



BIOZ

Εργαστήριο Γενετικής, Συγκριτικής  
και Εξελκτικής Βιολογίας



Ευρωπαϊκό Ταμείο  
Θάλασσας και Αλιείας



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ



# Slurry Fish

## Η γενετική βάση της φρεσκότητας Αλληλεπίδραση με τις τεχνικές αλίευσης

*Ραφαήλ Αγγελακόπουλος, Κατερίνα Μουτου*





BIOZ

Εργαστήριο Γενετικής, Συγκριτικής  
και Εξελικτικής Βιολογίας

▷ Ραφαήλ Αγγελακόπουλος



## Ο λευκός μυς είναι το κύριο προϊόν της ιχθυοκαλλιέργειας



Ποιος είναι ο ρόλος του γενετικού υπόβαθρου στις διεργασίες στο λευκό μυ (φιλέτο) μετά την εξαλίευση?

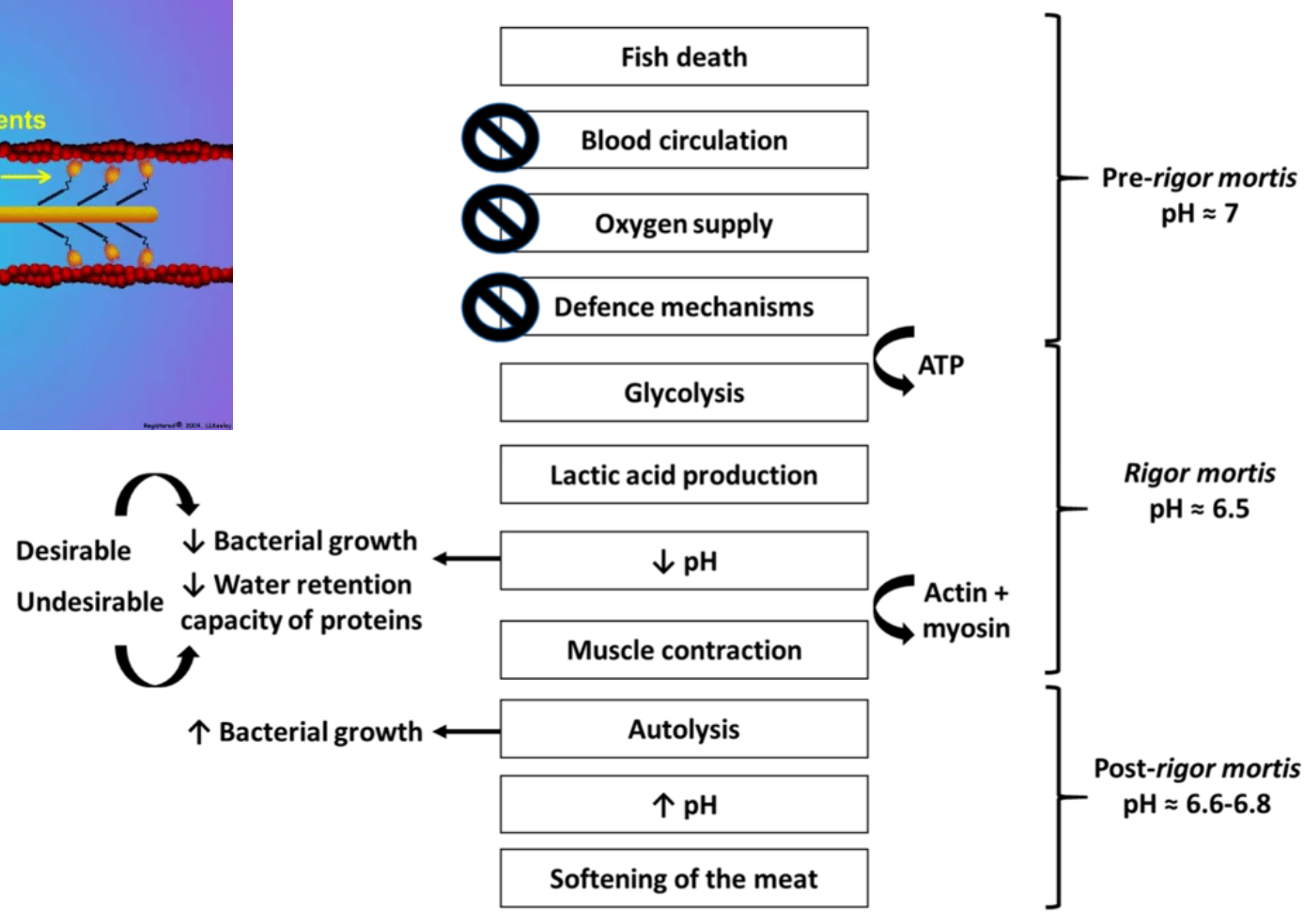
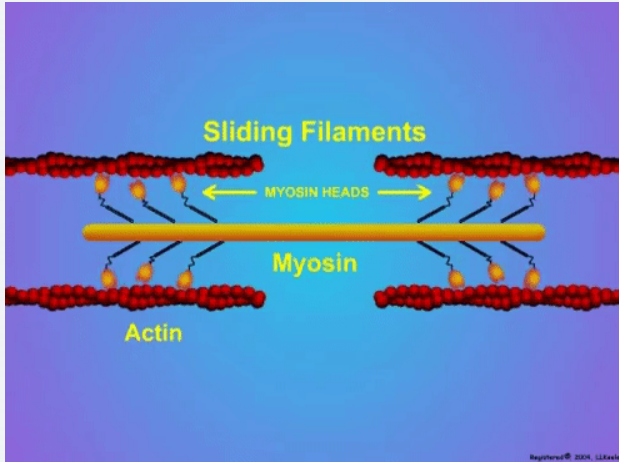


BIOZ

Εργαστήριο Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας

# Τι συμβαίνει στο φιλέτο μετά την αλίευση...

▷ Ραφαήλ Αγγελικόπουλος



- Ενδοπλασματικές καλπαίνες
- Λυσοσωμικές καθεψίνες
- Μεταλλοπρωτεάσες



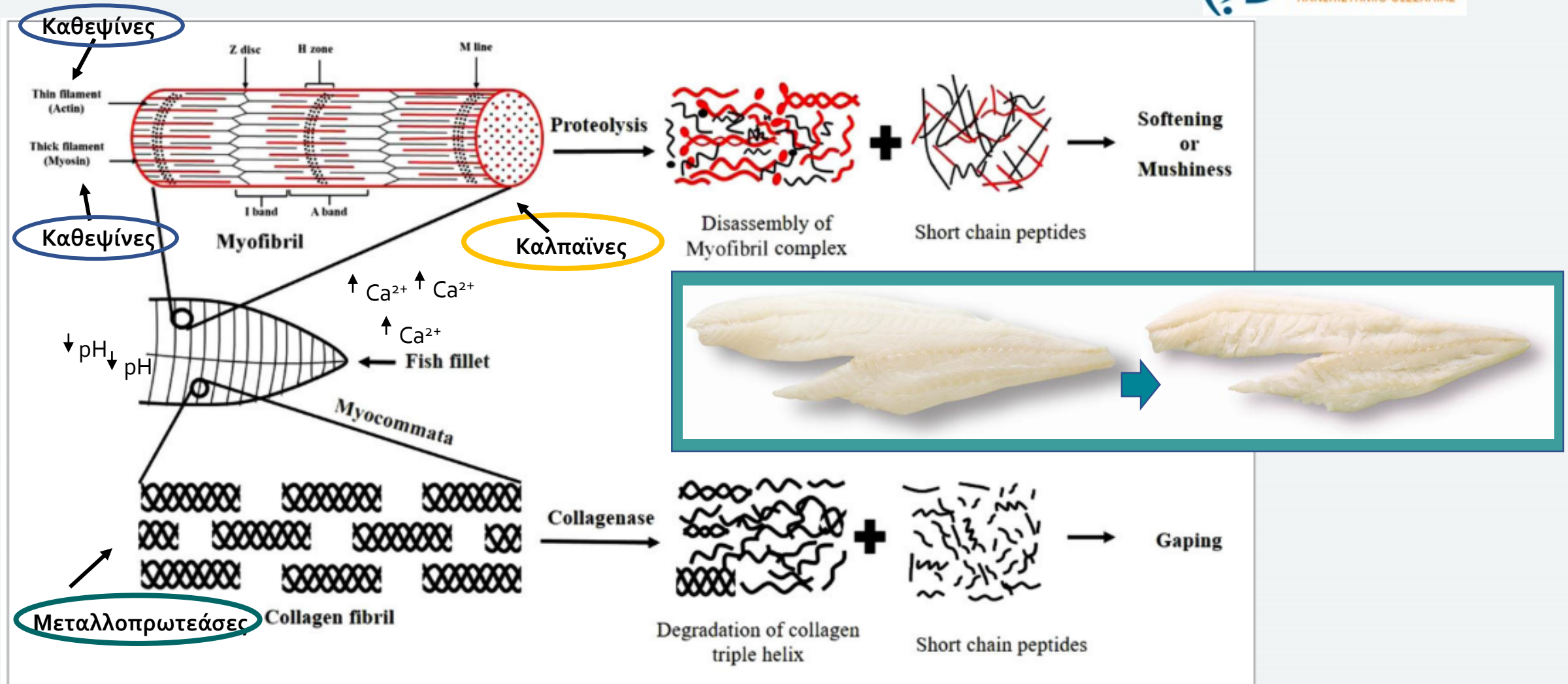


BIOZ

Εργαστήριο Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας

# Τι συμβαίνει στο φιλέτο μετά την αλίευση...

▷ Ραφαήλ Αγγελακόπουλος





BIOZ

Εργαστήριο Γενετικής, Συγκριτικής  
και Εξελικτικής Βιολογίας

## Μεθοδολογική προσέγγιση

▷ Ραφαήλ Αγγελακόπουλος



### Περίοδοι δειγματοληψίας:

1. Θερμή – Σεπτέμβρης 2020 – 27°C
2. Ψυχρή – Ιανουάριος 2021 – 13.9°C
3. Ψυχρή - Απρίλιος 2021 - 13.4°C
4. Ενδιάμεση – Ιούνιος 2021 – 20°C



C

Αλίευση με παγόνερο

S50

Αλίευση σε *Slurry ice*: *Ice flakes* 1:1

SC

Αλίευση με 100% *Slurry ice*, μεταφορά σε 100% *ice flakes*

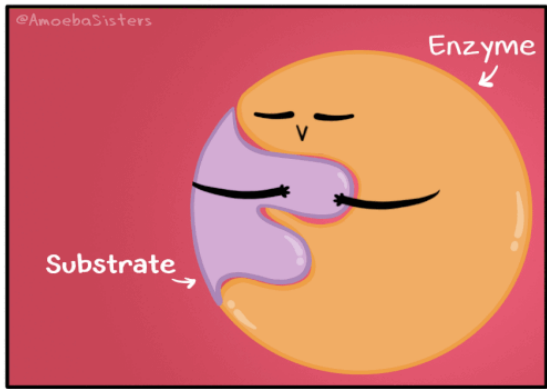


BIOZ

Εργαστήριο Γενετικής, Συγκριτικής  
και Εξελικτικής Βιολογίας

# Μεθοδολογική προσέγγιση

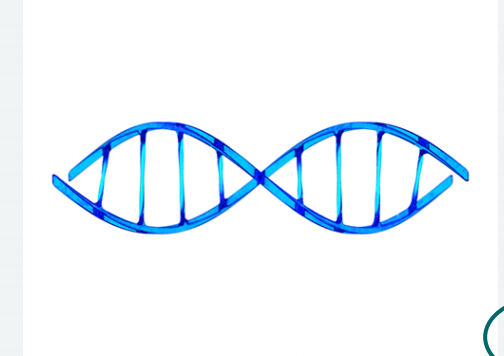
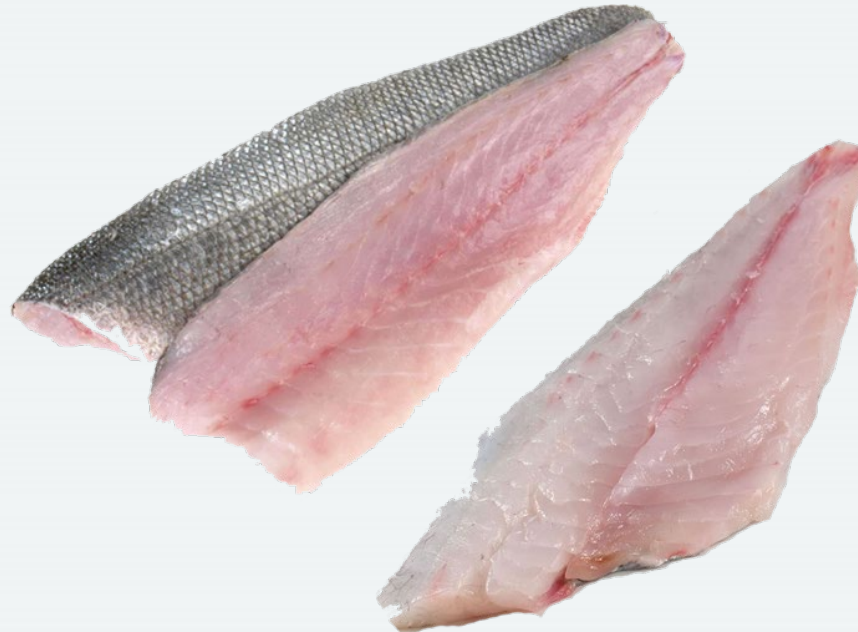
▷ Ραφαήλ Αγγελακόπουλος



It's the ultimate enzyme-substrate hug.

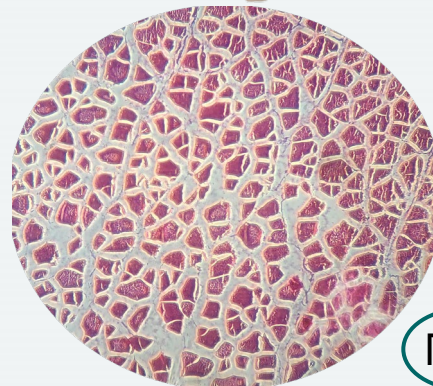
ΠΕ3

Ενζυμολογία



ΠΕ4

Γενετική



ΠΕ3

Ιστολογία



BIOZ

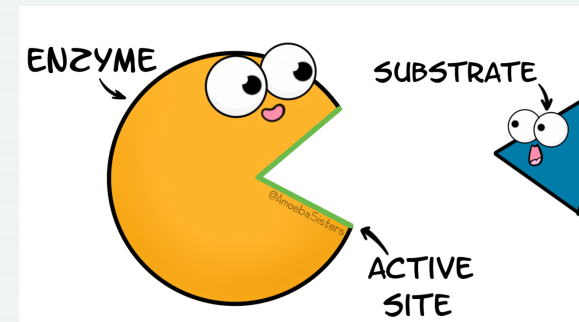
Εργαστήριο Γενετικής, Συγκριτικής  
και Εξελικτικής Βιολογίας

## Εξερευνώντας την γενετική βάση

▷ Ραφαήλ Αγγελακόπουλος



Μεγαλύτερη διάρκεια φρεσκότητας





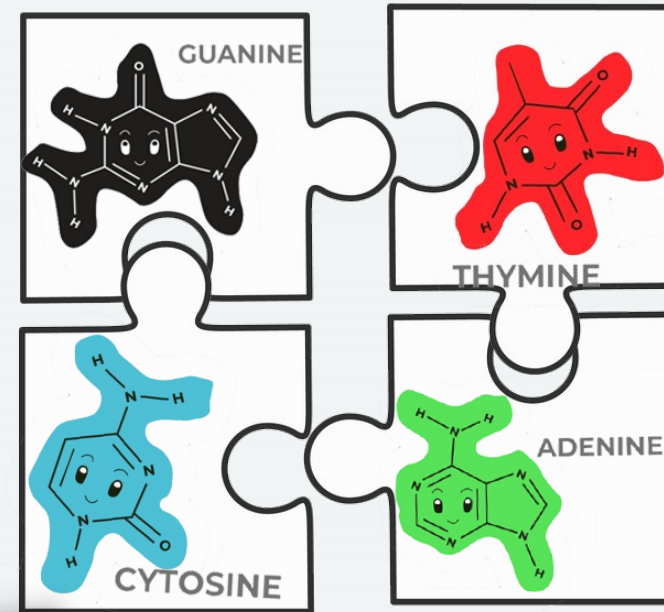
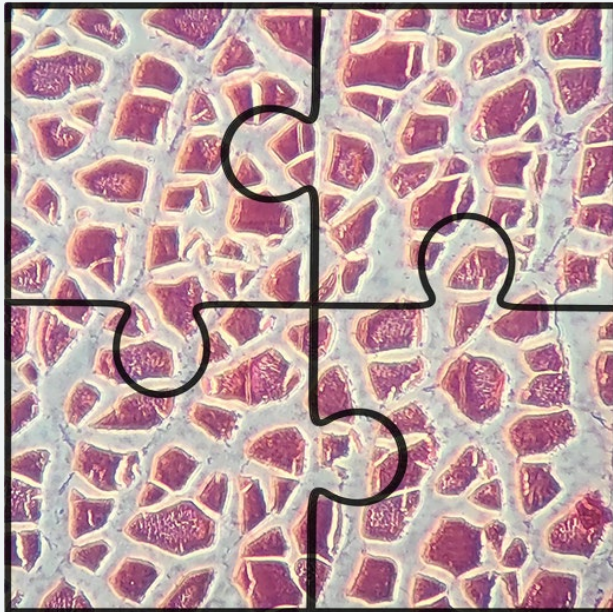


BIOZ

Εργαστήριο Γενετικής, Συγκριτικής  
και Εξελικτικής Βιολογίας

## Ή αλλιώς...

▷ Ραφαήλ Αγγελακόπουλος



Πώς θα συνδυαστούν  
οι γονότυποι και θα  
αποδοθεί στον  
φαινότυπο





BIOZ

Εργαστήριο Γενετικής, Συγκριτικής  
και Εξελικτικής Βιολογίας

▷ Ραφαήλ Αγγελακόπουλος



## Ενζυμικές αναλύσεις

Πως οι μέθοδοι εξαλίευσης και η θερμοκρασία του νερού επιδρούν στην ενεργοποίηση των ενζύμων που ευθύνονται για την μετασυλλεκτική αποικοδόμηση του φιλέτου;

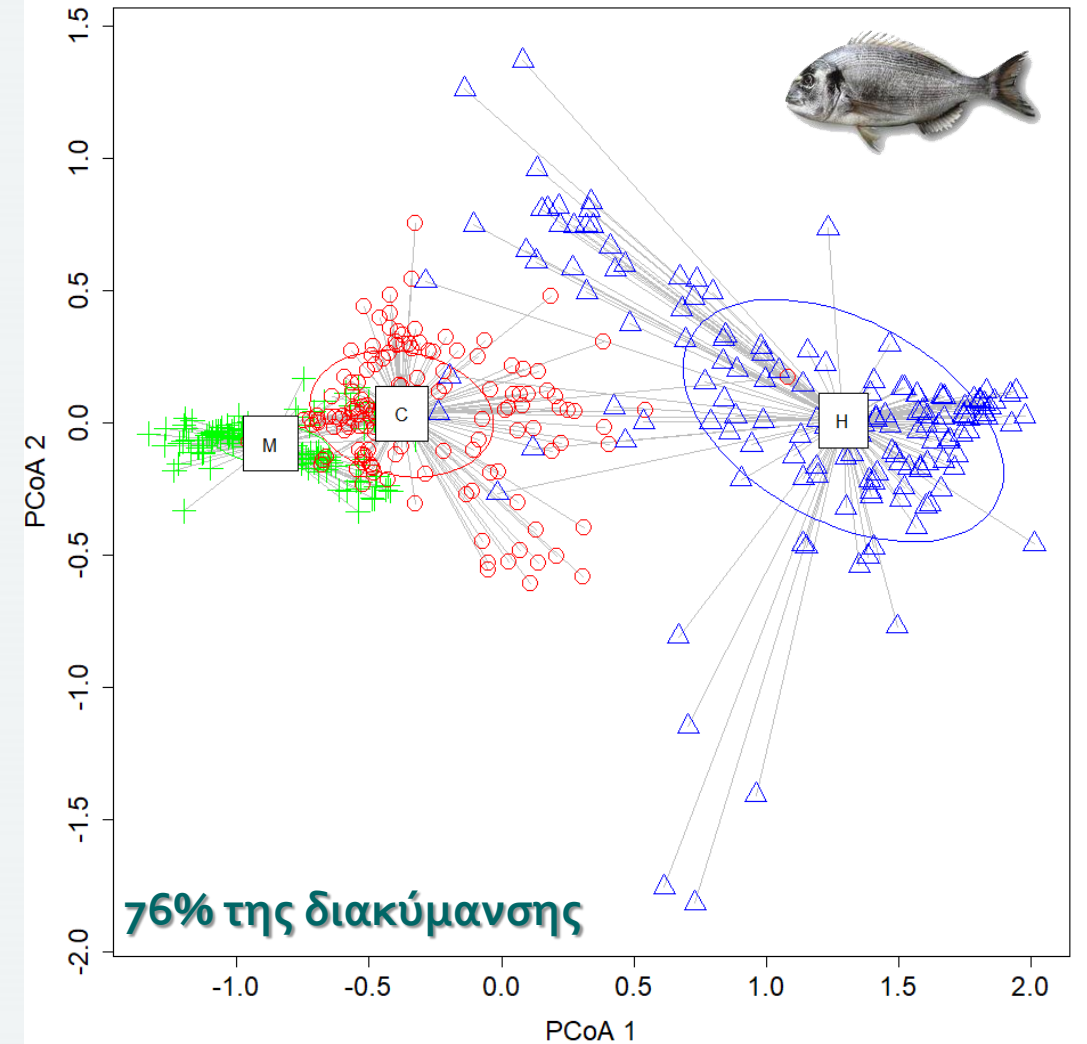
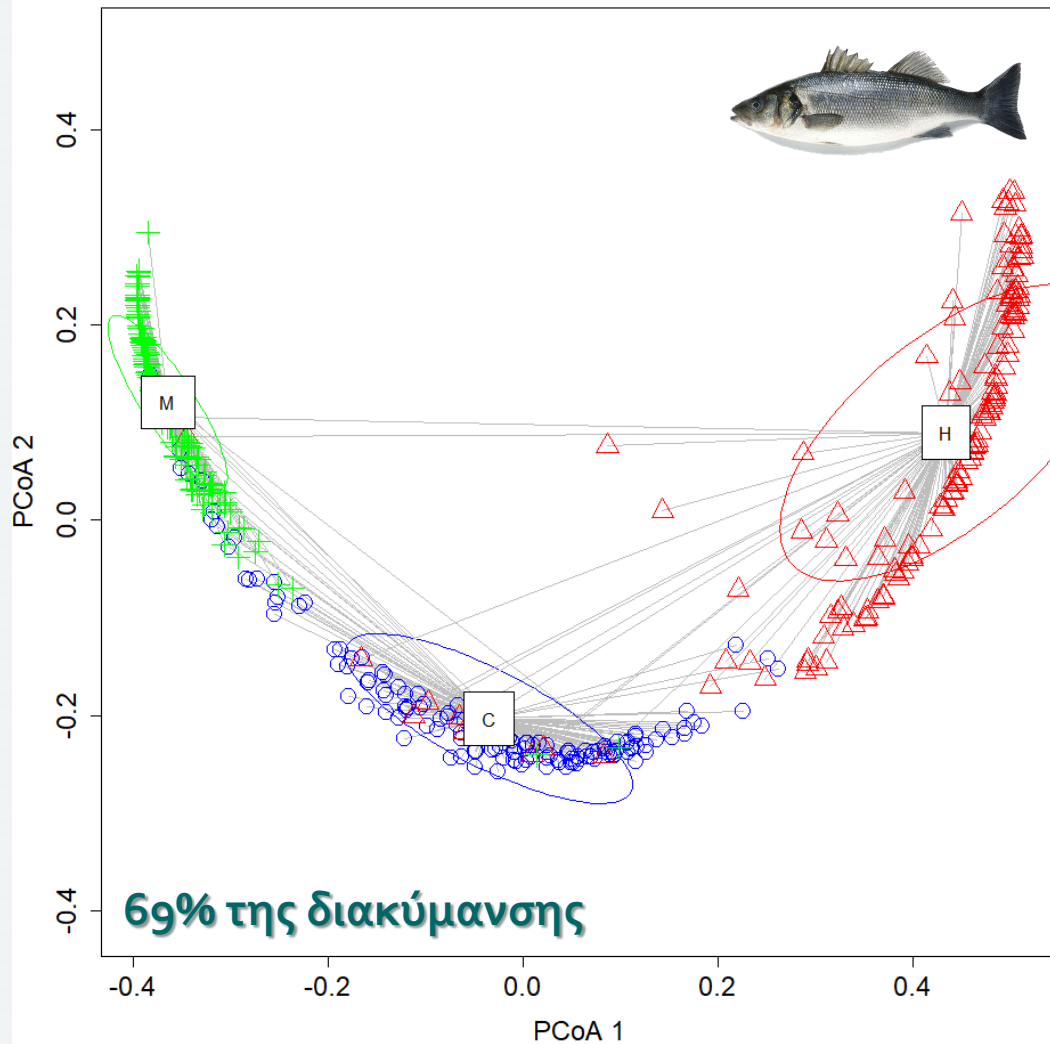


BIOZ

Εργαστήριο Γενετικής, Συστηματικής  
και Εξελικτικής Βιολογίας

## Ισχυρή επίδραση της θερμοκρασίας στη διακύμανση της δραστηριότητας και των τεσσάρων ενζύμων

▷ Ραφαήλ Αγγελικόπουλος



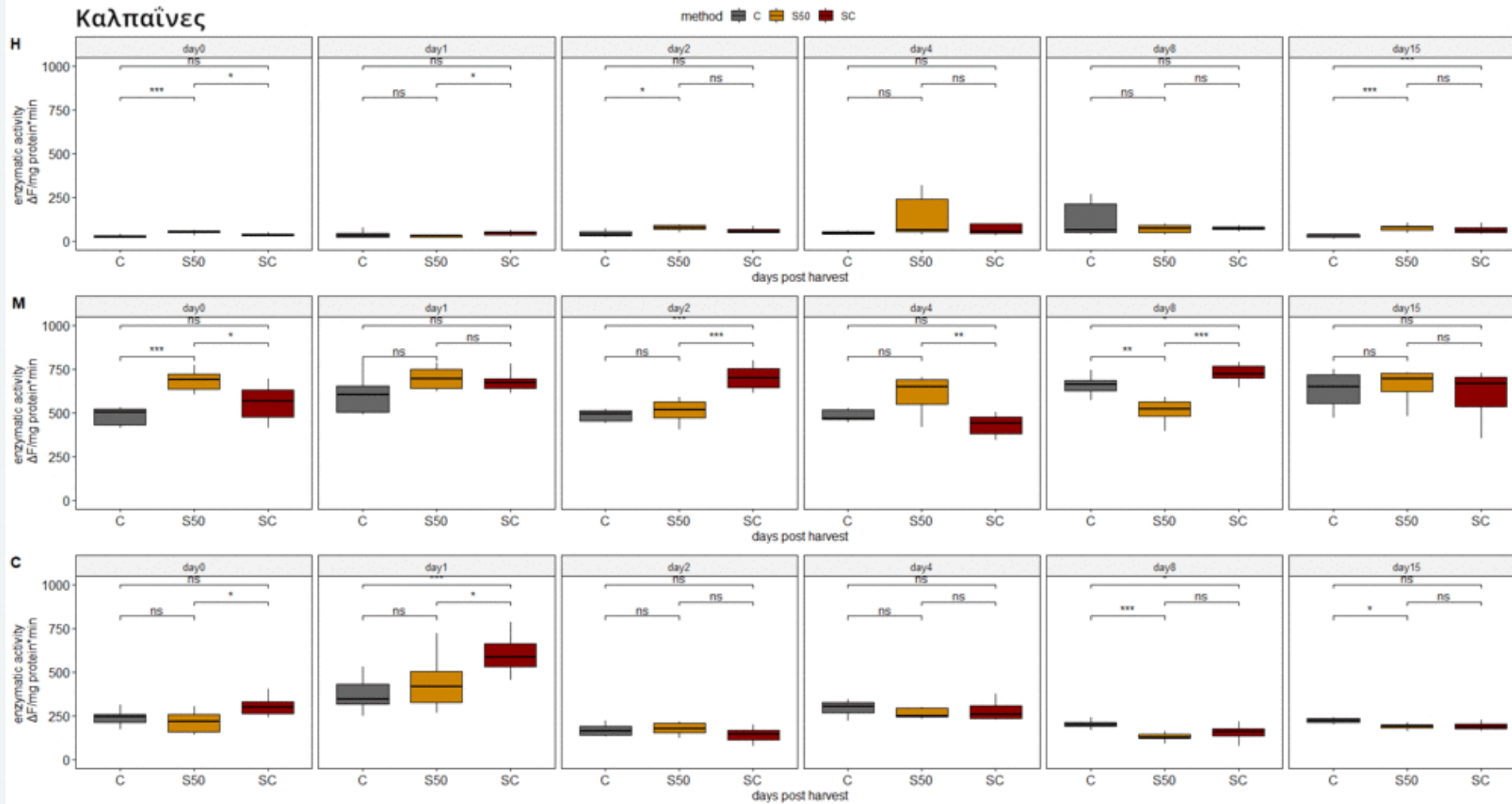


BIOZ

Εργαστήριο Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας

# Διαφορετικό μοτίβο ενεργοποίησης των ενζύμων ανά είδος και μέθοδο αλίευσης

▷ Ραφαήλ Αγγελακόπουλος



Θερμή

Ενδιάμεση

Ψυχρή



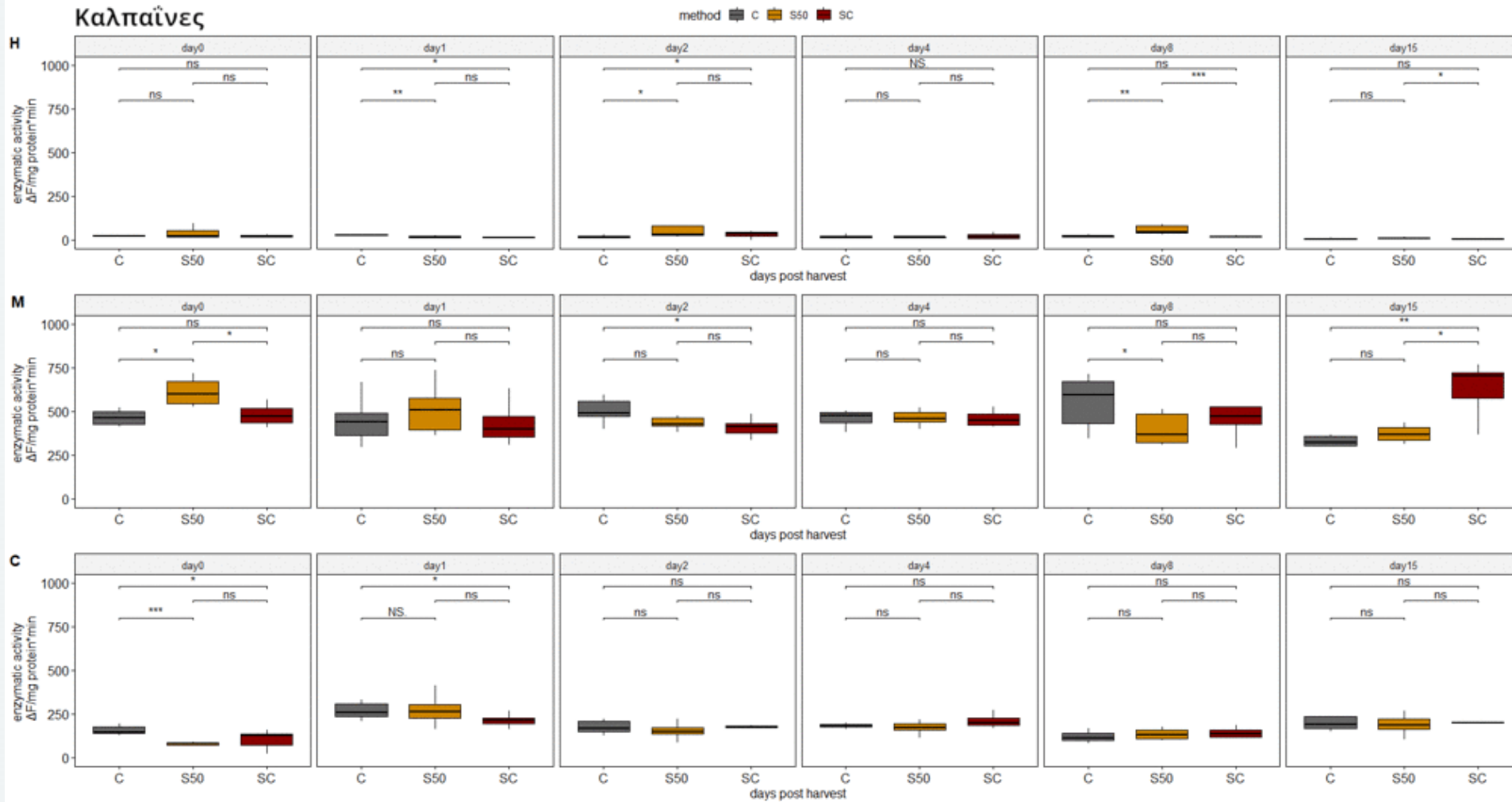


BIOZ

Εργαστήριο Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας

# Διαφορετικό μοτίβο ενεργοποίησης των ενζύμων ανά είδος και μέθοδο αλίευσης

▷ Ραφαήλ Αγγελακόπουλος



Θερμή

Ενδιάμεση

Ψυχρή

C

S50

SC







BIOZ

Εργαστήριο Γενετικής, Συγκριτικής  
και Εξελικτικής Βιολογίας

▷ Ραφαήλ Αγγελακόπουλος



## Ιστολογικές αναλύσεις

Αναφορά αλλαγών μικροδομής του λευκού μυ σε λαβράκι  
και τσιπούρα σε διάστημα 15 ημερών μετά την αλίευση

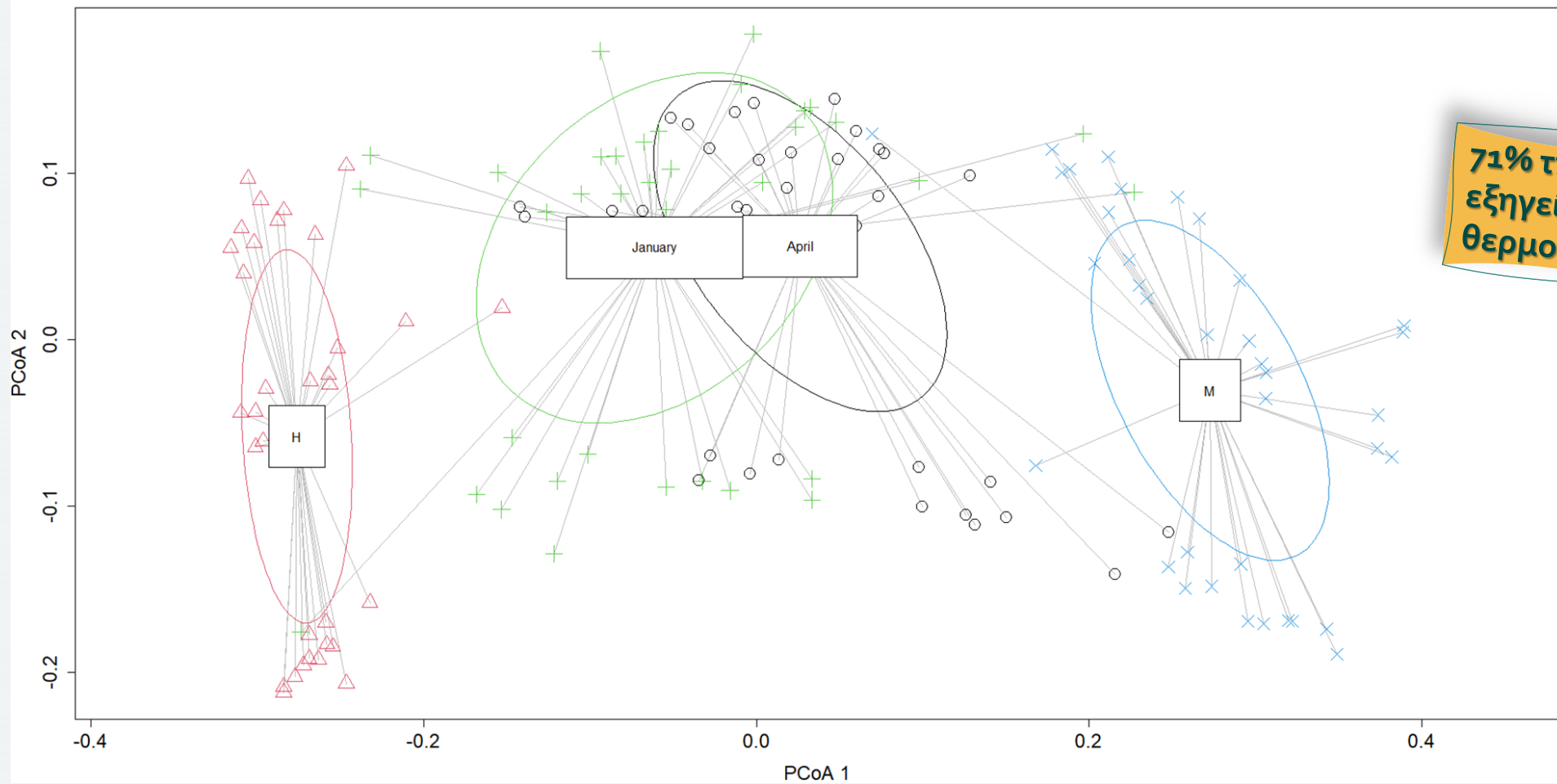


BIOZ

Εργαστήριο Γενετικής, Συγκριτικής  
και Εξελικτικής Βιολογίας

## Η επίδραση της θερμοκρασίας ήταν ισχυρή και στον ιστολογικό φαινότυπο

▷ Ραφαήλ Αγγελακόπουλος



71% της διακύμανσης  
εξηγείται από την  
θερμοκρασία

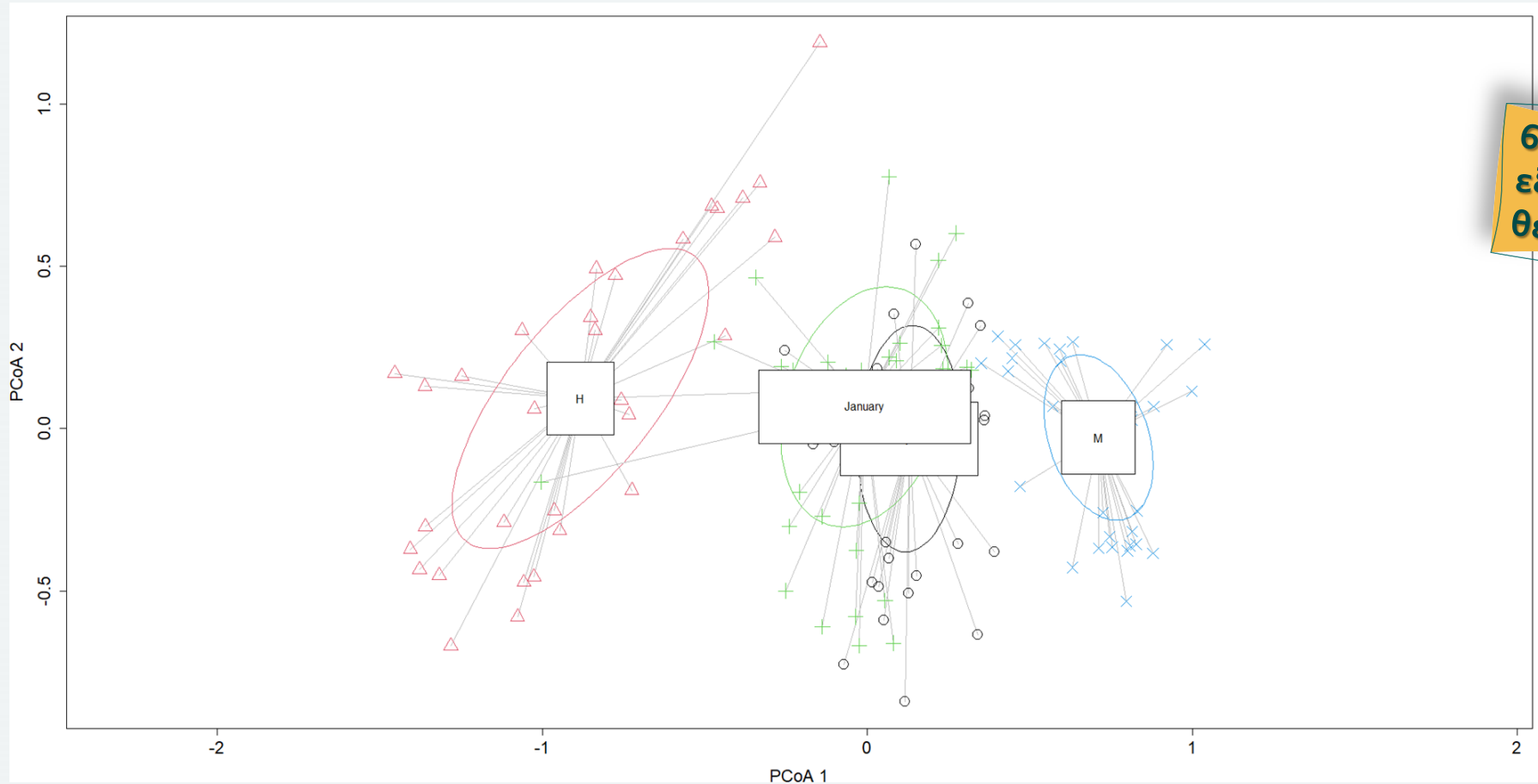


BIOZ

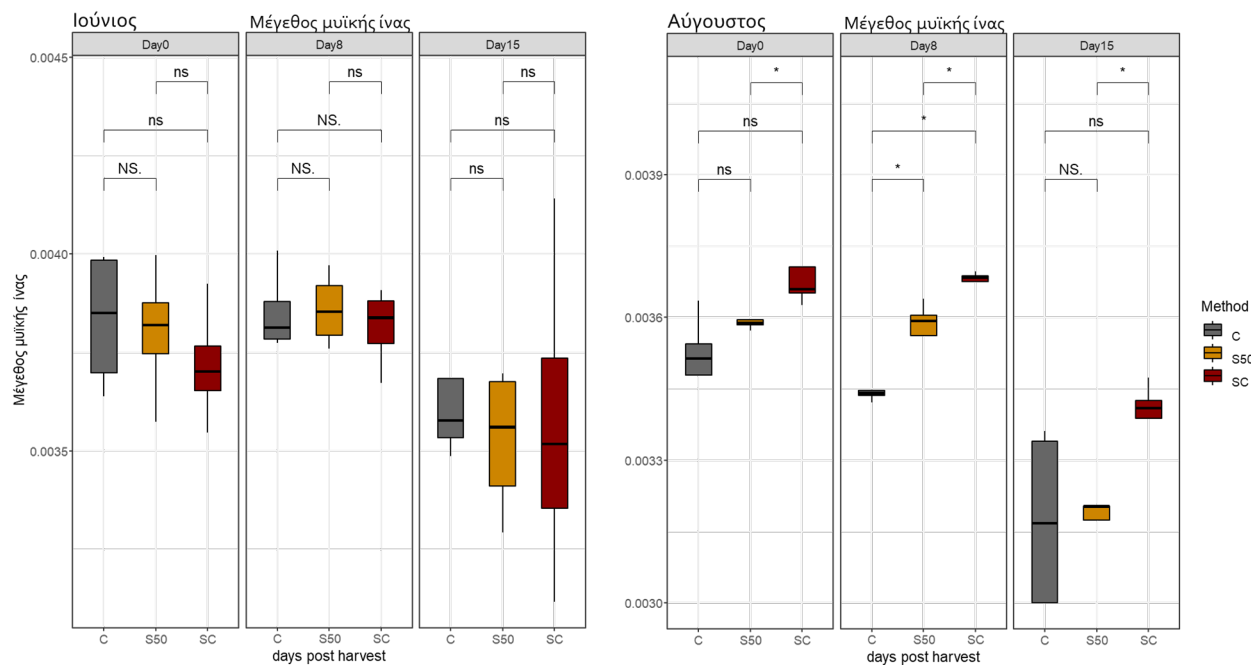
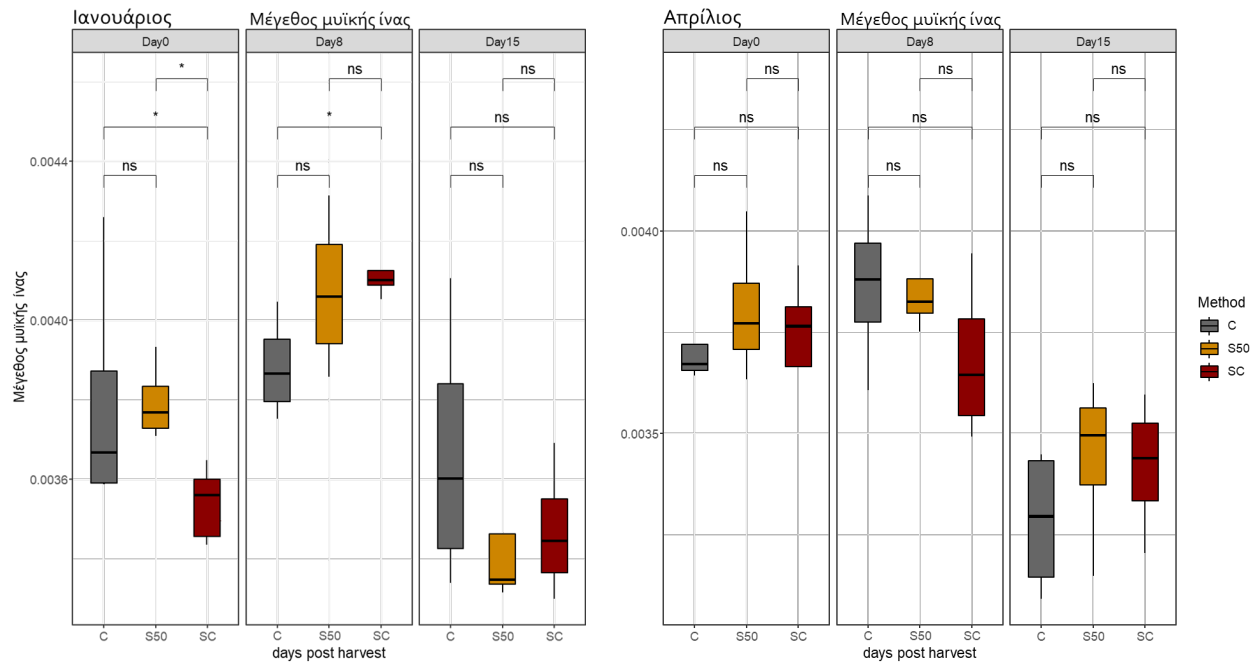
Εργαστήριο Γενετικής, Συγκριτικής  
και Εξελικτικής Βιολογίας

## Η επίδραση της θερμοκρασίας ήταν ισχυρή και στον ιστολογικό φαινότυπο

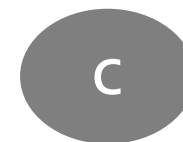
▷ Ραφαήλ Αγγελακόπουλος



64% της διακύμανσης  
εξηγείται από την  
θερμοκρασία



Ο όγκος κάθε μυϊκής ίνας παρουσίασε μια μείωση στις 15 ημέρες ανεξαρτήτου θερμοκρασίας και μεθόδου αλίευσης



**C** παγόνερο

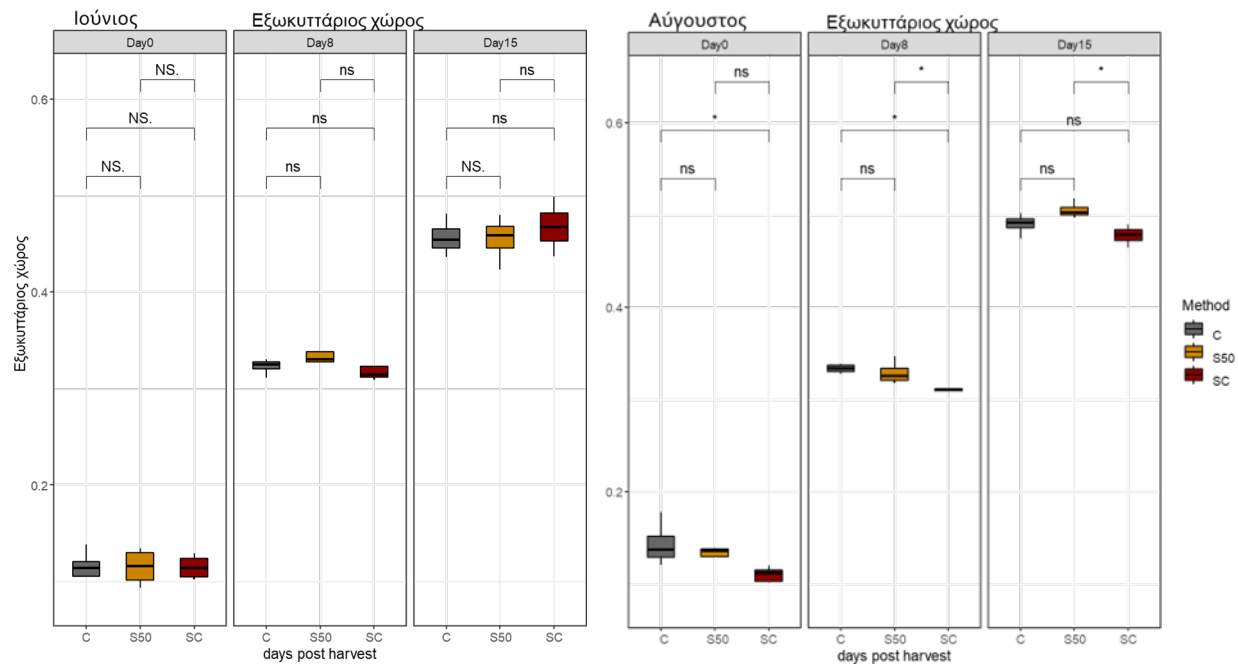
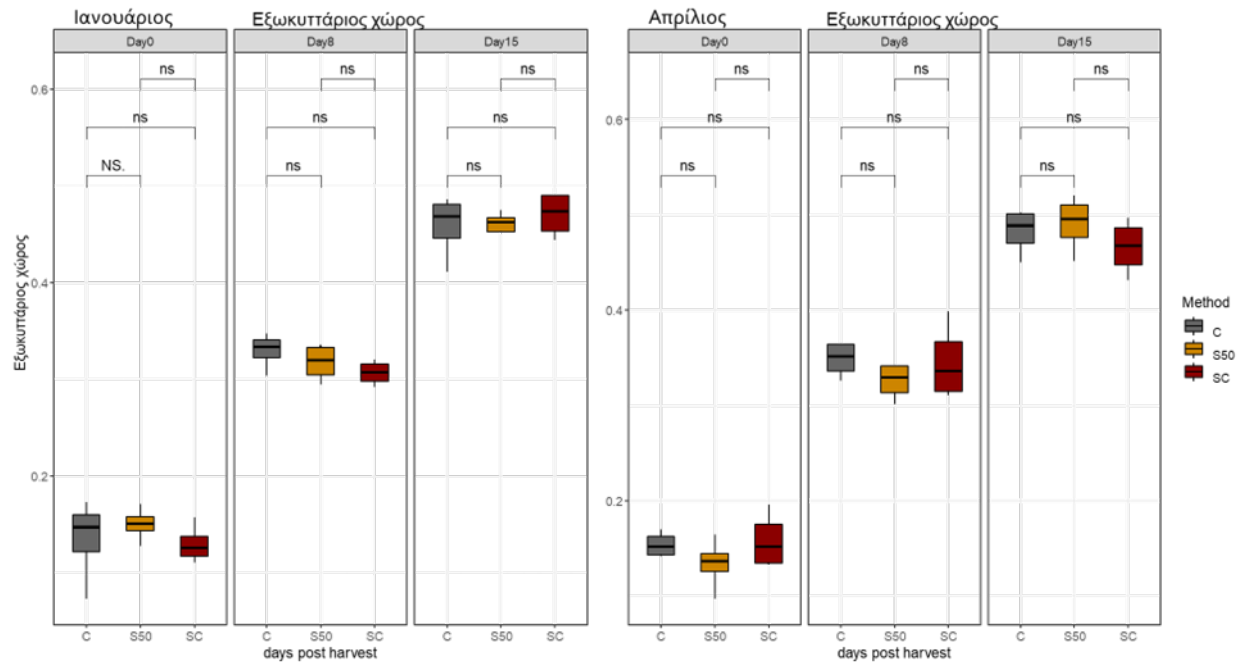


**S50** Slurry ice:Ice flakes 1:1



**SC** 100% Slurry ice και 100% ice flakes





Ο όγκος του εξωκτυτάριου χώρου αυξήθηκε με το πέρασ των ημερών ανεξαρτήτου θερμοκρασίας και μεθόδου αλίευσης



C

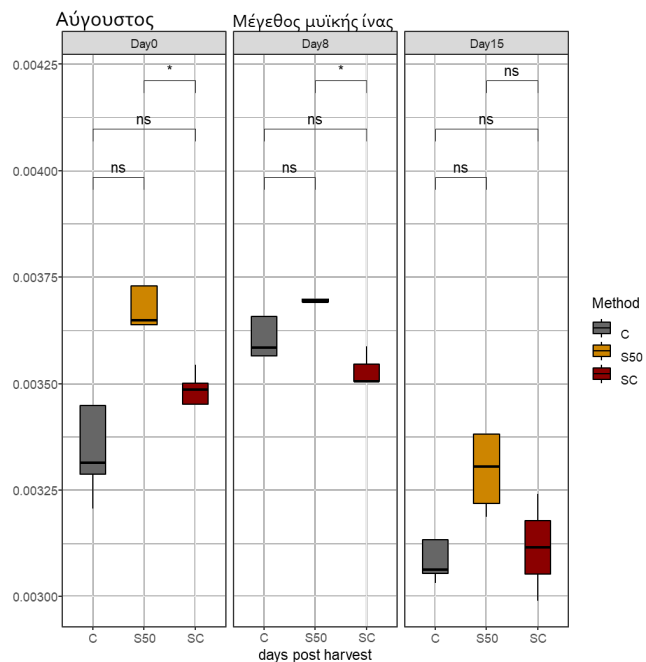
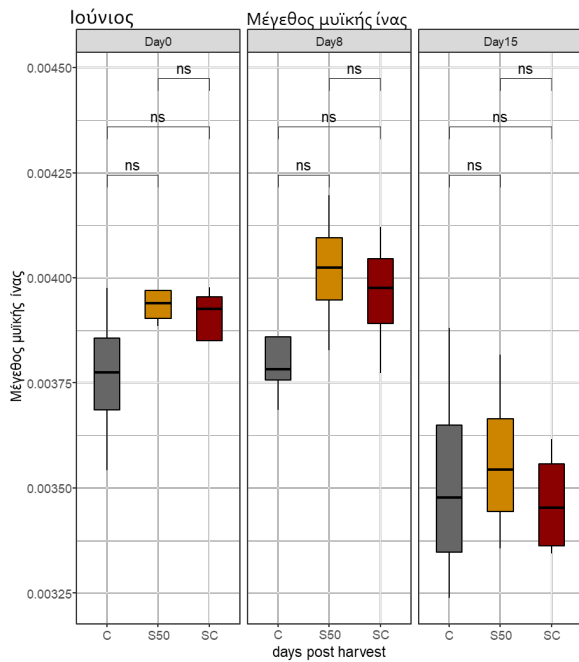
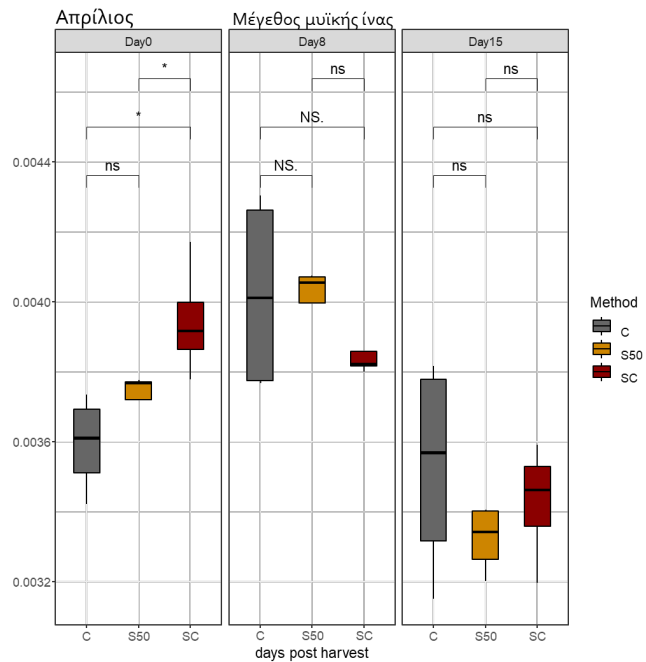
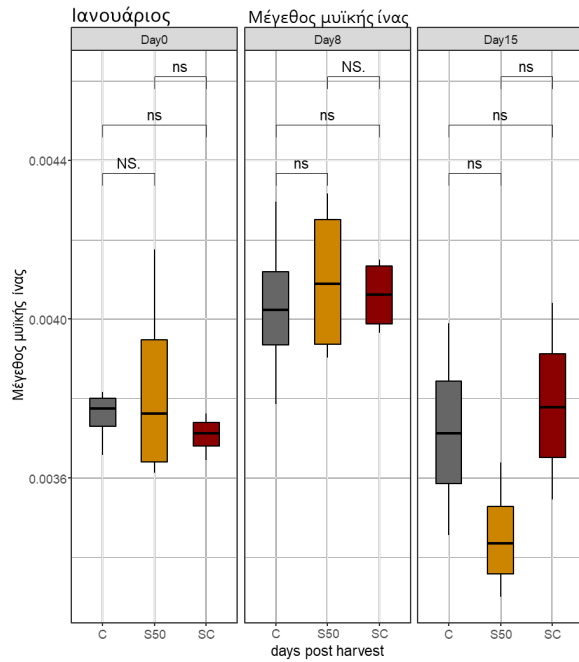
παγόνερο

S50

Slurry ice:Ice flakes 1:1

SC

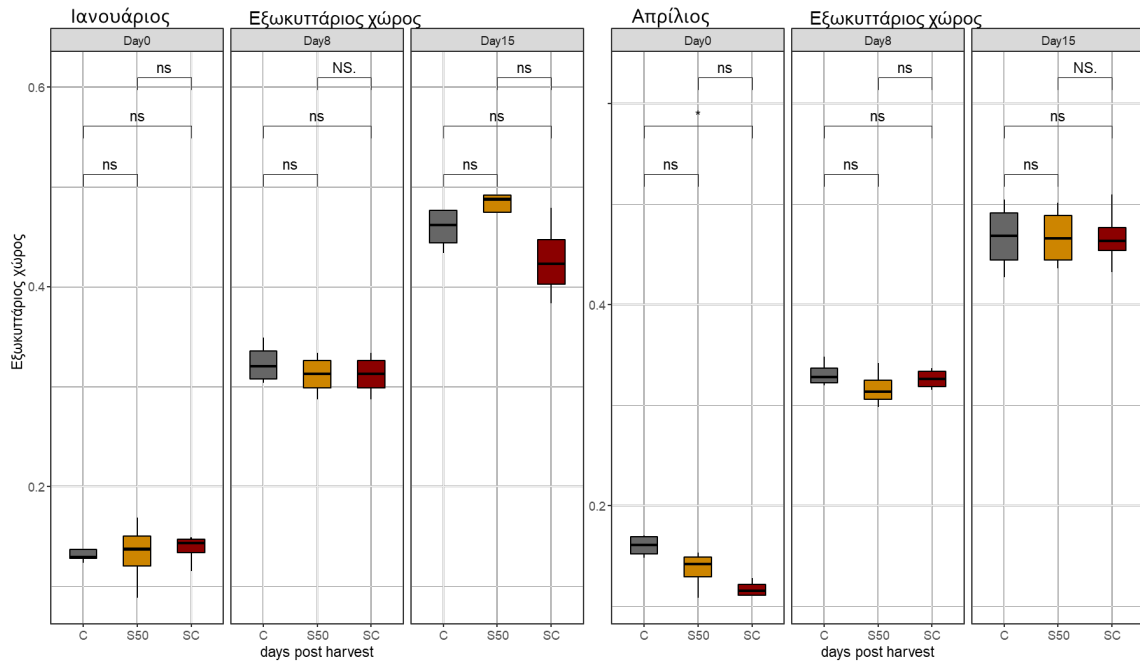
100% Slurry ice και 100% ice flakes



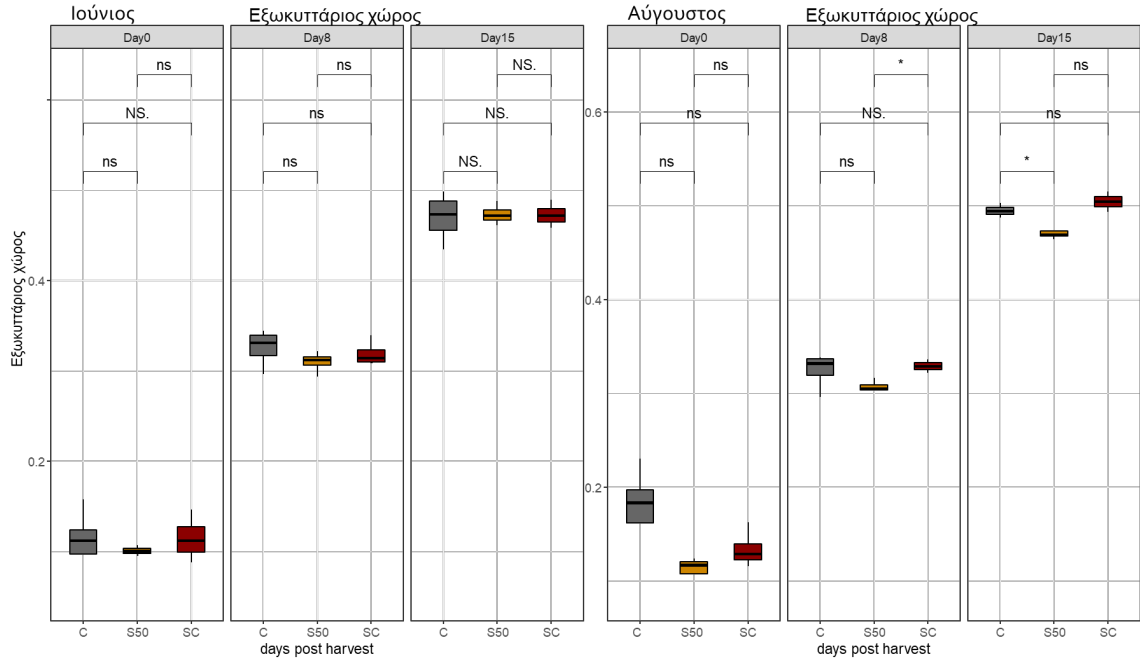
Ο όγκος κάθε μυϊκής ίνας παρουσίασε μια μείωση στις 15 ημέρες ανεξαρτήτου θερμοκρασίας και μεθόδου αλίευσης



- C** παγόνερο
- S50** Slurry ice:Ice flakes 1:1
- SC** 100% Slurry ice και 100% ice flakes



Ο όγκος του εξωκυττάριου χώρου αυξήθηκε με το πέρας των ημερών ανεξαρτήτου θερμοκρασίας και μεθόδου αλίευσης



C

παγόνερο

S50

Slurry ice:Ice flakes 1:1

SC

100% Slurry ice και 100% ice flakes



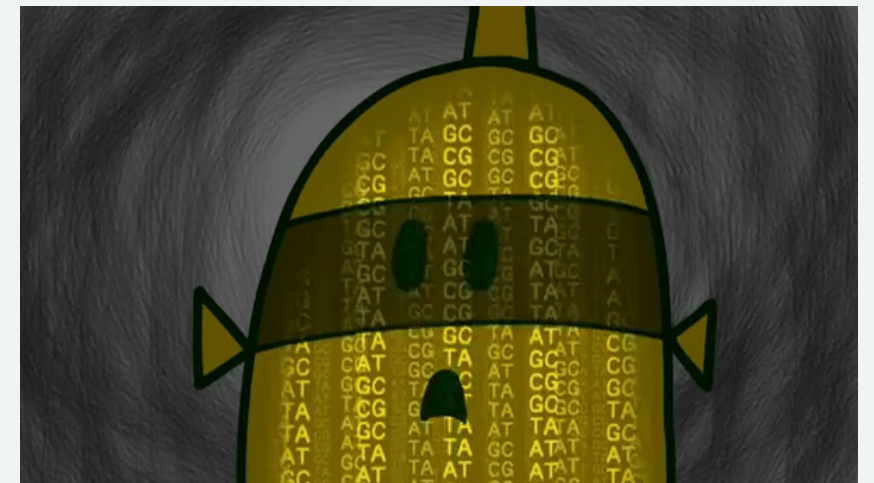
BIOZ

Εργαστήριο Γενετικής, Συγκριτικής  
και Εξελικτικής Βιολογίας

▷ Ραφαήλ Αγγελακόπουλος



Τι γενετικές παραλλαγές φέρουν τα ένζυμα που ευθύνονται για την μεταθανάτια αποικοδόμηση του φιλέτου; = Γενετικός πολυμορφισμός γονιδίων καλπαϊνών, καθεψινών και μεταλλοπρωτεασών (ΠΕ<sub>4</sub>)







BIOZ

Εργαστήριο Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας

# Αλληλούχιση ολόκληρου του γονιδιώματος

▷ Ραφαήλ Αγγελακόπουλος



αναδείχθηκαν



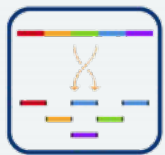
*Dicentrarchus labrax* = 5.339.547 πολυμορφισμοί



## Whole Genome Sequencing (WGS)



Genomic DNA





Tagmentation of Genomic DNA



Sequencing



Data Analysis & Report

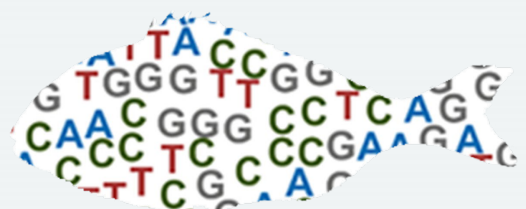
Γονίδια		
Καλπαίνες	3200/ <b>78</b>	5402/ <b>90</b>
Καθεψίνες	942/ <b>32</b>	809/ <b>22</b>
Μεταλλοπρωτεάσες	162/ <b>13</b>	590/ <b>32</b>
Σύνολο πολυμορφισμών/μη συνώνυμες μεταλλάξεις		



αναδείχθηκαν



*Sparus aurata* = 12.634.153 πολυμορφισμοί





BIOZ

Εργαστήριο Γενετικής, Συγκριτικής  
και Εξελικτικής Βιολογίας


## Επιλογή πολυμορφισμών για γονοτύπηση στον πληθυσμό

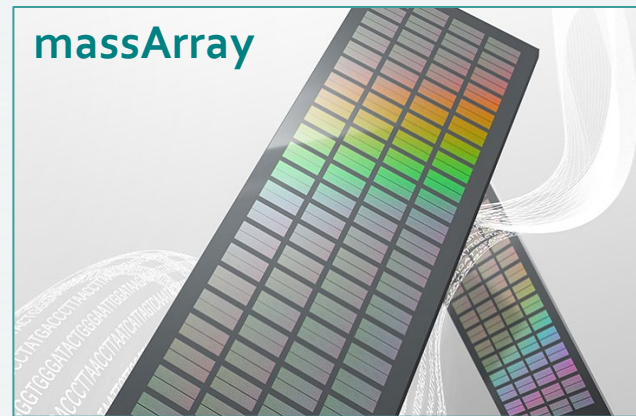
▷ Ραφαήλ Αγγελακόπουλος




Επιλέχθηκαν 44 και 57 πολυμορφισμοί με τα εξής κριτήρια:

1. Χαρτογραφούνται ως μη συνώνυμες μεταλλάξεις (Αλλάζουν την δομή της πρωτεΐνης)
2. Εμφανίζουν συμβατότητα γονοτύπησης με το σύστημα iPLEX Mass Array (ταυτόχρονη γονοτύπηση)

Γονίδια	
Καλπαΐνες	30/78
Καθεψίνες	8/32
Μεταλλοπρωτεάσες	5/13
Επιλεγμένοι πολυμορφισμοί/Σύνολο πολυμορφισμών	



Εύρεση πολυμορφισμών σε  
πληθυσμιακό επίπεδο

Γονίδια	
Καλπαΐνες	34/90
Καθεψίνες	10/22
Μεταλλοπρωτεάσες	13/32
Επιλεγμένοι πολυμορφισμοί/Σύνολο πολυμορφισμών	



BIOZ

Εργαστήριο Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας

9/44 πολυμορφισμούς εμφάνισαν σημαντική συσχέτιση με την ενζυμική δραστηριότητα



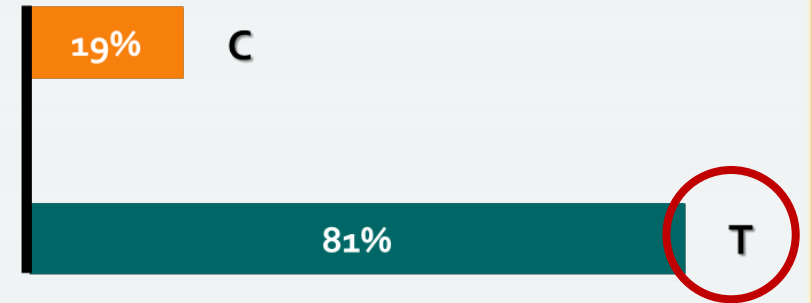
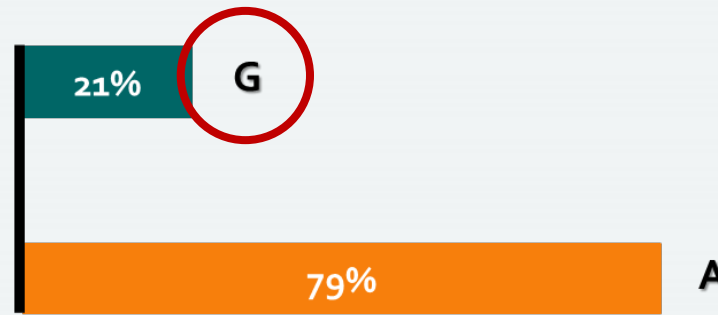
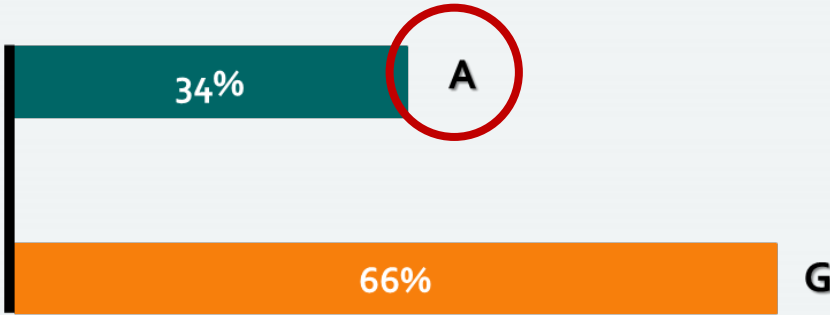
▷ Ραφαήλ Αγγελακόπουλος



MMP13b\_1

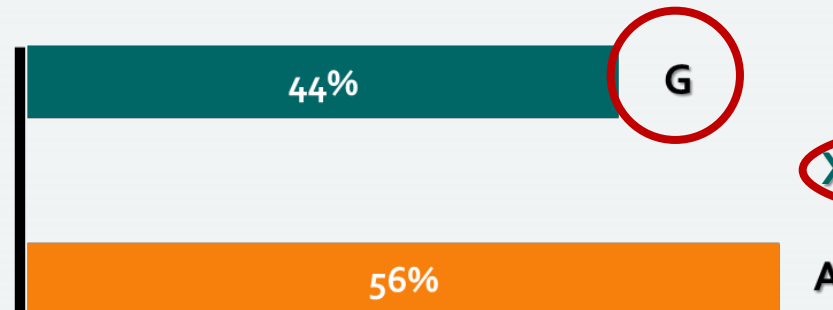
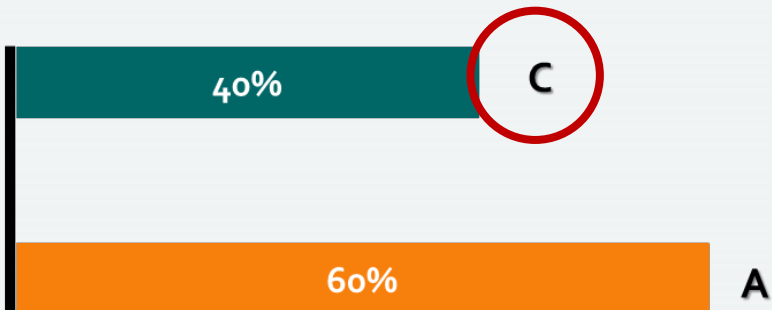
MMP13b\_2

MMP13a\_1



CAPN2b\_1

capn15b\_1



Χαμηλή ενζυμική δραστηριότητα



BIOZ

Εργαστήριο Γενετικής, Συγκριτικής  
και Εξελικτικής Βιολογίας

9/44 πολυμορφισμούς  
εμφάνισαν σημαντική  
συσχέτιση με την  
ενζυμική δραστηκότητα

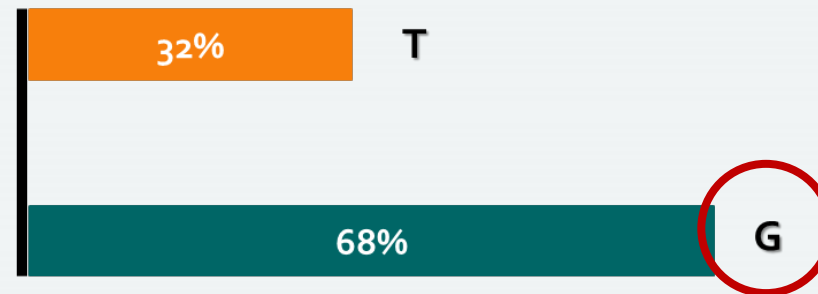
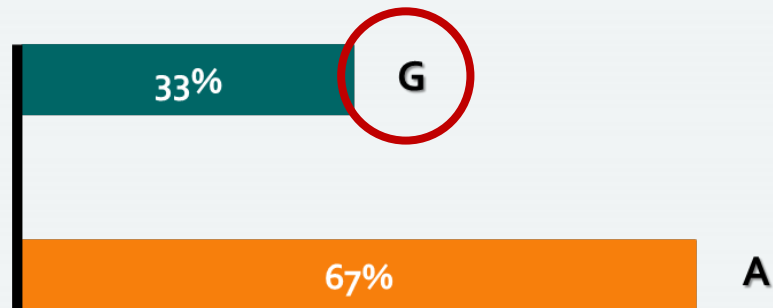
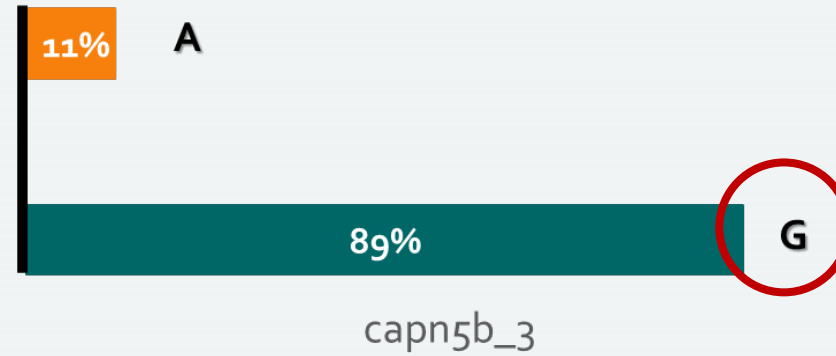
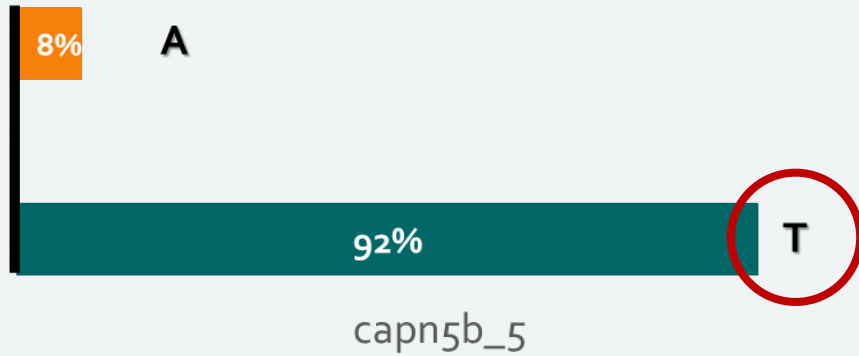


▷ Ραφαήλ Αγγελακόπουλος



CAPN14b\_1

CAPN14b\_4



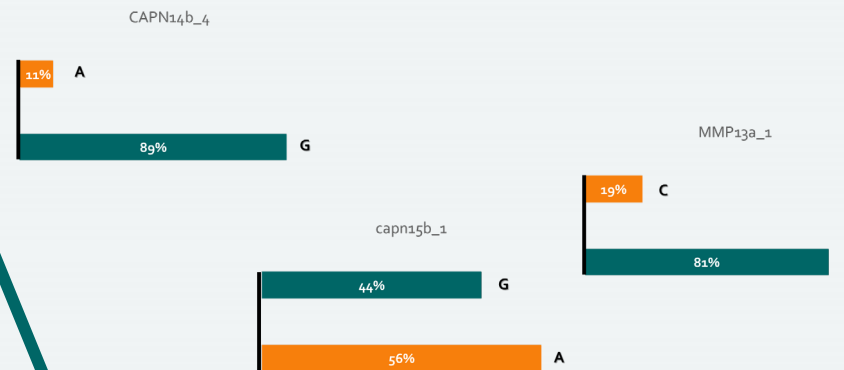
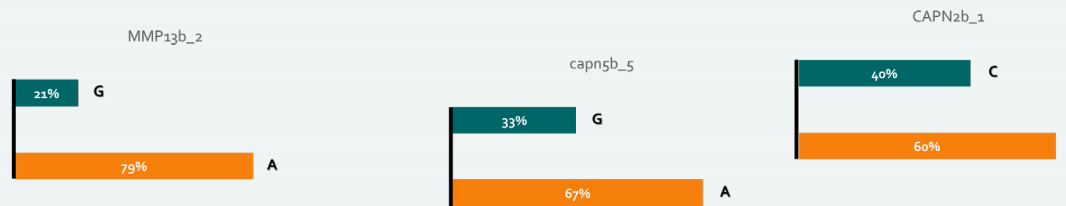
Χαμηλή ενζυμική δραστηκότητα



BIOZ

Εργαστήριο Γενετικής, Συγκριτικής  
και Εξελικτικής Βιολογίας

▷ Ραφαήλ Αγγελακόπουλος



Ο συνδυασμός αυτών  
όλων μπορεί να μας  
δώσει τα επιθυμητά  
χαρακτηριστικά







**BIOZ**  
Εργαστήριο Γενετικής, Συγκριτικής  
και Εξελικτικής Βιολογίας

**Ο συνδυασμός αυτών όλων  
μπορεί να μας δώσει το  
επιθυμητό αποτέλεσμα**



▷ **Ραφαήλ Αγγελακόπουλος**  
ΤΜΗΜΑ  
**Βιοχημείας &  
Βιοτεχνολογίας**  
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

Haplotype association with response (adjusted by Temperature+Calpains+Metalloproteases)

	MMP13b_1	MMP13b_2	MMP13a_2	CAPN2B_1	CAPN14B_1	CAPN5b_3	CAPN5b_5	CAPN15B_1	capn14b_4	Frequency	Difference (95% CI)	P-value
1	G	A	C	A	T	G	G	G	G	0.1008	0	---
2	G	A	C	A	T	T	G	A	G	0.0599	-9.08 (-11.92 - -6.25)	<0.0001
3	G	A	T	A	T	T	A	A	G	0.0521	-15.65 (-19.02 - -12.27)	<0.0001
4	A	A	C	C	T	G	G	A	G	0.0495	-10.6 (-13.55 - -7.65)	<0.0001
5	A	G	T	A	T	T	A	A	G	0.0494	3.03 (-0.04 - 6.11)	0.055
6	G	A	C	A	A	G	A	A	A	0.0486	-10.99 (-13.73 - -8.25)	<0.0001
7	A	G	T	A	T	T	A	G	G	0.0485	-14.17 (-17.41 - -10.93)	<0.0001
8	G	A	T	C	T	G	A	A	G	0.0476	-5.72 (-8.56 - -2.88)	0.00011
9	A	A	T	C	T	G	A	G	G	0.0419	1.31 (-1.94 - 4.55)	0.43
10	G	A	T	C	T	T	A	G	G	0.0418	1.95 (-1.51 - 5.4)	0.27
11	G	A	T	C	T	G	A	G	G	0.0415	-10.22 (-13.34 - -7.1)	<0.0001
12	G	A	C	A	T	G	A	G	G	0.0338	-8.54 (-12.34 - -4.73)	<0.0001
13	A	A	C	A	T	G	G	G	G	0.0316	-10.17 (-13.42 - -6.92)	<0.0001
14	A	G	T	C	T	T	A	G	G	0.0304	3.32 (-0.29 - 6.93)	0.073
15	G	A	T	A	T	G	G	A	G	0.0261	-5.22 (-8.57 - -1.87)	0.0026
16	G	A	C	C	A	G	G	A	A	0.0209	-19.56 (-23.93 - -15.2)	<0.0001
17	A	G	T	C	A	T	A	G	A	0.0208	-9.04 (-13.44 - -4.63)	<0.0001
18	G	A	C	C	T	T	A	G	G	0.0208	-7.67 (-11.5 - -3.84)	0.00012
19	G	A	C	C	A	G	G	G	A	0.0208	-24.66 (-28.37 - -20.94)	<0.0001
20	G	A	T	C	T	T	G	A	G	0.0104	8.84 (3.67 - 14.01)	0.00096
21	A	G	C	A	A	T	A	G	A	0.0104	3.6 (-1.08 - 8.28)	0.13
22	G	A	C	A	A	T	A	A	A	0.0104	6.57 (0.58 - 12.56)	0.033
23	G	A	C	A	A	T	A	G	A	0.0104	5.28 (-0.87 - 11.43)	0.094



BIOZ

Εργαστήριο Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας

6/57 πολυμορφισμούς εμφάνισαν σημαντική συσχέτιση με την ενζυμική δραστηκότητα



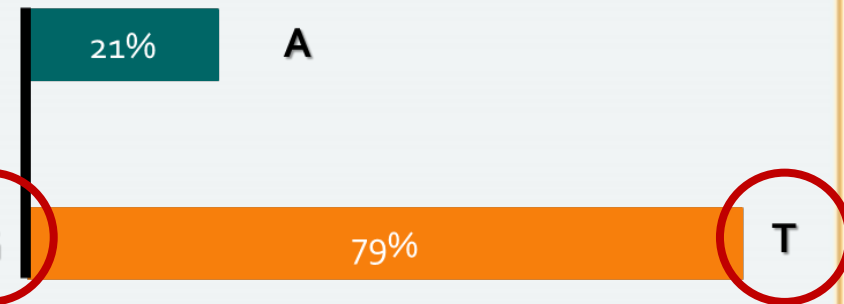
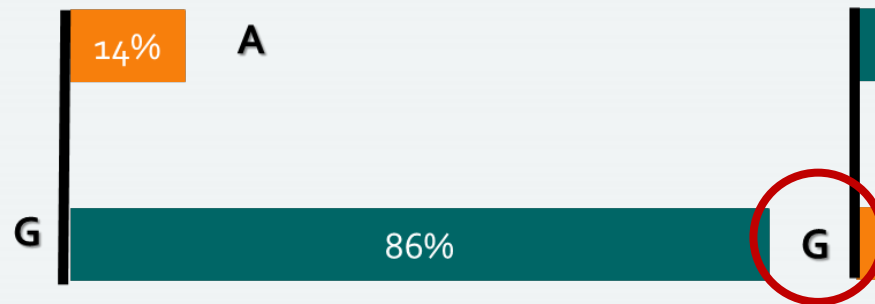
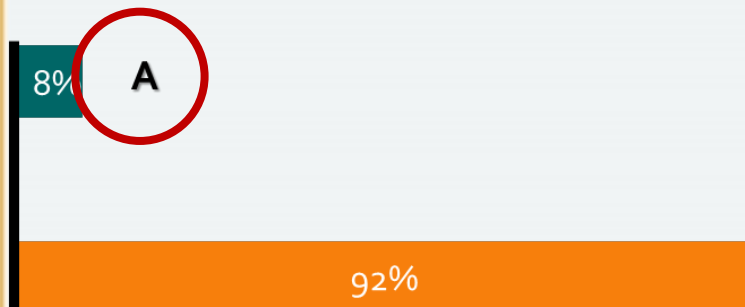
▷ Ραφαήλ Αγγελικόπουλος



CAPN5a\_1

CAPN5a\_2

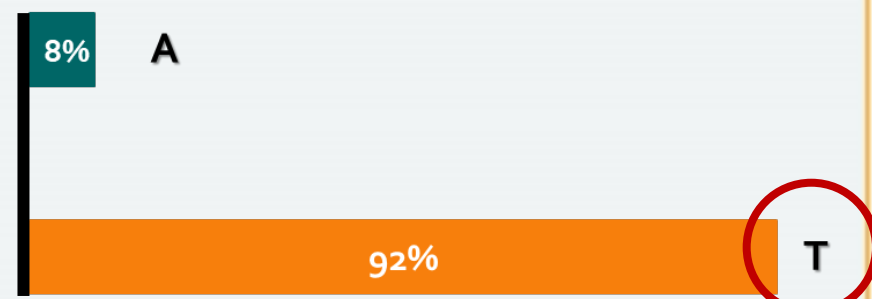
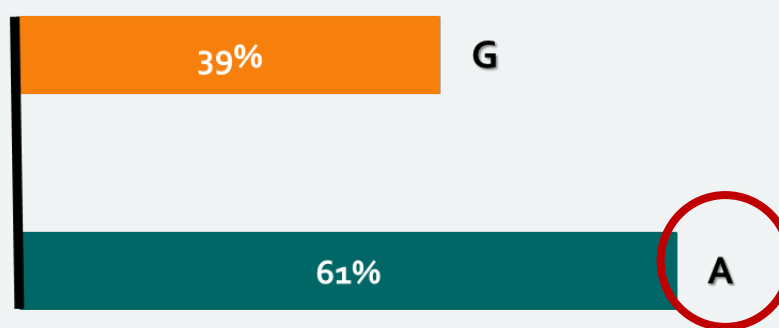
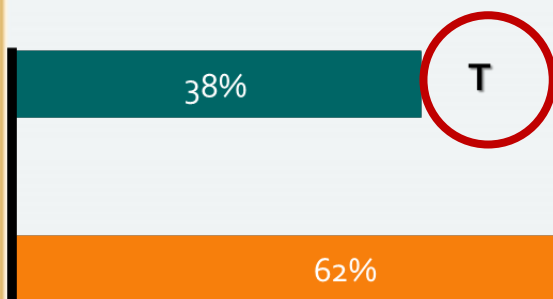
CAPN2b



CAPN10

CTSDb

CAPN10\_11



Χαμηλή ενζυμική δραστηκότητα



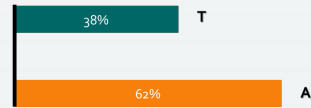
BIOZ

Εργαστήριο Γενετικής, Συγκριτικής  
και Εξελικτικής Βιολογίας

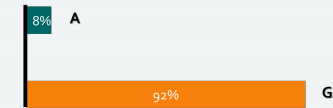
▷ Ραφαήλ Αγγελακόπουλος



CAPN10

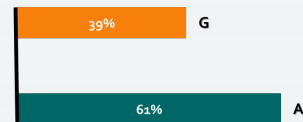


CAPN5a\_1

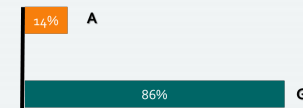


Ο συνδυασμός αυτών  
όλων μπορεί να μας  
δώσει τα επιθυμητά  
χαρακτηριστικά

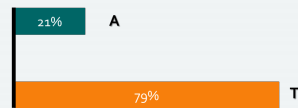
CTSDb



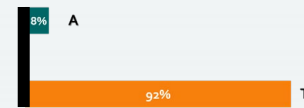
CAPN5a\_2



CAPN2b



CAPN10\_11





BIOZ

Εργαστήριο Γενετικής, Συγκριτικής  
και Εξελικτικής Βιολογίας

Ο συνδυασμός αυτών όλων  
μπορεί να μας δώσει το  
επιθυμητό αποτέλεσμα



▷ Ραφαήλ Αγγελακόπουλος



Haplotype association with response (adjusted by Temperature+Calpains+Metalloproteases+Cathepsins)

	SA_CAPN10_11	SA_CAPN10_14	SA_CAPN2b_3_42	SA_CAPN5a_1	SA_CTSDb_8_9	SA_CAPN5a_2	Frequency	Difference (95% CI)	P-value
1	T	A	T	G	A	G	0.2912	0	---
2	T	A	T	G	G	G	0.1874	1.63 (-0.59 - 3.86)	0.15
3	T	T	T	G	G	G	0.0948	-0.7 (-3.91 - 2.5)	0.67
4	T	T	T	G	A	G	0.0447	3.97 (-1.7 - 9.65)	0.17
5	T	A	A	G	G	G	0.0434	-1.43 (-6.48 - 3.61)	0.58
6	T	A	T	G	G	A	0.0431	<b>-8.98 (-14.06 - -3.9)</b>	0.00071
7	T	A	T	A	G	G	0.0427	-1.07 (-7.06 - 4.91)	0.73
8	T	T	A	G	A	A	0.0376	1.19 (-4.22 - 6.6)	0.67
9	T	A	T	G	A	A	0.0328	<b>8.62 (2.93 - 14.3)</b>	0.0035
10	A	T	A	G	G	A	0.0256	1.81 (-4.39 - 8.01)	0.57
11	T	T	T	G	A	A	0.0233	<b>9.38 (2.95 - 15.82)</b>	0.0049
12	T	T	T	G	G	A	0.0229	4.84 (-2 - 11.69)	0.17
13	A	T	T	G	G	G	0.0228	-2.21 (-6.53 - 2.12)	0.32
14	T	A	A	G	A	G	0.0227	5.77 (-1.36 - 12.9)	0.11
15	T	A	A	G	A	A	0.0219	-4.6 (-11.74 - 2.53)	0.21
16	T	A	T	A	A	G	0.0217	<b>12.06 (5.52 - 18.6)</b>	0.00042
17	A	T	T	G	A	G	0.0108	4.66 (-4.85 - 14.16)	0.34



BIOZ

Εργαστήριο Γενετικής, Συγκριτικής  
και Εξελικτικής Βιολογίας

▷ Ραφαήλ Αγγελακόπουλος



Γεννήτορας Α ♀



Γεννήτορας Β ♂



Συλλογή  
δειγμάτων

Νέος  
πληθυσμός  
ιχθύων

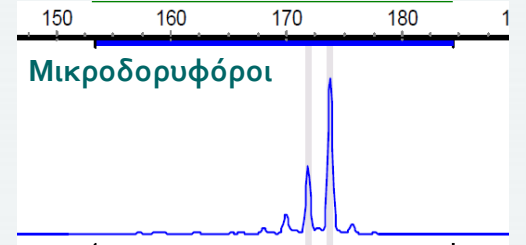
Απομόνωση  
DNA

Άτομα με τους επιθυμητούς  
πολυμορφισμούς



Επιλογή  
γεννητόρων

Γονοτύπηση  
και απόδοση  
πατρότητας



Πως μπορούμε να  
εκμεταλλευτούμε όλη αυτή την  
πληροφορία ώστε να  
επιλέξουμε τα επιθυμητά  
χαρακτηριστικά σε νέους  
πληθυσμούς?





BIOZ

Εργαστήριο Γενετικής, Συγκριτικής  
και Εξελικτικής Βιολογίας

## Συμπεράσματα...

▷ Ραφαήλ Αγγελακόπουλος



- ✓ Οι ενζυμικές δραστηριότητες παρουσίασαν διαφορετικό μοτίβο ενεργοποίησης σε διαφορετικές θερμοκρασίες
- ✓ Με βάση τις ενζυμικές δραστηριότητες το SC φαίνεται να προκρίνεται σαν μέθοδος αλίευσης ανεξαρτήτου θερμοκρασίας νερού
- ✓ Εννιά (9) από τους σαράντα τέσσερις (44) μη συνώνυμους πολυμορφισμούς σχετίζονται με την επίδραση στην ενζυμική δραστηριότητα



### Οι πολυμορφισμοί αυτοί αποτελούν την γενετική βάση της φρεσκότητας

- ✓ Οι ενζυμικές δραστηριότητες παρουσίασαν διαφορετικό μοτίβο ενεργοποίησης σε διαφορετικές θερμοκρασίες
- ✓ Με βάση τις ενζυμικές δραστηριότητες το S50 φαίνεται να προκρίνεται σαν μέθοδος αλίευσης ανεξαρτήτου θερμοκρασίας νερού
- ✓ Έξι (6) από τους πενήντα επτά (57) μη συνώνυμους πολυμορφισμούς σχετίζονται με την επίδραση στην ενζυμική δραστηριότητα





BIOZ

Εργαστήριο Γενετικής, Συγκριτικής  
και Εξελκτικής Βιολογίας



Ευρωπαϊκό Ταμείο  
Θάλασσας και Αλιείας



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ



# Ερωτήσεις;

Slurry  Fish

