αφαιρέθηκαν οι ακραίες ( $R_0 > \text{mean} + 2,24 * SD$ ), ως outliers, σύμφωνα με τους Aguinis et al. 2013 (Aguinis et al. 2013).

### 3.6 Μέτρηση ενζυμικής δραστηριότητας

Τα δεδομένα για την δραστηριότητα των ενζύμων τα οποία χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διπλωματική εργασία είναι αποτέλεσμα εργασίας των μελών του εργαστήριου Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας (BIOZ), στο οποίο και πραγματοποιήθηκε η διπλωματική εργασία.

### 3.7 Μελέτη συσχέτισης γονοτύπου και δραστικότητας

Η συσχέτιση μεταξύ του γονοτύπου κάθε SNP και της δραστικότητας του ενζύμου, για κάθε άτομο, έγινε μέσα από την διαδικτυακή εφαρμογή SNPStats (Sole et al. 2006), χρησιμοποιώντας ως συμμεταβλητή για την κανονικοποίηση της δραστικότητας την έκφραση του κάθε δείγματος. Η εφαρμογή αυτή χρησιμοποιείται για την ανάλυση μελετών συσχέτισης και από την χρήση της αποκομίζονται, πέραν της συσχέτισης, και στοιχεία περιγραφικής στατιστικής, στοιχεία για το εάν ο πληθυσμός βρίσκεται σε ισορροπία Hardy-Weinberg, και στοιχεία για το κατά πόσο οι πολυμορφισμοί που μελετώνται βρίσκονται σε ανισορροπία σύνδεσης, ενώ εξάγονται και πιθανοί απλότυποι.

Αφού ο χρήστης εισάγει τα δεδομένα του στην εφαρμογή, έχει την δυνατότητα να επιλέξει τον τύπο κάθε μεταβλητής των δεδομένων του, ανάμεσα σε «ποσοτική», «ποιοτική» και «SNP», και ποια από αυτές θα είναι η μεταβλητή με την οποία θα συσχετιστούν τα SNPs που έχει επιλέξει (response). Για την μελέτη αυτήν, οι μεταβλητές της δραστικότητας και της έκφρασης καταχωρίστηκαν σαν ποσοτικές, με την δραστικότητα να είναι η response και την έκφραση να έχει τον ρόλο συμμεταβλητής. Τελευταίο βήμα πριν από την ανάλυση των δεδομένων από την εφαρμογή είναι η επιλογή από τον χρήστη των στατιστικών αναλύσεων που θέλει να πραγματοποιηθούν από το πρόγραμμα. Οι αναλύσεις που επιλέχθηκαν ήταν αυτή των περιγραφικών στατιστικών και της ανάλυσης της συσχέτισης για κάθε SNP ξεχωριστά.

Όταν η μεταβλητή που έχει οριστεί ως response της ανάλυσης είναι ποιοτική, το αποτέλεσμα της συσχέτισης εξάγεται με βάση την λογιστική παλινδρόμηση. Στην περίπτωση μας, όπου η μεταβλητή response (δραστικότητα των ενζύμων) είναι ποσοτική, η ανάλυση συσχέτισης βασίζεται στην γραμμική παλινδρόμηση.

Το SNPStats υπολογίζει τις στατιστικές σημαντικότητες της συσχέτισης γονοτύπου και response ξεχωριστά για κάθε γενετικό μοντέλο, και αποδίδει μια τιμή AIC (Akaike Information Criterion) και μια BIC (Bayesian Information Criterion) σε καθένα από αυτά. Το πιο ταιριαστό στα δεδομένα μοντέλο είναι εκείνο με τις χαμηλότερες τιμές αυτών των δυο κριτηρίων.

## 4 Αποτελέσματα

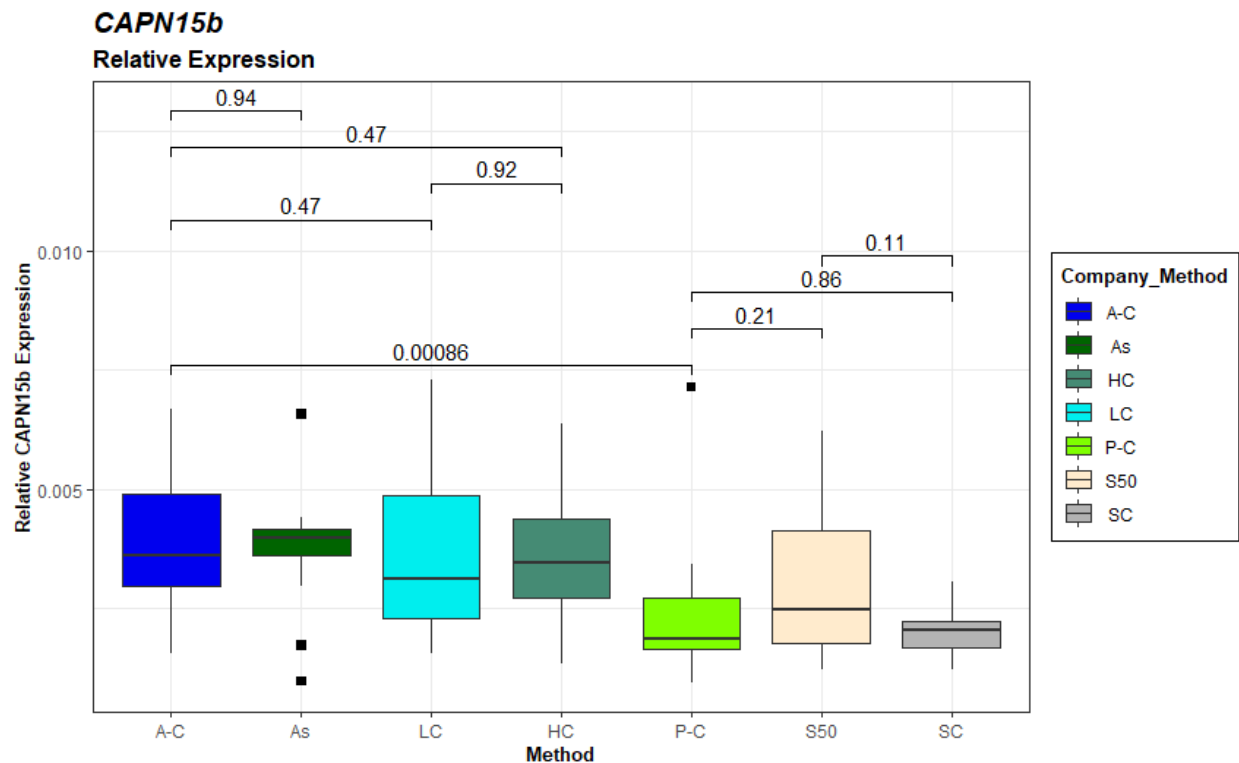
### 4.1 Μελέτη έκφρασης των γονιδίων ενδιαφέροντος

Όπως αναλύθηκε νωρίτερα, για την ακριβή ποσοτικοποίηση των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων ενδιαφέροντος, ένα απαραίτητο βήμα ήταν ο προσδιορισμός των αποδόσεων της ενίσχυσης κάθε γονιδίου. Στον παρακάτω Πίνακα (Πίνακας 2) αναγράφονται οι αποδόσεις οι οποίες επετεύχθησαν για τα 2 ιδιοστατικά ενεργά γονίδια που χρησιμοποιήθηκαν, καθώς και για τα δύο γονίδια ενδιαφέροντος τα οποία μελετήθηκαν.

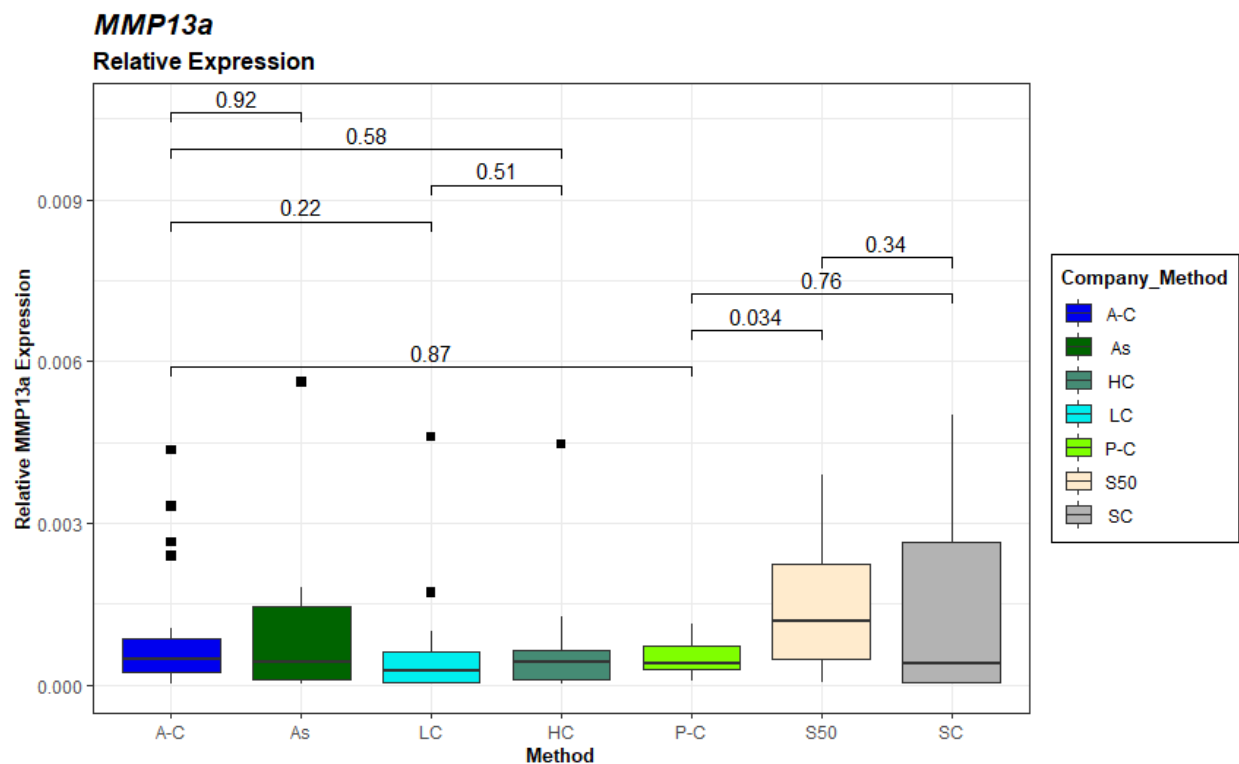
Πίνακας 2: Οι αποδόσεις της ενίσχυσης των γονιδίων τα οποία μελετήθηκαν.

<i>actB</i>	<i>RPL13a</i>	<i>CAPN15b</i>	<i>MMP13a</i>
0.9923	0.9699	1.0279	1.0178

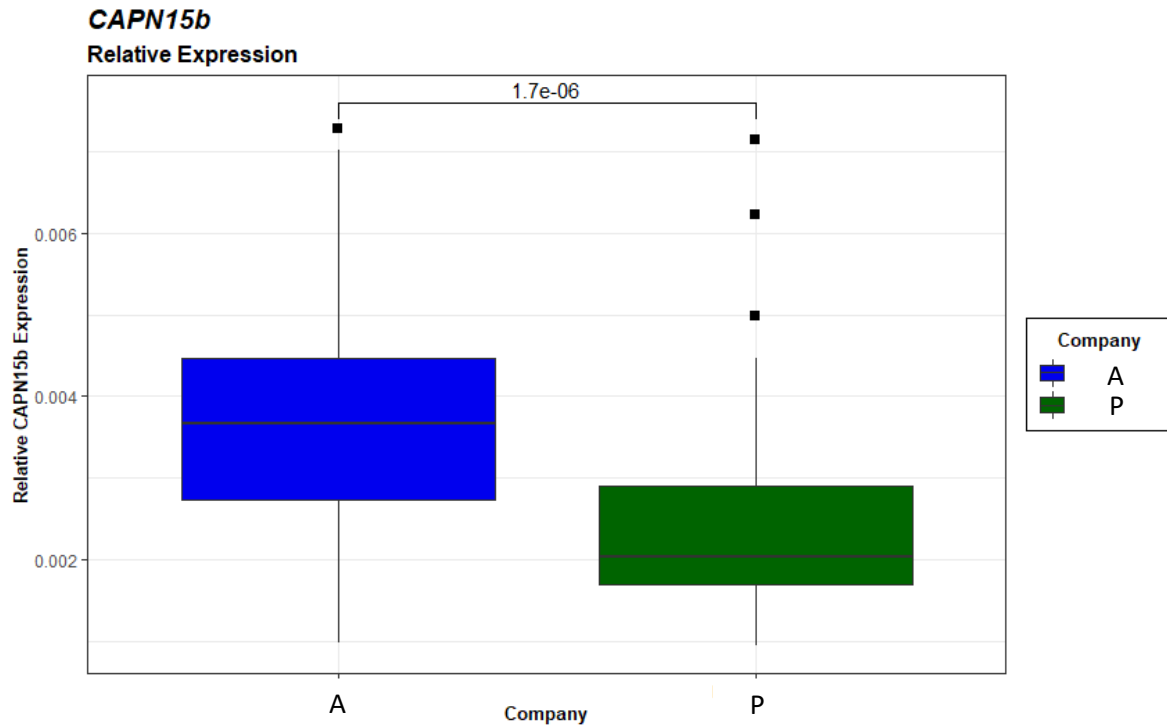
Όπως αναφέρθηκε και νωρίτερα, για την έκφραση τους μελετήθηκαν 2 γονίδια ενδιαφέροντος, τα *CAPN15b* και *MMP13a*. Τα κανονικοποιημένα επίπεδα έκφρασης αυτών των γονιδίων κατηγοριοποιήθηκαν με την μέθοδο θανάτωσης η οποία είχε εφαρμοστεί στα άτομα (ασφυξία, τοποθέτηση σε παγόνερο, ηλεκτραναισθησία υψηλής ή χαμηλής τάσης και τοποθέτηση σε παγόνερο, τοποθέτηση σε slurry ice 100% ή 50% με παγόνερο). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στις εικόνες 7 και 8, στις οποίες φαίνεται και η στατιστική σημαντικότητα της διαφοράς στα επίπεδα έκφρασης μεταξύ κάποιων από τις μεθόδους ανά εταιρεία. Επίσης, παρουσιάζεται η στατιστική σημαντικότητα της διαφοράς έκφρασης μεταξύ των δειγμάτων που αλιεύθηκαν με την συμβατική μέθοδο αλίευσης (control) από τις δύο εταιρίες. Στις εικόνες 9 και 10 παρουσιάζονται τα επίπεδα έκφρασης των δύο γονιδίων για τις δύο εταιρίες συνολικά.



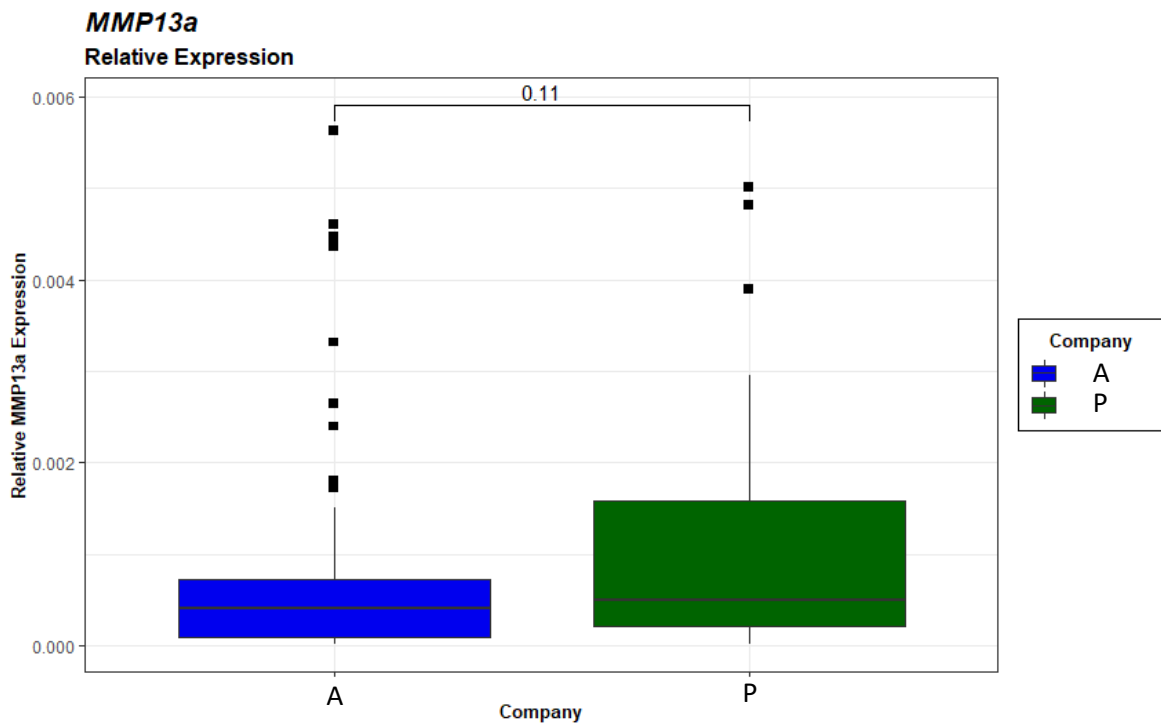
Εικόνα 7: Τα σχετικά επίπεδα έκφρασης της *CAPN15b* ως συνάρτηση της μεθόδου θανάτωσης του ατόμου. A-C: ρίψη σε παγόνερο (A), As: ασφυξία, HC: ρίψη σε παγόνερο μετά από ηλεκτραναισθησία υψηλής τάσης, LC: ρίψη σε παγόνερο μετά από ηλεκτραναισθησία χαμηλής τάσης, P-C: ρίψη σε παγόνερο (P), S50: ρίψη σε μείγμα 1:1 slurry ice:παγόνερο, SC: ρίψη σε slurry ice.



Εικόνα 8: Τα σχετικά επίπεδα έκφρασης της *MMP13a* ως συνάρτηση της μεθόδου θανάτωσης του ατόμου. A-C: ρίψη σε παγόνερο (A), As: ασφυξία, HC: ρίψη σε παγόνερο μετά από ηλεκτραναισθησία υψηλής τάσης, LC: ρίψη σε παγόνερο μετά από ηλεκτραναισθησία χαμηλής τάσης, P-C: ρίψη σε παγόνερο (P), S50: ρίψη σε μείγμα 1:1 slurry ice:παγόνερο, SC: ρίψη σε slurry ice.



Εικόνα 9: Τα σχετικά επίπεδα έκφρασης της *CAPN15b* ως συνάρτηση της μονάδας υδατοκαλλιέργειας προέλευσης του ατόμου. Υδατοκαλλιέργειες: A, P.



Εικόνα 10: Τα σχετικά επίπεδα έκφρασης της *MMP13a* ως συνάρτηση της μονάδας υδατοκαλλιέργειας προέλευσης του ατόμου. Υδατοκαλλιέργειες: A, P.

## 4.2 Εντοπισμός παρανοηματικών SNPs στα γονίδια ενδιαφέροντος

Για τα γονίδια *CAPN15b* και *MMP13a* το variant calling, η επακόλουθη χαρτογράφηση και το Mass Array αποκάλυψαν την ύπαρξη πέντε παρανοηματικών SNPs στα άτομα που μελετήθηκαν, τα οποία παρουσιάζονται παρακάτω, στον Πίνακα 3, μαζί με την συχνότητα εμφάνισης του κάθε αλληλομόρφου στον πληθυσμό της μελέτης. Η αναζήτηση παρανοηματικών SNPs αποκάλυψε τέσσερις μη μονοαλληλικούς πολυμορφισμούς, και έναν μονοαλληλικό (SNP\_2). Όσον αφορά τα SNP\_3, SNP\_4 και SNP\_5, φαίνεται ότι το αλληλόμορφο που επικρατεί στους πληθυσμούς της μελέτης είναι το αλληλόμορφο αναφοράς, με συχνότητες 98%, 84% και 86% αντίστοιχα. Δεν ισχύει, ωστόσο, το ίδιο και για το τελευταίο μη μονοαλληλικό SNP. Συγκεκριμένα, για το SNP\_1 τα δύο αλληλόμορφα εμφανίζονται με σχεδόν ίση συχνότητα (49% και 51%), με το εναλλακτικό αλληλόμορφο μάλιστα να επικρατεί. Τέλος, ο μοναδικός μονοαλληλικός πολυμορφισμός που εντοπίστηκε, το SNP\_2, εμφανίζει στο 100% των ατόμων το αλληλόμορφο αναφοράς (A) και στα δύο ομόλογα χρωμοσώματα.

Πίνακας 3: Το αλληλόμορφο αναφοράς και το εναλλακτικό αλληλόμορφο για κάθε SNP, και οι συχνότητες εμφάνισης τους.

SNP	Gene	Reference Allele	Alternative Allele	Ref. Allele Frequency %	Alt. Allele Frequency %
SNP_1	<i>CAPN15b</i>	A	G	49	51
SNP_2	<i>CAPN15b</i>	A	G	100	0
SNP_3	<i>MMP13a</i>	C	T	98	2
SNP_4	<i>MMP13a</i>	T	C	84	16
SNP_5	<i>MMP13a</i>	G	A	86	14

## 4.3 Μελέτη ενζυμικής δραστηριότητας

Η μέτρηση της ενζυμικής δραστηριότητας οδήγησε στα αποτελέσματα που παρατίθενται στον παρακάτω πίνακα 4. Στον πίνακα 4 παρουσιάζονται οι μέσες τιμές δραστηριότητας των δύο ομάδων ενζύμων, συνολικά, όπως και οι τυπικές αποκλίσεις, για κάθε μέθοδο θανάτωσης. Η ενζυμική δραστηριότητα μετράται σε  $\Delta F/\text{mg πρωτεΐνης} \cdot \text{min}$  (διαφορά φθορισμού ανά mg πρωτεΐνης  $\cdot \text{min}$ ).

Πίνακας 4: Η μέση δραστικότητα των ενζύμων και η τυπική απόκλιση ανά μέθοδο θανάτωσης.

Method	Calpain activity ( $\Delta F/\text{mg of protein} \cdot \text{min}$ )	MMP activity ( $\Delta F/\text{mg of protein} \cdot \text{min}$ )
A-C	135.36 $\pm$ 99.57	37.32 $\pm$ 20.53
As	15.57 $\pm$ 6.77	4.11 $\pm$ 1.34
HC	68.83 $\pm$ 93.4	22.28 $\pm$ 20.11
LC	76.67 $\pm$ 91.79	19.03 $\pm$ 15.04
P-C	126.13 $\pm$ 116.64	6.92 $\pm$ 2.98
S50	32.93 $\pm$ 21.73	8.81 $\pm$ 4.39
SC	25.34 $\pm$ 11.3	8.33 $\pm$ 5.84

#### 4.3 Συσχέτιση γονοτύπου συγκεκριμένου SNP με δραστικότητα

Το επόμενο βήμα της ανάλυσης των αποτελεσμάτων ήταν η συσχέτιση του γονοτύπου κάθε SNP με τις τιμές ενζυμικής δραστικότητας των ατόμων, με χρήση του προγράμματος SNPStats. Για το γονίδιο της *CAPN15b* το γενετικό μοντέλο που επιλέχθηκε ήταν αυτό της υπερκυριαρχίας (overdominance), ενώ για την *MMP13a* το μοντέλο ήταν το υπολειπόμενο (recessive).

Στους πίνακες παρακάτω (Πίνακες 5-8) φαίνονται τα αποτελέσματα των αναλύσεων συσχέτισης του SNPStats για τους γονοτύπους καθενός από τα SNPs.

Πίνακας 5: Το αποτέλεσμα του SNPStats για το SNP\_1 της *CAPN15b*. Αναγράφεται ο αριθμός του SNP, οι κατηγορίες στις οποίες κατατάσσονται οι γονότυποι βάση του μοντέλου, ο μέσος όρος της δραστικότητας και το στατιστικό σφάλμα για κάθε κατηγορία, καθώς και η διαφορά κάθε κατηγορίας από την κατηγορία αναφοράς και το διάστημα εμπιστοσύνης 95% για την διαφορά και η στατιστική σημαντικότητα p.

SNP	Genotype	Response mean (s.e.)	Difference (95% CI)	P-value
SNP_1	G/G-A/A	105.3 (16.22)	0	0.16
	A/G	76.2 (14.08)	-30.38 (-72.25 - 11.49)	

Πίνακας 6: Το αποτέλεσμα του SNPStats για το SNP\_3 της *MMP13a*. Αναγράφεται ο αριθμός του SNP, οι κατηγορίες στις οποίες κατατάσσονται οι γονότυποι βάση του μοντέλου, ο μέσος όρος της δραστικότητας και το στατιστικό σφάλμα για κάθε κατηγορία, καθώς και η διαφορά κάθε κατηγορίας από την κατηγορία αναφοράς και το διάστημα εμπιστοσύνης 95% για την διαφορά και η στατιστική σημαντικότητα p.

SNP	Genotype	Response mean (s.e.)	Difference (95% CI)	P-value
SNP_3	C/C	18.62 (1.76)	0	0.18
	T/C	6.57 (1.93)	-12.62 (-31.06 - 5.83)	

Πίνακας 7: Το αποτέλεσμα του SNPStats για το SNP\_4 της *MMP13a*. Αναγράφεται ο αριθμός του SNP, οι κατηγορίες στις οποίες κατατάσσονται οι γονότυποι βάση του μοντέλου, ο μέσος όρος της δραστικότητας και το στατιστικό σφάλμα για κάθε κατηγορία, καθώς και η διαφορά κάθε κατηγορίας από την κατηγορία αναφοράς και το διάστημα εμπιστοσύνης 95% για την διαφορά και η στατιστική σημαντικότητα p.

SNP	Genotype	Response mean (s.e.)	Difference (95% CI)	P-value
SNP_4	T/T-T/C	16.13 (1.64)	0	0.0018
	C/C	38.21 (7.9)	22.06 (8.58 - 35.54)	

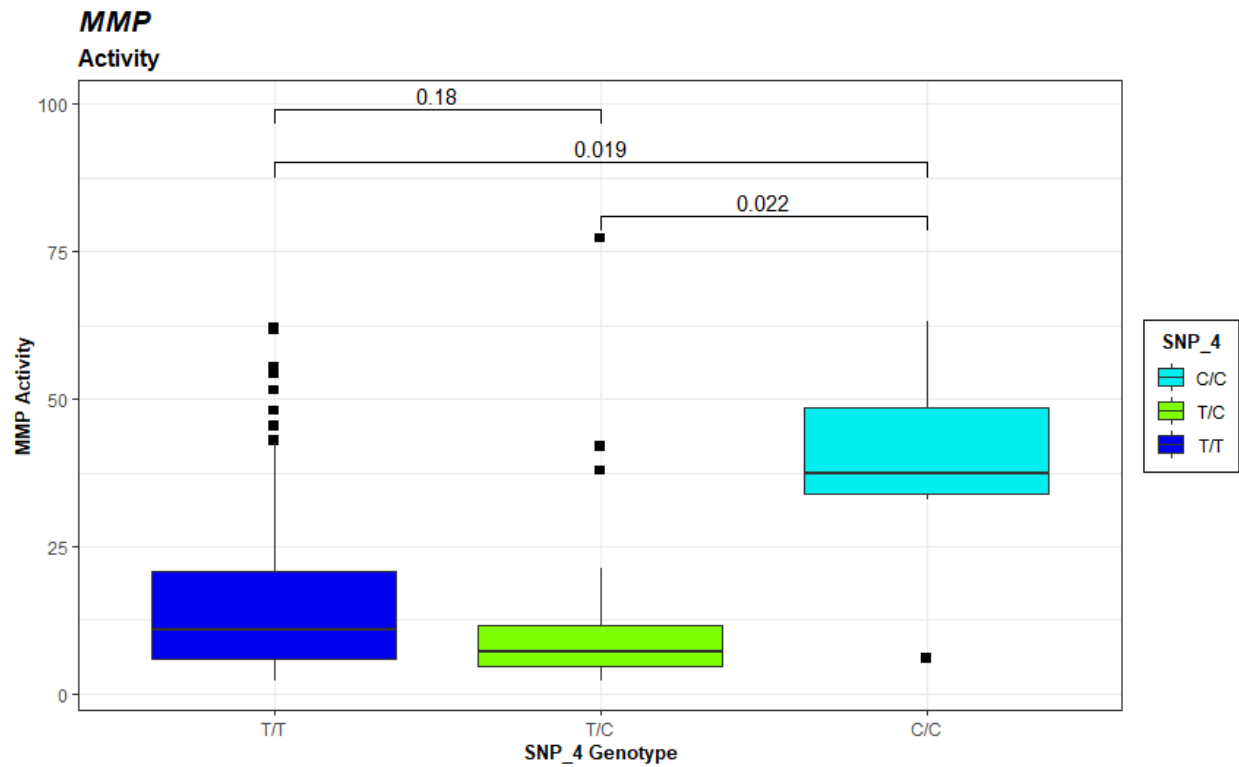
Πίνακας 8: Το αποτέλεσμα του SNPStats για το SNP\_5 της *MMP13a*. Αναγράφεται ο αριθμός του SNP, οι κατηγορίες στις οποίες κατατάσσονται οι γονότυποι βάση του μοντέλου, ο μέσος όρος της δραστικότητας και το στατιστικό σφάλμα για κάθε κατηγορία, καθώς και η διαφορά κάθε κατηγορίας από την κατηγορία αναφοράς και το διάστημα εμπιστοσύνης 95% για την διαφορά και η στατιστική σημαντικότητα p.

SNP	Genotype	Response mean (s.e.)	Difference (95% CI)	P-value
SNP_5	G/G-G/A	18.46 (1.88)	0	0.43
	A/A	29 (20.14)	10.66 (-15.85 - 37.16)	

Παρατηρούμε συνεπώς μια στατιστικά σημαντική συσχέτιση του γονοτύπου του SNP\_4 της *MMP13a* με την δραστικότητα του ενζύμου.

Κατά την οπτικοποίηση και στατιστική ανάλυση της δραστικότητας των MMPs στα άτομα με διαφορετικούς γονοτύπους για κάθε SNP, παράλληλα με την εκτέλεση της ανάλυσης συσχέτισης μέσω του SNPStats, παρατηρήθηκε ότι, όσον αφορά το SNP\_4, τα άτομα που ήταν ομόζυγα στο εναλλακτικό αλληλόμορφο (C/C) εμφανίζουν σημαντικά υψηλότερη δραστικότητα σε σύγκριση με τα ομόζυγα για το αλληλόμορφο αναφοράς (T/T) και τα ετερόζυγα άτομα (T/C) (Εικόνα 11). Ο γονότυπος αυτός εντοπίστηκε στο 8% των ατόμων της εταιρείας A και στο 3% των ατόμων της εταιρείας P.





Εικόνα 11: Η δραστικότητα των MMPs στα άτομα με τους τρεις διαφορετικούς γονοτύπους ως προς το SNP\_4 της *MMP13a*.

## 5 Συζήτηση

### 5.1 Μελέτες έκφρασης

Όπως αναλύθηκε νωρίτερα, οι μελέτες έκφρασης πραγματοποιήθηκαν για 2 γονίδια, τα *CAPN15b* και *MMP13a*, και για 7 διαφορετικές συνθήκες θανάτωσης. Οι 7 αυτές συνθήκες αφορούν 6 μεθόδους θανάτωσης, εκ των οποίων η μια (θανάτωση σε παγόνερο, κοντρόλ) πραγματοποιήθηκε και στις 2 μονάδες υδατοκαλλιέργειας των οποίων άτομα συμπεριλήφθηκαν στα πειράματα, και για αυτόν τον λόγο η μέθοδος αυτή μελετάται ξεχωριστά για κάθε μία υδατοκαλλιέργεια. Στο διάγραμμα που παρουσιάζεται στα αποτελέσματα επιλέχθηκε να απεικονιστούν οι στατιστικές σημαντικότητες για κάποια μόνο από τα ζεύγη διαφορετικών συνθηκών. Συγκεκριμένα τα ζεύγη αυτά αφορούν τις μεθόδους θανάτωσης κάθε μονάδας και τα αντίστοιχα κοντρόλ τους, τα κοντρόλ των δύο υδατοκαλλιεργειών μεταξύ τους, αλλά και τις μεθόδους HC και LC, οι οποίες συγκρίνονται λόγω της πολύ κοντινής και άμεσα συγκρίσιμης φύσης τους.

Όπως φαίνεται στο διάγραμμα για την *CAPN15b* (Εικόνα 7), οι μόνες μέθοδοι των οποίων τα άτομα παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική διαφορά στα επίπεδα της έκφρασης τους είναι τα κοντρόλ των δύο εταιριών (A-C και P-C), με  $p=0,00086$ . Καμία άλλη σύγκριση δεν επιδεικνύει στατιστική σημαντικότητα  $p<0,05$ .

Το φαινόμενο αυτό δεν παρατηρείται και για την *MMP13a* (Εικόνα 8). Αντίθετα, όσον αφορά τα επίπεδα έκφρασης αυτού του γονιδίου, οι μόνες μέθοδοι των οποίων τα άτομα επέδειξαν στατιστικά σημαντική διαφορά ήταν το κοντρόλ (P-C) και η θανάτωση με ρίψη σε ισόποσο μείγμα παγόνερου και slurry ice (S50), με  $p=0,034$ . Κανένα άλλο ζεύγος μεθόδων δεν είχε διαφορά στα επίπεδα έκφρασης με σημαντικότητα  $p<0,05$ . Ενδιαφέρον παρουσίασε το γεγονός ότι η έκφραση της μεταλλοπρωτεϊνάσης φαίνεται να αυξάνεται σημαντικά στην ομάδα ατόμων η οποία θανατώθηκε με ρίψη σε μείγμα 1:1 slurry ice και παγόνερου, αλλά όχι στην ομάδα που θανατώθηκε με ρίψη σε 100% παγόνερο. Δυστυχώς, πάνω στο συγκεκριμένο ζήτημα δεν βρέθηκε κάποια αναφορά στην επιστημονική βιβλιογραφία.

Για την *CAPN15b*, για την οποία δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα σε ομάδες δειγμάτων από την ίδια υδατοκαλλιέργεια, παρατηρείται στην εικόνα 9 ότι εμφανίζεται στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στα δείγματα που προέρχονται από την A και αυτά που προέρχονται από

την P. Το γεγονός αυτό μπορεί να αποδοθεί στις διαφορετικές μεθόδους θανάτωσης που εφαρμόστηκαν στα άτομα κάθε εταιρείας, και κυρίως στην διαφορετικότητα των πληθυσμών τους, η οποία καταδεικνύεται και από την στατιστικά σημαντική διαφορά στα επίπεδα έκφρασης των κοντρόλ των δυο υδατοκαλλιεργειών (Εικόνα 7). Στην περίπτωση της έκφρασης της *MMP13a* ανά υδατοκαλλιέργεια προέλευσης (Εικόνα 10) δεν παρατηρείται ανάλογη διαφοροποίηση.

## 5.2 Παρανοηματικά SNPs

Τα SNPs αποτελούν την κυριότερη πηγή γενετικής ποικιλομορφίας ανάμεσα σε άτομα του ίδιου είδους (Robert & Pelletier 2018). Ως εκ τούτου, η αναζήτηση για SNPs τα οποία επηρεάζουν την έκφραση γονιδίων και την λειτουργικότητα και δραστικότητα γονιδιακών προϊόντων αποτελεί στόχο της γονιδιωματικής. Η συσχέτιση τέτοιων πολυμορφισμών με ασθένειες και άλλους φαινοτύπους είναι εξαιρετικά σημαντική για την καλύτερη κατανόηση της γενετικής τους βάσης (την εύρεση δηλαδή των υπεύθυνων γονιδίων) (Cordell & Clayton 2005, Emadi et al. 2020), αλλά και τον σχεδιασμό προγραμμάτων γενετικής βελτίωσης (Sharma et al. 2013) και εξατομικευμένης προσέγγισης σε ζητήματα όπως η διατροφή (Mullins et al. 2020) και η υγεία (Laing et al. 2011).

Η γενετική τροποποίηση μπορεί να εφαρμοστεί και με στόχο την βελτίωση ποιοτικών χαρακτηριστικών ζώων παραγωγής, όπως τα ψάρια υδατοκαλλιέργειας (Osmond & Colombo, 2019). Σε αυτό το πλαίσιο ερευνά η παρούσα μελέτη την συσχέτιση παρανοηματικών SNPs γονιδίων που επηρεάζουν την *post mortem* αλλοίωση του λευκού μυός του λαβρακιού με την δραστικότητα των παραγόμενων ενζύμων.

Η χαμηλή συχνότητα εμφάνισης του αλληλομόρφου αναφοράς του SNP\_1, σε συνδυασμό με την πολύ χαμηλή συχνότητα εμφάνισης του εναλλακτικού αλληλομόρφου των SNP\_4, SNP\_5 και κυρίως του SNP\_3, όπως αναφέρθηκαν στο υποκεφάλαιο 4.2, έγιναν αιτία προβληματισμού.

Στην επιστημονική βιβλιογραφία βρέθηκε αναφορά σε SNP array για το λαβράκι (Peñaloza et al. 2021). Η συγκεκριμένη έρευνα μελέτησε 538 λαβράκια (άγρια και υδατοκαλλιέργειας), από 24 συνολικά πληθυσμούς, σε όλη τη Μεσόγειο και τον Ατλαντικό, και είχε ως στόχο συγκεκριμένα γονίδια, τα οποία εμπλέκονται με συγκεκριμένα παραγωγικά χαρακτηριστικά. Ως εκ τούτου, οι πληθυσμοί και τα SNPs της έρευνας αυτής δεν μπορούν να θεωρηθούν αντιπροσωπευτικά των αντιστοίχων της παρούσας εργασίας, ωστόσο τα 22.605 SNPs των οποίων τα δεδομένα συχνοτήτων παρουσιάζει θεωρήθηκε ότι παρέχουν μια

καλή εκτίμηση της μέσης συχνότητας εμφάνισης των εναλλακτικών αλληλομόρφων στα SNPs του λαβρακιού. Για το σύνολο των πολυμορφισμών της έρευνας των Peñaloza et al., υπολογίστηκε ότι η μέση συχνότητα εμφάνισης του εναλλακτικού αλληλομόρφου ήταν 32% ( $\pm 10\%$ ).

Έτσι, το εναλλακτικό αλληλόμορφο του SNP\_1 (51%) φαίνεται να εμφανίζεται με μια συχνότητα μεγαλύτερη του τυπικού (σύμφωνα με την προαναφερθείσα μελέτη). Παράλληλα, παρατηρείται ότι για τα SNP\_3, SNP\_4 και SNP\_5, η συχνότητα εμφάνισης του εναλλακτικού αλληλομόρφου είναι χαμηλότερη του τυπικού, στην περίπτωση των SNP\_4 (16%) και SNP\_5 (14%), και σημαντικά χαμηλότερη στην περίπτωση του SNP\_3 (2%). Οι παρατηρήσεις αυτές, σε συνδυασμό με την καθολική επικράτηση (100%) του αλληλομόρφου αναφοράς του SNP\_2 οδήγησαν σε προβληματισμό πάνω στην επίδραση του περιβάλλοντος και του κλειστού πληθυσμού μιας υδατοκαλλιέργειας στην γενετική σύσταση των ατόμων που την απαρτίζουν.

Η δόμηση μιας μονάδας υδατοκαλλιέργειας ξεκινά με την επιλογή γεννητόρων. Η επιλογή των γεννητόρων είναι εξαιρετικής σημασίας, καθώς το σύνολο της γενετικής ποικιλότητας των ατόμων της μονάδας προέρχεται από την γενετική ποικιλότητα των γεννητόρων αυτών (Fernandez et al. 2014). Παρόλα αυτά, η επιλογή τους συνήθως δεν γίνεται με βάση κάποιο μοντέλο επιλογής, παρά μόνο στο 10% περίπου των περιπτώσεων (Zenger et al. 2019). Συνεπώς, η τυχαία ύπαρξη συγκεκριμένων αλληλομορφικών αναλογιών στον περιορισμένο αριθμό γεννητόρων μιας μονάδας υδατοκαλλιέργειας θα μπορούσε πιθανώς να οδηγήσει στην εικόνα που παρατηρούμε στην μελέτη αυτήν.

### 5.3 Ενζυμική δραστικότητα

Στην επιστημονική βιβλιογραφία εντοπίζονται αρκετές μελέτες που αφορούν στην δραστικότητα των δυο ενζύμων που μελετήθηκαν στην παρούσα διπλωματική εργασία, είτε στο λαβράκι, είτε σε αλλά ψάρια. Μια τέτοια μελέτη είναι αυτή των He et al. το 2018, η οποία αφορά ένα είδος tilapia. Στην συγκεκριμένη μελέτη, τα ψάρια θανατώθηκαν με χτύπημα στο κεφάλι, και λήφθηκαν δείγματα για διάφορα χρονικά σημεία της ημέρας 0, και συγκεκριμένα για τις ώρες 0-20. Το πρώτο δείγμα (ώρα 0) επέδειξε δραστικότητα καλπαϊνών της τάξης των 275 ΔF/mg πρωτεΐνης, με τις μετέπειτα μετρήσεις να αυξάνουν και να παρουσιάζουν μέγιστη δραστικότητα στις 5 ώρες, με 350 ΔF/mg πρωτεΐνης, και στη συνέχεια να μειώνονται μέχρι την 20η ώρα (περίπου 290 ΔF/mg πρωτεΐνης). Η μείωση στην δραστικότητα αποδόθηκε από τους συγγραφείς της μελέτης στην αυτόλυση των ενζύμων και την μείωση

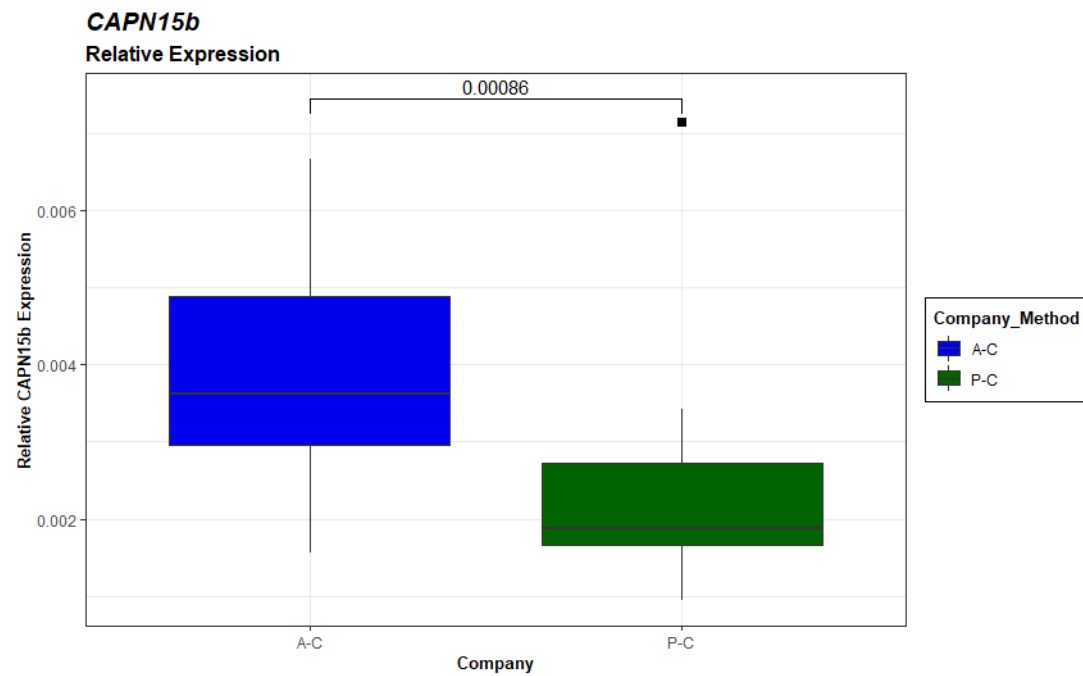
των ελεύθερων ιόντων ασβεστίου για την ενεργοποίηση τους. Η μελέτη αυτή σημειώνει υψηλότερες τιμές δραστηριότητας των ενζύμων σε σχέση με αυτές που παρουσιάζονται, δεν είναι ωστόσο άμεσα συγκρίσιμες με αυτές, καθώς αφορούν, πρώτον, διαφορετικό είδος, και δεύτερον, άτομα θανατωμένα με μέθοδο η οποία δεν μελετήθηκε.

Από μια άλλη έρευνα, αυτή την φορά σε άτομα *Ctenopharyngodon idella* (Zang et al. 2016), παρατηρείται, στις μονάδες που εκφράζονται και τα παρόντα δεδομένα, δραστηριότητα καλπαϊνών λίγο χαμηλότερη από τις 100 μονάδες. Το αποτέλεσμα αυτό αφορά την ημέρα 0. Τα επίπεδα δραστηριότητας που παρατηρούνται σε αυτή τη μελέτη προσεγγίζουν καλύτερα τις μετρήσεις που παρουσιάζονται εδώ, για κάποιες από τις μεθόδους. Ωστόσο, τα ψάρια και αυτής της μελέτης είναι διαφορετικού είδους, και θανατώθηκαν και αυτά με χτύπημα στο κεφάλι, και ως συνέπεια αυτών δεν μπορεί να γίνει άμεση σύγκριση με τα αποτελέσματα ενζυμικής δραστηριότητας που παρουσιάζονται εδώ.

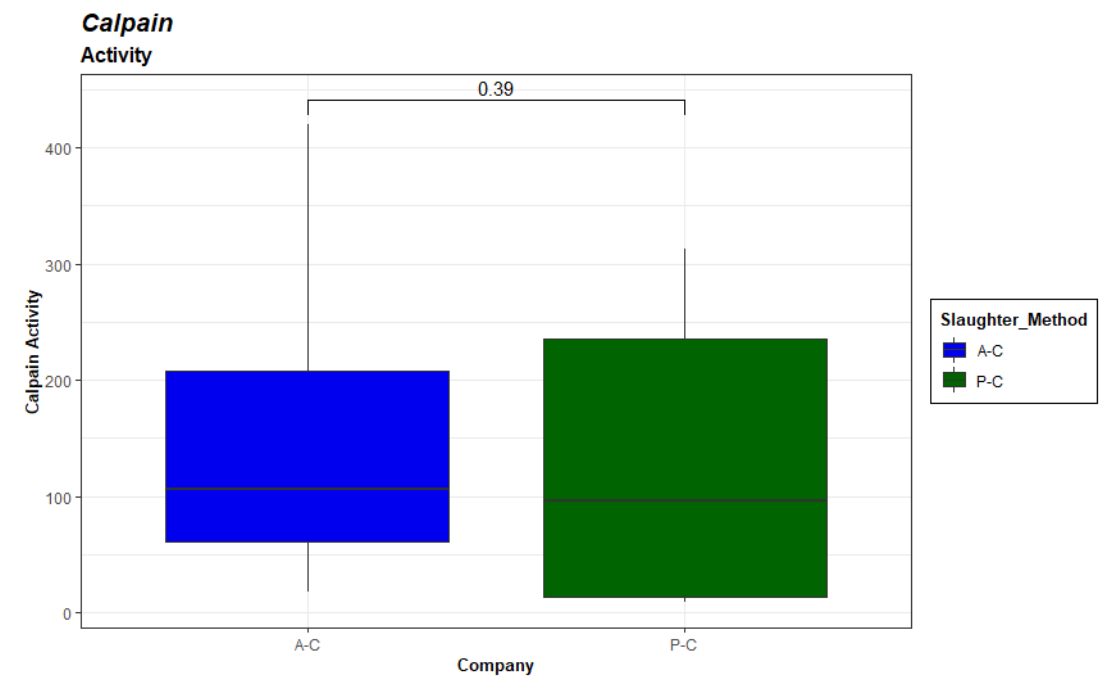
Σχετικά με την *post mortem* δραστηριότητα των καλπαϊνών στο λαβράκι, αλλά και όσον αφορά την *post mortem* δραστηριότητα των MMPs, όσες αναφορές βρέθηκαν δεν αφορούσαν σε μετρήσεις ημέρας 0, ή δεν χρησιμοποιούσαν μεθόδους ποσοτικοποίησης της δραστηριότητας ανάλογες με αυτές που χρησιμοποιήθηκαν για την παραγωγή των δεδομένων που παρουσιάζονται σε αυτήν την εργασία.

#### 5.4 Σύγκριση διαφορών στην έκφραση και την δραστηριότητα

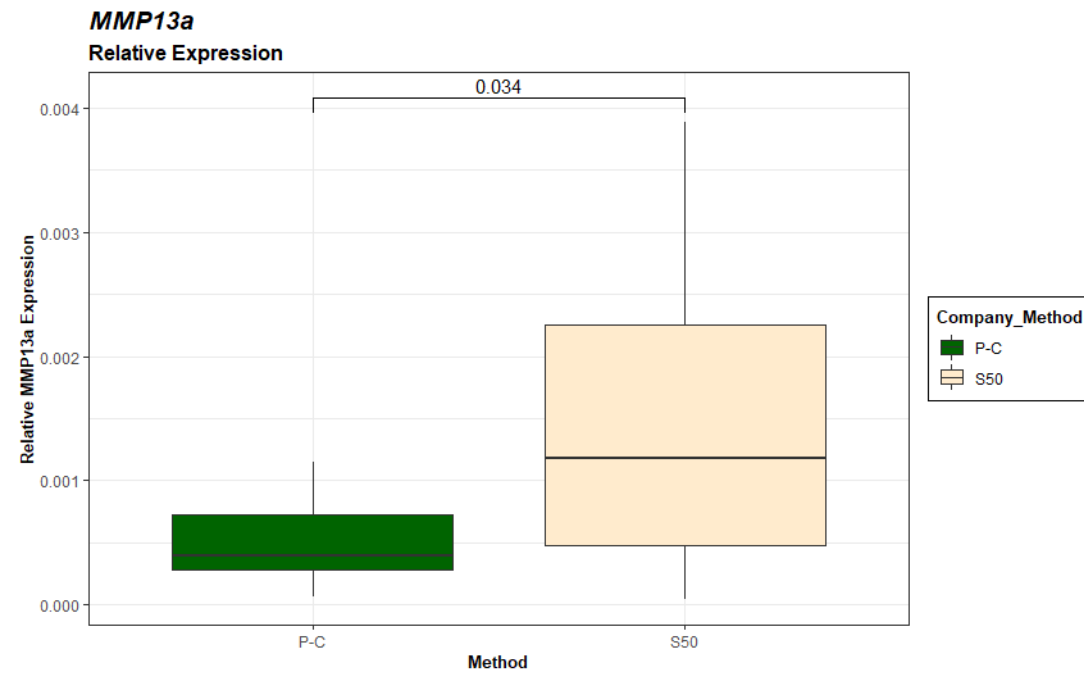
Παρατηρώντας τα δεδομένα που έχουν παρουσιαστεί σχετικά με την έκφραση στις εικόνες 7 και 8, και σχετικά με την δραστηριότητα των ενζύμων στον πίνακα 4, παρατηρείται το ακόλουθο φαινόμενο. Οι ομάδες ατόμων που εμφανίζουν στατιστικά σημαντική διαφορά επίπεδων έκφρασης για τα δυο γονίδια (A-C και P-C για την *CAPN15b* και P-C και S50 για την *MMP13a*) δεν εμφανίζουν τις ανάλογες, στατιστικά σημαντικές διαφορές και όσον αφορά την δραστηριότητα τους, παρόλο που φαίνεται και για τα δυο γονίδια ότι η ομάδα με την χαμηλότερη έκφραση είναι και αυτή με την χαμηλότερη δραστηριότητα. Αυτό παρουσιάζεται πιο ξεκάθαρα στις παρακάτω εικόνες (12 έως 15).



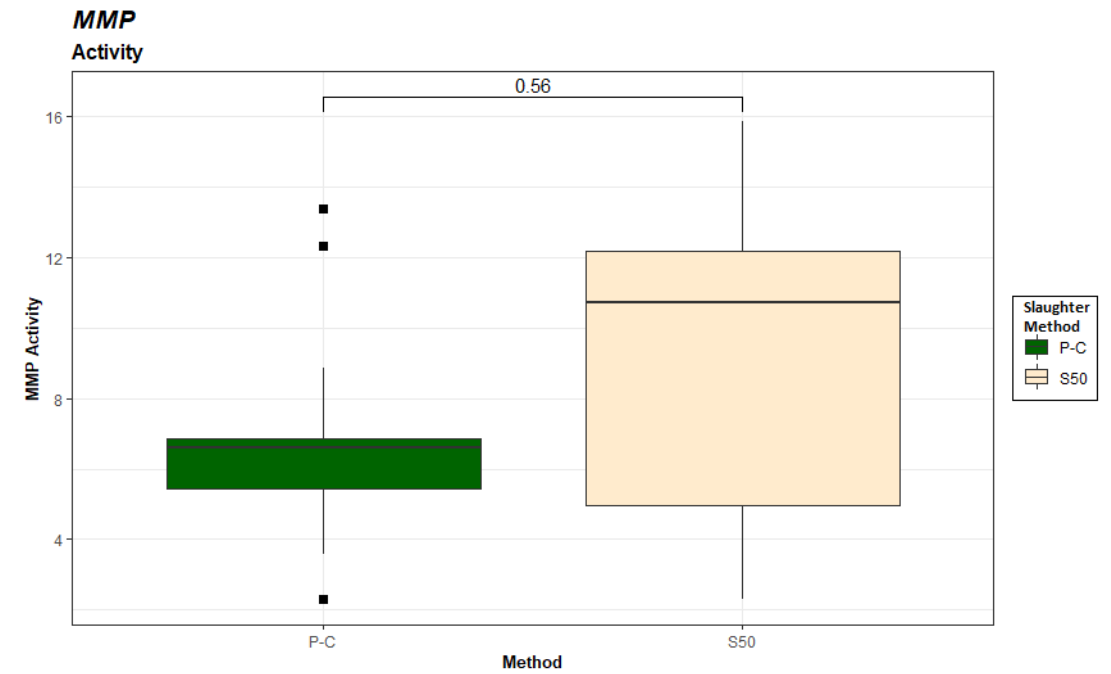
Εικόνα 12: Η σχετική έκφραση της *CAPN15b* για τα κοντρόλ των δύο εταιρειών (A-C: A, P-C: P).



Εικόνα 13: Η δραστηριότητα των καλπαϊνών για τα κοντρόλ των δύο εταιρειών (A-C: A, P-C: P).



Εικόνα 14: Η σχετική έκφραση της *MMP13a* για τις δύο μεθόδους (P-C: κοντρόλ, S50: ρίψη σε μείγμα 1:1 slurry ice:παγόνερο).



Εικόνα 15: Η δραστηριότητα των MMPs για τις δύο μεθόδους (P-C: κοντρόλ, S50: ρίψη σε μείγμα 1:1 slurry ice:παγόνερο).

Ποια είναι όμως η αιτία που επιφέρει αυτήν την εξισορρόπηση στην δραστικότητα των ενζύμων μεταξύ των ομάδων, παρότι στην μια από αυτές, σε κάθε περίπτωση, σημειώνεται σημαντική στατιστικά αύξηση στα επίπεδα έκφρασης; Η διαφορά αυτή θα μπορούσαμε να υποθέσουμε ότι έγκειται στο διαφορετικό γενετικό και επιγενετικό υπόβαθρο των ατόμων, και ότι η περίσσεια του παραγομένου mRNA είτε δεν μεταφράζεται, είτε μεταφράζεται αλλά δεν αποκτά την τελική δραστική μορφή του, είτε, τέλος, αποκτά την δραστική μορφή του και αποθηκεύεται. Αυτό, όμως, ευσταθεί μόνο στην περίπτωση της καλπαΐνης, όπου η διαφορά στην έκφραση υπάρχει ανάμεσα σε άτομα διαφορετικών υδατοκαλλιεργειών, όπου μπορεί να υφίσταται σημαντική διαφορά στο γενετικό και επιγενετικό υπόβαθρο των ατόμων. Στην περίπτωση της MMP όμως, όπου οι δυο ομάδες προέρχονται από την ίδια μονάδα υδατοκαλλιέργειας, αυτή η απάντηση δεν καλύπτει το ερώτημα.

Η απάντηση του ερωτήματος ίσως βρίσκεται στο γεγονός ότι τα ένζυμα αυτά παράγονται ως ανενεργά προένζυμα. Συγκεκριμένα, οι καλπαΐνες μεταφράζονται υπό την μορφή ζυμογόνου, το ενεργό κέντρο του οποίου είναι κατειλημμένο από το προπεπτίδιο που στην συνέχεια θα απομακρυνθεί για να αποκτήσει το ένζυμο την ενεργή του μορφή. Αυτό συμβαίνει έτσι ώστε να ελέγχεται η δραστικότητα των καλπαϊνών, και να αποφεύγεται η πρωτεόλυση όταν αυτή δεν είναι απαραίτητη για το κύτταρο (Jia et al. 2002). Ομοίως, και για τον ίδιο λόγο, οι MMPs παράγονται και αυτές αρχικά ως ανενεργές pro-MMPs, με μια κυστεϊνική σουλφυδρυλομάδα να μπλοκάρει το καταλυτικό κατιόν ψευδαργύρου στο ενεργό τους κέντρο (Cui et al. 2017).

Έτσι, η μη αντιστοίχιση της αύξησης στην έκφραση με μια αναμενομένη αύξηση και στην δραστικότητα των ενζύμων μπορεί να εξηγηθεί, εφόσον η αύξηση στην έκφραση δεν συνεπάγεται άμεσα την ύπαρξη ενεργών ενζύμων.

## 5.5 Ανάλυση συσχέτισης συγκεκριμένου γονοτύπου και δραστικότητας

Τα αποτελέσματα της ανάλυσης συσχέτισης μέσω του SNPStats δεν επέδειξαν στατιστικά σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στους διαφορετικούς γονοτύπους των SNPs SNP\_1, SNP\_3 και SNP\_5 και την ενζυμική δραστικότητα, με τις στατιστικές σημαντικότητες αυτών των συσχετίσεων να είναι  $p=0.16$ ,  $p=0.18$  και  $p=0.43$ , αντίστοιχα. Τα SNPs αυτά, αντιστοίχως, επηρεάζουν ανάλογα με τον γονότυπο τους: μια zinc-finger ρυθμιστική περιοχή της *CAPN15b*, την hemorexin-like [(υπεύθυνη για την αλληλεπίδραση με τους TIMPs και την αναγνώριση του υποστρώματος (Cabral-Pacheco et al. 2020; Cui et al. 2017))]

επικράτεια της *MMP13a* και την καταλυτική επικράτεια της *MMP13a*, σύμφωνα με τις πληροφορίες που αντλήθηκαν από την InterPro (Blum et al. 2021). Συγκεκριμένα για το SNP\_5, από την InterPro φαίνεται ότι το αμινοξύ το οποίο επηρεάζει δεν βρίσκεται μέσα στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου, ούτε σε περιοχή πρόσδεσης TIMP.

Για το SNP\_4 ωστόσο, το SNPStats έδειξε στατιστικά σημαντική συσχέτιση, με τον γονότυπο C/C να συσχετίζεται σημαντικά με την ενζυμική δραστηριότητα ( $p=0,0018$ , \*\*). Η συσχέτιση του συγκεκριμένου γονοτύπου με σημαντική αύξηση στην δραστηριότητα φαίνεται και από τα αποτελέσματα της εικόνας 11.

Κατ' αρχάς, θα πρέπει να σχολιαστεί η επιλογή του γενετικού μοντέλου στο SNPStats όσον αφορά την *MMP13a*. Για το SNP\_3 του γονιδίου αυτού, το πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε δεν εξάγει κάποιο αποτέλεσμα σχετικά με το γενετικό μοντέλο που επικρατεί, καθώς εμφανίζονται μόνο δυο γονότυποι στα δεδομένα (C/C και C/T), με την ομοζυγωτία του αλληλομόρφου T να απουσιάζει πλήρως. Για τα SNP\_4 και SNP\_5, τα κριτήρια AIC και BIC προτείνουν διαφορετικά μοντέλα ως ιδανικότερα για την περιγραφή των δεδομένων, το υπολειπόμενο στο SNP\_4 και το log-additive στο SNP\_5. Ωστόσο, οι τιμές των κριτηρίων που υποστηρίζουν το μοντέλο για το SNP\_5 είναι πολύ κοντινές με αυτές που υποστηρίζουν το υπολειπόμενο, ενώ οι τιμές που υποστηρίζουν το μοντέλο για το SNP\_4 έχουν μεγαλύτερη διαφορά από αυτές των άλλων μοντέλων. Συνεπώς, επιλέχθηκε, για το παρόν πείραμα, να θεωρηθεί ότι το μοντέλο για ολόκληρο το γονίδιο θα είναι αυτό του υπολειπόμενου. Σημειώνεται ότι, για το SNP\_5 δεν εμφανίζεται στατιστικά σημαντική συσχέτιση με κανένα από τα μοντέλα, ενώ για το SNP\_4 εμφανίζεται στατιστικά σημαντική διαφορά και με την εφαρμογή του μοντέλου log-additive, αν και μικρότερης σημαντικότητας.

Το SNP\_4, που φαίνεται να επηρεάζει την ενζυμική δραστηριότητα των MMPs, εντοπίζεται στην περιοχή του γονιδίου η οποία, για κάποιους αναφέρεται ως peptidoglycan binding-like επικράτεια του ενζύμου (PGBD-like) (J. Jiang et al. 2022; Y. Jiang et al. 2010; Lian et al. 2019), ενώ για άλλους ως proteoglycan binding-like επικράτεια (McDonald et al. 2013; Murugan et al. 2011; Dolmatov et al. 2021), στην οποία σε κάθε περίπτωση προκαλεί την αμινοξική αλλαγή Ser26Gly. Αξίζει να σημειωθεί ότι η InterPro την κατηγοριοποιεί στα περισσότερα σημεία ως PGBD ή PGBD-like, αλλά την αναφέρει και ως peptidoglycan binding-like domain (Blum et al. 2021).

Η επικράτεια αυτή, ως peptidoglycan binding-like επικράτεια, δεν είναι γνωστό τι ακριβώς λειτουργικότητες έχει στις MMPs (Jiang et al. 2010). Η PGBD βρίσκεται συχνά σε ένζυμα που εμπλέκονται στην αποικοδόμηση του βακτηριακού κυτταρικού τοιχώματος (Lian et al. 2019), και μια εικασία που



αποτυπώνεται στην μελέτη των Jiang et al. το 2010, η οποία αφορά την MMP13 του γατόψαρου *Ictalurus punctatus*, θέλει τις MMPs να προσδένονται σε πεπτιδογλυκάνες μέσω της PGBD-like επικράτειας τους, και να προχωρούν έτσι σε αποικοδόμηση του κυτταρικού τοιχώματος, σε καταστάσεις μόλυνσης. Παρόλα αυτά, μελέτες στην γαρίδα *Litopenaeus vannamei* και το καβούρι *Eriocheir sinensis* (Jiang et al. 2022) έχουν δείξει ότι η καταστολή των MMPs οι οποίες περιέχουν PGBD-like, αύξησε την πιθανότητα επιβίωσης ξενιστών που είχαν προσβληθεί από παθογόνα, χωρίς να διαλευκάνουν ωστόσο τον μηχανισμό λειτουργίας τους. Όσον αφορά πιθανή επίδραση της επικράτειας υπό αυτή την ονομασία στην πρωτεολυτική δραστηριότητα των MMPs δεν βρέθηκε κάποιο στοιχείο στην βιβλιογραφία.

Ως proteoglycan binding-like επικράτεια των MMPs, ερμηνεία η οποία φαίνεται πιο λογική, βάση της λειτουργίας των MMPs, η επικράτεια αυτή φαίνεται να προσδένεται σε μόρια πρωτεογλυκανών (Murugan et al. 2011), οι οποίες αποτελούν μεγάλης σημασίας συστατικό του συνδετικού ιστού του εξωκυττάριου πλέγματος, και να προχωρά έτσι στην αποικοδόμηση των πρωτεογλυκανών (Dolmatov et al. 2021), καθώς και να συμμετέχει έμμεσα στην ρύθμιση της συγκέντρωσης μορίων όπως οι χημειοκίνες (Parks et al. 2004). Μια άλλη μελέτη συμπεραίνει ότι η αλληλεπίδραση μιας προ-MMP με πρωτεογλυκάνες συμμετέχει στην ενεργοποίηση της, πιθανώς μεταφέροντας την κοντά σε κάποιον μεμβρανικό ενεργοποιητή της (Hadler-Olsen et al. 2011).

Πολλές διαφορετικές πρωτεογλυκάνες φαίνονται να προσδένονται στο κολλαγόνο, και να ρυθμίζουν ποικιλοτρόπως την δημιουργία και την αποικοδόμηση των ινιδίων κολλαγόνου, όπως αναλύεται από τους Moorehead et al. το 2019. Με αυτά τα δεδομένα, είναι πιθανό η επικράτεια πρόσδεσης πρωτεογλυκανών να συμβάλλει στην ρύθμιση της ενεργοποίησης της MMP, ή να καθοδηγεί την MMP στην προσέγγιση του κολλαγόνου μέσω πρόσδεσης της με συνδεδεμένες στο κολλαγόνο πρωτεογλυκάνες, και έτσι να υποβοηθά στην πρωτεόλυση του κολλαγόνου.

## 5.6 Συμπεράσματα και μελλοντικές προοπτικές

Ξεκινώντας από τις μελέτες έκφρασης, ένα σημαντικό εύρημα της παρούσας διπλωματικής εργασίας αποτελεί η μεγάλης στατιστικής σημαντικότητας ( $p=0,00086$ ) διαφορά έκφρασης της *CAPN15b* στην συνθήκη κοντρόλ των δυο εταιρειών, καθώς και η σημαντική διαφορά στην έκφραση της *MMP13a* ανάμεσα στην συνθήκη κοντρόλ της P και την συνθήκη S50 ( $p=0,034$ ). Αξίζει μελλοντικά να επιβεβαιωθεί

και να μελετηθεί περαιτέρω η αιτιολόγηση πίσω από την τόσο μεγάλη διαφορά ανάμεσα στα δυο κοντρόλ..

Ενδιαφέρον εύρημα αποτελεί επίσης και η σημαντική επικράτηση του ενός από τα δυο αλληλόμορφα στα 4 από τα 5 SNPs που μελετήθηκαν, και ο ρόλος που η γενετική ποικιλομορφία των γεννητόρων μιας υδατοκαλλιέργειας μπορεί να έχει στην ποικιλομορφία ολοκλήρου του πληθυσμού, υποδεικνύοντας και την σημασία της, με γενετικά κριτήρια, επιλογής των γεννητόρων.

Απαντώντας στο βασικό ερώτημα που τέθηκε σε αυτήν την μελέτη, ο πολυμορφισμός SNP\_4 της *MMP13a* φαίνεται να είναι ο μόνος που επηρεάζει σημαντικά την δραστικότητα του ενζύμου, ανάλογα με τον γονότυπο του. Κάτι τέτοιο δεν φάνηκε από τα δικά μας αποτελέσματα και για τα υπόλοιπα SNPs στο συγκεκριμένο γονίδιο, ούτε για το μοναδικό SNP της *CAPN15b*, ωστόσο είναι απαραίτητο να μελετηθούν περαιτέρω και σε μεγαλύτερους πληθυσμούς για να επιβεβαιωθεί το αποτέλεσμα αυτό, όπως και να συσχετιστούν τα δεδομένα αυτά με δεδομένα ιστολογικής παρατήρησης. Επίσης περαιτέρω μελέτης χρίζει και η διαλεύκανση του τρόπου κληρονόμησης του γονιδίου της *MMP13a*, ο οποίος όπως αναφέρθηκε δεν ήταν πλήρως ξεκάθαρος με βάση τα δικά μας δεδομένα, ενώ περαιτέρω βιοχημικές μελέτες είναι απαραίτητες και για την εξακρίβωση της ακριβούς λειτουργίας της PGBD των MMPs.

## 6. Βιβλιογραφία

1. Aguinis, H., Gottfredson, R. K., & Joo, H. (2013). Best-Practice Recommendations for Defining, Identifying, and Handling Outliers. *Organizational Research Methods*, 16(2), 270–301. <https://doi.org/10.1177/1094428112470848>
2. Ahmed, Z., Donkor, O., Street, W. A., & Vasiljevic, T. (2015). Calpains- and cathepsins-induced myofibrillar changes in post-mortem fish: Impact on structural softening and release of bioactive peptides. *Trends in Food Science & Technology*, 45(1), 130–146. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.04.002>
3. Benjakul, S., Veessanguan, W., & Leelapongwattana, K. (2002). CHARACTERISTICS OF MUSCLE FROM TWO SPECIES OF BIGEYE SNAPPER, *PRIACANTHUS TAYENUS* AND *PRIACANTHUS MACRACANTHUS*. *Journal of Food Biochemistry*, 26(4), 307–326. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4514.2002.tb00756.x>
4. Blum, M., Chang, H.-Y., Chuguransky, S., Grego, T., Kandasaamy, S., Mitchell, A., Nuka, G., Paysan-Lafosse, T., Qureshi, M., Raj, S., Richardson, L., Salazar, G. A., Williams, L., Bork, P., Bridge, A., Gough, J., Haft, D. H., Letunic, I., Marchler-Bauer, A., ... Finn, R. D. (2021). The InterPro protein families and domains database: 20 years on. *Nucleic Acids Research*, 49(D1), D344–D354. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa977>
5. Bolger, A. M., Lohse, M., & Usadel, B. (2014). Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30(15), 2114–2120. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>
6. Cabral-Pacheco, G. A., Garza-Veloz, I., Castruita-De la Rosa, C., Ramirez-Acuña, J. M., Perez-Romero, B. A., Guerrero-Rodriguez, J. F., Martinez-Avila, N., & Martinez-Fierro, M. L. (2020). The Roles of Matrix Metalloproteinases and Their Inhibitors in Human Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(24), 9739. <https://doi.org/10.3390/ijms21249739>
7. Cheret, R., Delbarre-Ladrat, C., Lamballerieanton, M., & Verrezbagnis, V. (2007). Calpain and cathepsin activities in post mortem fish and meat muscles. *Food Chemistry*, 101(4), 1474–1479. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.04.023>
8. Čikoš, Š., Bukovská, A., & Koppel, J. (2007). Relative quantification of mRNA: Comparison of methods currently used for real-time PCR data analysis. *BMC Molecular Biology*, 8(1), 113. <https://doi.org/10.1186/1471-2199-8-113>
9. Cordell, H. J., & Clayton, D. G. (2005). Genetic Epidemiology 3 Genetic association studies. 366, 11.

9. Cui, N., Hu, M., & Khalil, R. A. (2017). Biochemical and Biological Attributes of Matrix Metalloproteinases. *Progress in Molecular Biology and Translational Science* (147, 1–73). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2017.02.005>
10. Cunningham, F., Allen, J. E., Allen, J., Alvarez-Jarreta, J., Amode, M. R., Armean, I. M., Austine-Orimoloye, O., Azov, A. G., Barnes, I., Bennett, R., Berry, A., Bhai, J., Bignell, A., Billis, K., Boddu, S., Brooks, L., Charkhchi, M., Cummins, C., Da Rin Fioretto, L., ... Flicek, P. (2022). Ensembl 2022. *Nucleic Acids Research*, 50(D1), D988–D995. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab1049>
11. Danecek, P., Auton, A., Abecasis, G., Albers, C. A., Banks, E., DePristo, M. A., Handsaker, R. E., Lunter, G., Marth, G. T., Sherry, S. T., McVean, G., Durbin, R., & 1000 Genomes Project Analysis Group. (2011). The variant call format and VCFtools. *Bioinformatics*, 27(15), 2156–2158. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr330>
12. Delbarre-Ladrat, C., Chéret, R., Taylor, R., & Verrez-Bagnis, V. (2006). Trends in Postmortem Aging in Fish: Understanding of Proteolysis and Disorganization of the Myofibrillar Structure. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 46(5), 409–421. <https://doi.org/10.1080/10408390591000929>
13. Delbarre-Ladrat, C., Verrez-Bagnis, V., Noël, J., & Fleurence, J. (2004 (1)). Proteolytic potential in white muscle of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) during post mortem storage on ice: Time-dependent changes in the activity of the components of the calpain system. *Food Chemistry*, 84(3), 441–446. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(03\)00266-8](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(03)00266-8)
14. Delbarre-Ladrat, C., Verrez-Bagnis, V., Noël, J., & Fleurence, J. (2004 (2)). Relative contribution of calpain and cathepsins to protein degradation in muscle of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Food Chemistry*, 88(3), 389–395. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.01.053>
15. Devauchelle, N., & Coves, D. (1988). Sea bass (*Dicentrarchus labrax*) reproduction in captivity: Gametogenesis and spawning. *Aquatic Living Resources*, 1(4), 215–222. <https://doi.org/10.1051/alr:1988021>
16. Dolmatov, I. Yu., Nizhnichenko, V. A., & Dolmatova, L. S. (2021). Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases in Echinoderms: Structure and Possible Functions. *Cells*, 10(9), 2331. <https://doi.org/10.3390/cells10092331>
17. E. Laing, R., Hess, P., Shen, Y., Wang, J., & X. Hu, S. (2011). The Role and Impact of SNPs in Pharmacogenomics and Personalized Medicine. *Current Drug Metabolism*, 12(5), 460–486. <https://doi.org/10.2174/138920011795495268>

18. Emadi, E., Akhoundi, F., Kalantar, S. M., & Emadi-Baygi, M. (2020). Predicting the most deleterious missense nsSNPs of the protein isoforms of the human HLA-G gene and in silico evaluation of their structural and functional consequences. *BMC Genetics*, 21(1), 94. <https://doi.org/10.1186/s12863-020-00890-y>
19. Farah, C. S., & Reinach, F. C. (1995). The troponin complex and regulation of muscle contraction. *The FASEB Journal*, 9(9), 755–767. <https://doi.org/10.1096/fasebj.9.9.7601340>
20. Fernandez, J., Toro, M. Á., Sonesson, A. K., & Villanueva, B. (2014). Optimizing the creation of base populations for aquaculture breeding programs using phenotypic and genomic data and its consequences on genetic progress. *Frontiers in Genetics*, 5. <https://doi.org/10.3389/fgene.2014.00414>
21. Garrison, E., & Marth, G. (2012). Haplotype-based variant detection from short-read sequencing (arXiv:1207.3907). arXiv. <http://arxiv.org/abs/1207.3907>
22. Goll, D. E., Neti, G., Mares, S. W., & Thompson, V. F. (2008). Myofibrillar protein turnover: The proteasome and the calpains1,2. *Journal of Animal Science*, 86(suppl\_14), E19–E35. <https://doi.org/10.2527/jas.2007-0395>
23. Goll, D. E., Thompson, V. F., Li, H., Wei, W., & Cong, J. (2003). The Calpain System. *Physiological Reviews*, 83(3), 731–801. <https://doi.org/10.1152/physrev.00029.2002>
24. González, A., & Piferrer, F. (2003). Aromatase activity in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) brain. Distribution and changes in relation to age, sex, and the annual reproductive cycle. *General and Comparative Endocrinology*, 132(2), 223–230. [https://doi.org/10.1016/S0016-6480\(03\)00086-8](https://doi.org/10.1016/S0016-6480(03)00086-8)
25. Gutierrez, A. P., Yáñez, J. M., Fukui, S., Swift, B., & Davidson, W. S. (2015). Genome-Wide Association Study (GWAS) for Growth Rate and Age at Sexual Maturation in Atlantic Salmon (*Salmo salar*). *PLOS ONE*, 10(3), e0119730. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119730>
26. Hadler-Olsen, E., Fadnes, B., Sylte, I., Uhlin-Hansen, L., & Winberg, J.-O. (2011). Regulation of matrix metalloproteinase activity in health and disease: Regulation of MMP activity. *FEBS Journal*, 278(1), 28–45. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2010.07920.x>
27. Hamby, S. E., Thomas, N. S., Cooper, D. N., & Chuzhanova, N. (2011). A meta-analysis of single base-pair substitutions in translational termination codons (“nonstop” mutations) that cause human inherited disease. *Human Genomics*, 5(4), 241. <https://doi.org/10.1186/1479-7364-5-4-241>

28. He, Y., Huang, H., Li, L., & Yang, X. (2018). Changes of activated factors and activation of calpain in tilapia muscle during storage. *Fisheries Science*, 84(5), 889–895. <https://doi.org/10.1007/s12562-018-1221-6>
29. Homaei, A., Lavajoo, F., & Sariri, R. (2016). Development of marine biotechnology as a resource for novel proteases and their role in modern biotechnology. *International Journal of Biological Macromolecules*, 88, 542–552. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.04.023>
30. Horowitz, R., Kempner, E., Bisher, M., & Podolsky, R. (1986). A physiological role for titin and nebulin in skeletal muscle. *Nature*, 323(6084), 160–164. <https://doi.org/10.1038/323160a0>
31. Hultmann, L., Phu, T. M., Tobiassen, T., Aas-Hansen, Ø., & Rustad, T. (2012). Effects of pre-slaughter stress on proteolytic enzyme activities and muscle quality of farmed Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Food Chemistry*, 134(3), 1399–1408. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.03.038>
32. Hunt, R., Sauna, Z. E., Ambudkar, S. V., Gottesman, M. M., & Kimchi-Sarfaty, C. (2009). Silent (Synonymous) SNPs: Should We Care About Them? In Komar, Single Nucleotide Polymorphisms (Vol. 578, pp. 23–39). Humana Press. [https://doi.org/10.1007/978-1-60327-411-1\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-60327-411-1_2)
33. Jia, Z., Hosfield, C. M., Davies, P. L., & Elce, J. S. (2002). Crystal Structure of Calpain and Insights into Ca<sup>2+</sup>-Dependent Activation. In H. J. Vogel, Calcium-Binding Protein Protocols (Vol. 172, pp. 051–067). Humana Press. <https://doi.org/10.1385/1-59259-183-3:051>
34. Jiang, J., Gao, S., Chen, Z., Guan, X., Zhang, F., Li, L., Zhao, Z., Zhao, L., Xiao, Y., Dong, Y., & Zhou, Z. (2022). *Apostichopus japonicus* matrix metalloproteinase-16 might act as a pattern recognition receptor. *Fish & Shellfish Immunology*, 121, 135–141. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2022.01.004>
35. Jiang, Y., Abernathy, J. W., Peatman, E., Liu, H., Wang, S., Xu, D.-H., Kucuktas, H., Klesius, P., & Liu, Z. (2010). Identification and characterization of matrix metalloproteinase-13 sequence structure and expression during embryogenesis and infection in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Developmental & Comparative Immunology*, 34(5), 590–597. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2010.01.001>
36. Jingyu Li, Jie Zeng, Xin Su, Limin Xiao, & Xibin Xu. (2013). System-Level Simulation Platform for Broadband Wireless Access Systems. 2013 4th International Conference on Intelligent Systems, Modelling and Simulation, 445–450. <https://doi.org/10.1109/ISMS.2013.43>

37. Kauffeld, M., Wang, M. J., Goldstein, V., & Kasza, K. E. (2010). Ice slurry applications. *International Journal of Refrigeration*, 33(8), 1491–1505. <https://doi.org/10.1016/j.ijrefrig.2010.07.018>
38. Kim, S., Cho, H., Lee, D., & Webster, M. J. (2012). Association between SNPs and gene expression in multiple regions of the human brain. *Translational Psychiatry*, 2(5), e113–e113. <https://doi.org/10.1038/tp.2012.42>
39. Kottelat, Maurice.; Freyhof, Jörg. *Handbook of European freshwater fishes* [2007]
40. Ladrat, C., Chaplet, M., Verrez-Bagnis, V., Noël, J., & Fleurence, J. (2000). Neutral calcium-activated proteases from European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) muscle: Polymorphism and biochemical studies. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 125(1), 83–95. [https://doi.org/10.1016/S0305-0491\(99\)00157-1](https://doi.org/10.1016/S0305-0491(99)00157-1)
41. Lee, M.-H., & Murphy, G. (2004). Matrix metalloproteinases at a glance. *Journal of Cell Science*, 117(18), 4015–4016. <https://doi.org/10.1242/jcs.01223>
42. Li, H. (2014). Towards Better Understanding of Artifacts in Variant Calling from High-Coverage Samples. 8.
43. Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N., Marth, G., Abecasis, G., Durbin, R., & 1000 Genome Project Data Processing Subgroup. (2009). The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics*, 25(16), 2078–2079. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp352>
44. Li, N., Zhou, T., ... Li, Q., & Liu, Z. (2018). Identification of novel genes significantly affecting growth in catfish through GWAS analysis. *Molecular Genetics and Genomics*, 293(3), 587–599. <https://doi.org/10.1007/s00438-017-1406-1>
45. Lian, Y.-Y., He, H.-H., Zhang, C.-Z., Li, X., & Chen, Y.-H. (2019). Functional characterization of a matrix metalloproteinase 2 gene in *Litopenaeus vannamei*. *Fish & Shellfish Immunology*, 84, 404–413. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.10.021>
46. Lines, J. A., & Spence, J. (2014). Humane harvesting and slaughter of farmed fish: -EN- Humane harvesting and slaughter of farmed fish -FR- Le respect du bien-être des poissons lors des prises et des opérations d’abattage -ES- Recolección y sacrificio incruentos de peces de cultivo. *Revue Scientifique et Technique de l’OIE*, 33(1), 255–264. <https://doi.org/10.20506/rst.33.1.2284>
47. Losada, V., Barros-Velázquez, J., & Aubourg, S. P. (2007). Rancidity development in frozen pelagic fish: Influence of slurry ice as preliminary chilling treatment. *LWT - Food Science and Technology*, 40(6), 991–999. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2006.05.011>

48. Manolio, T. A. (2010). Genome wide Association Studies and Assessment of the Risk of Disease. *New England Journal of Medicine*, 363(2), 166–176. <https://doi.org/10.1056/NEJMra0905980>
49. McDonald, T. M., Sumner, A. J., Reyes, J. F., Pascual, A. S., Uppalapati, C. K., Cooper, K. E., Leyva, K. J., & Hull, E. E. (2013). Matrix metalloproteinases and collective cell migration in 24 h primary zebrafish explant cultures: MMP13 plays an inhibitory role and MMP14 may respond to stretch during reepithelialisation: MMPs in primary explant collective cell migration. *Cell Biology International Reports*, 20(2), 24–36. <https://doi.org/10.1002/cbi3.10006>
50. Medina, I., Gallardo, J. M., & Aubourg, S. P. (2009). Quality preservation in chilled and frozen fish products by employment of slurry ice and natural antioxidants. *International Journal of Food Science & Technology*, 44(8), 1467–1479. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2009.02016.x>
51. Mitchell, A. L., Attwood, T. K., Babbitt, P. C., Blum, M., Bork, P., Bridge, A., Brown, S. D., Chang, H.-Y., El-Gebali, S., Fraser, M. I., Gough, J., Haft, D. R., Huang, H., Letunic, I., Lopez, R., Luciani, A., Madeira, F., Marchler-Bauer, A., Mi, H., ... Finn, R. D. (2019). InterPro in 2019: Improving coverage, classification, and access to protein sequence annotations. *Nucleic Acids Research*, 47(D1), D351–D360. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1100>
52. Mitter, K., Kotoulas, G., Magoulas, A., Mulero, V., Sepulcre, P., Figueras, A., Novoa, B., & Sarropoulou, E. (2009). Evaluation of candidate reference genes for QPCR during ontogenesis and of immune-relevant tissues of European seabass (*Dicentrarchus labrax*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 153(4), 340–347. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2009.04.009>
53. Moorehead, C., Prudnikova, K., & Marcolongo, M. (2019). The regulatory effects of proteoglycans on collagen fibrillogenesis and morphology investigated using biomimetic proteoglycans. *Journal of Structural Biology*, 206(2), 204–215. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2019.03.005>
54. Mullins, V. A., Bresette, W., Johnstone, L., Hallmark, B., & Chilton, F. H. (2020). Genomics in Personalized Nutrition: Can You “Eat for Your Genes”? *Nutrients*, 12(10), 3118. <https://doi.org/10.3390/nu12103118>
55. Murugan, A. K., Dong, J., Xie, J., & Xing, M. (2011). Uncommon GNAQ, MMP8, AKT3, EGFR, and PIK3R1 Mutations in Thyroid Cancers. *Endocrine Pathology*, 22(2), 97–102. <https://doi.org/10.1007/s12022-011-9155-x>
56. NCBI Assembly 2014: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCA\\_000689215.1](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCA_000689215.1)



57. NCBI Assembly 2021: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCA\\_905237075.1](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCA_905237075.1)
58. Ohno, S., Muramoto, J., Christian, L., & Atkin, N. B. (1967). Diploid-tetraploid relationship among old-world members of the fish family Cyprinidae. *Chromosoma*, 23(1), 1–9. <https://doi.org/10.1007/BF00293307>
59. Ono, Y., & Sorimachi, H. (2012). Calpains—An elaborate proteolytic system. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1824(1), 224–236. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2011.08.005>
60. Opinion of the Scientific Panel on Animal Health and Welfare (AHAW) on a request from the Commission related to welfare aspects of the main systems of stunning and killing the main commercial species of animals. (2004). *EFSA Journal*, *EFSA Journal*. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2004.45>
61. Osmond, A. T. Y., & Colombo, S. M. (2019). The future of genetic engineering to provide essential dietary nutrients and improve growth performance in aquaculture: Advantages and challenges. *Journal of the World Aquaculture Society*, 50(3), 490–509. <https://doi.org/10.1111/jwas.12595>
62. Pandurangan, M., & Hwang, I. (2012). The role of calpain in skeletal muscle. *Animal Cells and Systems*, 16(6), 431–437. <https://doi.org/10.1080/19768354.2012.724708>
63. Parks, W. C., Wilson, C. L., & López-Boado, Y. S. (2004). Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity. *Nature Reviews Immunology*, 4(8), 617–629. <https://doi.org/10.1038/nri1418>
64. Patruno, M., Sivieri, S., Poltronieri, C., Sacchetto, R., Maccatrozzo, L., Martinello, T., Funkenstein, B., & Radaelli, G. (2008). Real-time polymerase chain reaction, in situ hybridization and immunohistochemical localization of insulin-like growth factor-I and myostatin during development of *Dicentrarchus labrax* (Pisces: Osteichthyes). *Cell and Tissue Research*, 331(3), 643–658. <https://doi.org/10.1007/s00441-007-0517-0>
65. Paulin, D., & Li, Z. (2004). Desmin: A major intermediate filament protein essential for the structural integrity and function of muscle. *Experimental Cell Research*, 301(1), 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2004.08.004>
66. Pearson, T. A. (2008). How to Interpret a Genome-wide Association Study. *JAMA*, 299(11), 1335. <https://doi.org/10.1001/jama.299.11.1335>
67. Pedersen, M. E., Vuong, T. T., Rønning, S. B., & Kolset, S. O. (2015). Matrix metalloproteinases in fish biology and matrix turnover. *Matrix Biology*, 44–46, 86–93.

68. Peñaloza, C., Manousaki, T., Franch, R., Tsakogiannis, A., Sonesson, A. K., Aslam, M. L., Allal, F., Bargelloni, L., Houston, R. D., & Tsigenopoulos, C. S. (2021). Development and testing of a combined species SNP array for the European seabass (*Dicentrarchus labrax*) and gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Genomics*, 113(4), 2096–2107. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2021.04.038>
69. Poli, B. M., Parisi, G., Scappini, F., & Zampacavallo, G. (2005). Fish welfare and quality as affected by pre-slaughter and slaughter management. *Aquaculture International*, 13(1–2), 29–49. <https://doi.org/10.1007/s10499-004-9035-1>
70. Pornrat, S., Sumate, T., Rommanee, S., Sumolaya, K., & Kerr, W. L. (2007). Changes in the ultrastructure and texture of prawn muscle (*Macrobrachium rosenbergii*) during cold storage. *LWT - Food Science and Technology*, 40(10), 1747–1754. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2007.01.006>
71. Robert, F., & Pelletier, J. (2018). Exploring the Impact of Single-Nucleotide Polymorphisms on Translation. *Frontiers in Genetics*, 9, 507. <https://doi.org/10.3389/fgene.2018.00507>
72. Sharma, S., Upadhyaya, H. D., Varshney, R. K., & Gowda, C. L. L. (2013). Pre-breeding for diversification of primary gene pool and genetic enhancement of grain legumes. *Frontiers in Plant Science*, 4. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00309>
73. Shastri, B. S. (2009). SNPs: Impact on Gene Function and Phenotype. *Single Nucleotide Polymorphisms* (v. 578, pp. 3–22). Humana Press. [https://doi.org/10.1007/978-1-60327-411-1\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-60327-411-1_1)
74. Shen, J., Jiang, Q., Zhang, W., Xu, Y., & Xia, W. (2022). Assessment of gelatinolytic proteinases in chilled grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) fillets: Characterization and contribution to texture softening. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 102(5), 1919–1926. <https://doi.org/10.1002/jsfa.11529>
75. Sherwood, L., 2016. Εισαγωγή στην φυσιολογία του ανθρώπου, Από τα κύτταρα στα συστήματα. Ακαδημαϊκές Εκδόσεις Ι. Μπάσδρα, 2016
76. Singh, A., & Benjakul, S. (2018). Proteolysis and Its Control Using Protease Inhibitors in Fish and Fish Products: A Review: Proteolysis-control in fish/fish product.... *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 17(2), 496–509. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12337>
77. Sjöblom, B., Salmazo, A., & Djinić-Carugo, K. (2008).  $\alpha$ -Actinin structure and regulation. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65(17), 2688–2701. <https://doi.org/10.1007/s00018-008-8080-8>

78. Sole, X., Guino, E., Valls, J., Iniesta, R., & Moreno, V. (2006). SNPStats: A web tool for the analysis of association studies. *Bioinformatics*, 22(15), 1928–1929. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btl268>
79. Sriket, C. (2014). Proteases in fish and shellfish: Role on muscle softening and prevention. *International Food Research Journal*, 21(2), 433–445.
80. Sriket, C., Benjakul, S., & Visessanguan, W. (2010). Post-mortem changes of muscle from fresh water prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) as influenced by spawning stages. *LWT - Food Science and Technology*, 43(4), 608–616. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2009.10.010>
81. Tine, M., Kuhl, H., Gagnaire, P.-A., Louro, B., Desmarais, E., Martins, R. S. T., Hecht, J., Knaust, F., Belkhir, K., Klages, S., Dieterich, R., Stueber, K., Piferrer, F., Guinand, B., Bierne, N., Volckaert, F. A. M., Bargelloni, L., Power, D. M., Bonhomme, F., ... Reinhardt, R. (2014). European sea bass genome and its variation provide insights into adaptation to euryhalinity and speciation. *Nature Communications*, 5(1), 5770. <https://doi.org/10.1038/ncomms6770>
82. Van De Vis, H., Kestin, S., ... Byrne, H., & Nesvadba, P. (2003). Is humane slaughter of fish possible for industry? Is humane slaughter of fish possible for industry? *Aquaculture Research*, 34(3), 211–220. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2109.2003.00804.x>
83. Vandeputte, M., Gagnaire, P. -A., & Allal, F. (2019). The European Sea bass: A key marine fish model in the wild and in aquaculture. *Animal Genetics*, 50(3), 195–206. <https://doi.org/10.1111/age.12779>
84. Vandesompele, J., Preter, K. D., Roy, N. V., & Paepe, A. D. (n.d.). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. 12.
85. Venugopal, V., & Shahidi, F. (1996). Structure and composition of fish muscle. *Food Reviews International*, 12(2), 175–197. <https://doi.org/10.1080/87559129609541074>
86. Verma, R. P., & Hansch, C. (2007). Matrix metalloproteinases (MMPs): Chemical–biological functions and (Q)SARs. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 15(6), 2223–2268. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2007.01.011>
87. Verrez-Bagnis, V., Ladrat, C., Noëlle, J., & Fleurence, J. (2002). In vitro proteolysis of myofibrillar and sarcoplasmic proteins of European sea bass ( *Dicentrarchus Labrax* L) by an endogenous m-calpain: In vitro proteolysis of fish muscle proteins by m-calpain. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82(11), 1256–1262. <https://doi.org/10.1002/jsfa.1172>
88. Wingett, S. W., & Andrews, S. (2018). FastQ Screen: A tool for multi-genome mapping and quality control. *F1000Research*, 7, 1338. <https://doi.org/10.12688/f1000research.15931.1>

89. Xie, F., Xiao, P., Chen, D., Xu, L., & Zhang, B. (2012). miRDeepFinder: A miRNA analysis tool for deep sequencing of plant small RNAs. *Plant Molecular Biology*, 80(1), 75–84. <https://doi.org/10.1007/s11103-012-9885-2>
90. Zang, J., Xu, Y., Xia, W., & Jiang, Q. (2017). The impact of desmin on texture and water-holding capacity of ice-stored grass carp ( *Ctenopharyngodon idella* ) fillet. *International Journal of Food Science & Technology*, 52(2), 464–471. <https://doi.org/10.1111/ijfs.13302>
91. Zanuy, S., Carrillo, M., Felip, A., Rodriguez, L., & Blazquez, M. (2001). Genetic, hormonal, and environmental approaches for the control of reproduction in the European sea bass *Dicentrarchus labrax* L./ 17.
92. Zenger, K. R., Khatkar, M. S., Jones, D. B., Khalilisamani, N., Jerry, D. R., & Raadsma, H. W. (2019). Genomic Selection in Aquaculture: Application, Limitations and Opportunities with Special Reference to Marine Shrimp and Pearl Oysters. *Frontiers in Genetics*, 9, 693. <https://doi.org/10.3389/fgene.2018.00693>
93. Zhang, J. (2000). Rates of Conservative and Radical Nonsynonymous Nucleotide Substitutions in Mammalian Nuclear Genes. *Journal of Molecular Evolution*, 50(1), 56–68. <https://doi.org/10.1007/s002399910007>
94. ΕΛΟΠΥ 2021: [https://fishfromgreece.com/wp-content/uploads/2021/11/HAPO\\_AR21\\_PRESS.pdf](https://fishfromgreece.com/wp-content/uploads/2021/11/HAPO_AR21_PRESS.pdf)