



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

ΜΟΥΣΤΑΚΑΣ ΘΕΟΔΟΣΙΟΣ ΧΡΗΣΤΟΣ

**ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ
ΜΟΡΙΑΚΗΣ
ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ**

ΜΟΡΙΑΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ

ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ

ΛΑΡΙΣΑ 2025

**ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ
ΣΤΑ ΓΟΝΙΔΙΑ ΤΩΝ ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΩΝ HSPs ΣΕ
ΘΕΡΜΟΑΝΘΕΚΤΙΚΕΣ ΑΓΕΛΑΔΕΣ**

**FUNCTIONAL CHARACTERIZATION OF MUTATIONS
IN THE HSP FAMILY GENES OF THERMOTOLERANT
CATTLE**

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

1.Γιαννούλης Θεμιστοκλής (Επιβλέπων καθηγητής)

Επίκουρος Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών: Γονιδιωματική, Εξέλιξη, Βιοποικιλότητα, Τμήμα Επιστήμης Ζωικής Παραγωγής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

2. Μαμούρης Ζήσης

Καθηγητής Γενετικής Πληθυσμών, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

3. Μούτου Αικατερίνη

Καθηγήτρια Βιολογίας Σπονδυλωτών, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κύριο Γιαννούλη Θεμιστοκλή, επίκουρο καθηγητή Γενετικής Ζωικών πληθυσμών για την καθοδήγηση και τη συνεργασία καθόλη την περίοδο εκπόνησης και συγγραφής της παρούσας εργασίας. Επίσης ευχαριστώ και τους καθηγητές κύριο Μαμούρη Ζήση και κυρία Μούτου Αικατερίνη που είναι μέλη της συμβουλευτικής επιτροπής.

Τέλος θέλω να ευχαριστήσω τους γονείς μου για τη στήριξή τους όλο αυτό το διάστημα.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η υπερθέρμανση του πλανήτη η οποία γίνεται ολοένα και πιο εμφανής τα τελευταία χρόνια έχει αρνητικό αντίκτυπο σε πολλές πτυχές της ζωής των οικοσυστημάτων ζώων. Αυτό το πρόβλημα γίνεται εντονότερο στα ζώα που διαβιούν σε ευπαθείς στη ζέστη περιοχές. Ειδικότερα για τις αγελάδες με τις οποίες ασχολείται η παρούσα εργασία η αύξηση της περιβαλλοντικής θερμοκρασίας προκαλεί θερμική καταπόνηση σε αυτές με αποτέλεσμα να μειώνεται η παραγωγή γάλακτος, η ανάπτυξη και η αναπαραγωγική τους ικανότητα κάτι που συνεπάγεται μεγάλο οικονομικό κόστος για τους παραγωγούς. Για αυτόν τον λόγο η επιλογή ζώων με θερμοανθεκτικά χαρακτηριστικά είναι πρωταρχικός στόχος ερευνητών που ασχολούνται στον τομέα της αντιμετώπισης των συνεπειών του θερμικού στρες. Πάνω σε αυτήν την κατεύθυνση κινήθηκε η παρούσα εργασία και εστιάστηκε στις πρωτεΐνες θερμικού σοκ (HSPs) οι οποίες έχει αποδειχθεί ότι έχουν κυτταροπροστατευτικούς ρόλους κατά τη διάρκεια του στρες. Συγκεκριμένα χαρτογραφήθηκαν μεταλλάξεις στα HSP γονίδια θερμοανθεκτικών και θερμοευαίσθητων αγελάδων και βρέθηκαν οι λειτουργικές περιοχές στις οποίες αυτές εντοπίζονται ώστε να διαπιστωθεί ο πιθανός ρόλος τους στην εμφάνιση θερμοανθεκτικότητας.

Λέξεις κλειδιά: κλιματική αλλαγή, θερμική καταπόνηση, γονίδια HSP, μεταλλάξεις, θερμοανθεκτικά ζώα.

ABSTRACT

Global warming, which has become increasingly evident in recent years, has a negative impact on many aspects of the lives of domestic animals. This problem is particularly severe for animals that live in heat-prone areas. In particular, for the cattle discussed in this work, an increase in environmental temperature causes thermal stress, leading to reduced milk production, growth, and reproductive efficiency, which imposes significant financial costs on producers. For this reason, selecting animals with thermotolerance traits is a primary goal for researchers addressing the consequences of heat stress. The present work moves in this direction, focusing on heat shock proteins (HSPs), which have been shown to play cytoprotective roles during stress. Specifically, mutations in the HSP genes of thermotolerant and heat-sensitive cattle were mapped, and the functional regions where they are located were identified to determine their potential role in heat resistance.

Key words: climate change, heat stress, HSP genes, mutations, thermotolerant animals.

Περιεχόμενα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	5
ABSTRACT	6
1. Εισαγωγή	10
1.1 Bos taurus	10
1.2 Θερμικό στρες.....	10
1.2.1 Δείκτης θερμοκρασίας και υγρασίας - Temperature and Humidity Index (THI): Σημαντικό εργαλείο για την εκτίμηση της θερμικής καταπόνησης.	12
1.2.2 Συνέπειες από το θερμικό στρες.....	13
1.2.3 Τεχνικές αντιμετώπισης του θερμικού στρες	13
1.3 Πρωτεΐνες θερμικού σοκ - Heat shock proteins (HSPs).....	14
1.3.1 Heat shock protein 70 (HSP70).....	15
1.3.5 Heat shock protein 110 (HSP110).....	19
1.3.6 Μικρές πρωτεΐνες θερμικού σοκ - Small Heat shock proteins (sHSP).....	19
1.3.7 Παράγοντες θερμικού σοκ - Heat shock factors (HSFs).....	19
1.4 Αλληλούχιση ολόκληρου του γονιδιώματος - Whole Genome Sequencing (WGS)	20
1.5 Sift (Sorting Intolerant From Tolerant)	20
1.6 Αντιστοίχιση μεταλλάξεων με θερμοανοχή.....	20
2. Σκοπός.....	20
3. Υλικά και Μέθοδοι.....	21
3.1 Αναζήτηση όλων των γονιδίων της οικογένειας HSP στις αγελάδες	21
3.2 Εύρεση όλων των μεταλλάξεων σε γονίδια HSP από δεδομένα αλληλούχισης ολόκληρου γονιδιώματος από αγελάδες Holstein.	21
3.3 Εύρεση των περιοχών της πρωτεϊνικής αλληλουχίας που επηρεάζονται από τις μεταλλάξεις.	22
3.4 Οπτική αναπαράσταση των πρωτεϊνών	23
4. Αποτελέσματα	24
4.1 Οικογένεια πρωτεϊνών HSP70	24
4.1.2 HSPA1L.....	26
4.1.4 HSPA4	27
4.1.5 HSPA4L.....	28
4.1.6 HSPA6	28
4.1.7 HSPA8	29
4.1.8 HSPA9	29

4.1.9 HSPA12A	29
4.1.10 HSPA12B	29
4.1.11 HSPA13.....	29
4.1.12 HSPA14.....	30
4.1.13 HSPBP1	30
4.2 Οικογένεια HSP90	30
4.2.1 HSP90AA1	30
4.2.2 HSP90AB1	31
4.2.3 HSP90B1	31
4.3 Οικογένεια HSP110	31
4.3.1 HSPH1	31
4.4 Οικογένεια HSP60	31
4.4.1 HSPD1	31
4.5 Οικογένεια HSP10	31
4.5.1 HSPE1	31
4.6 Οικογένεια HSP40	31
4.7 Οικογένεια small HSP	36
4.8 Οικογένεια Heat shock factor	36
4.9 Ομαδοποιημένα οι μεταλλάξεις	37
5. Συζήτηση.....	39
6. Βιβλιογραφία	42

ΕΙΚΟΝΕΣ

Εικόνα 1 Άτομο του είδους <i>Bos taurus</i>	10
Εικόνα 2 Συσχέτιση εσωτερικής με εξωτερική θερμοκρασία στις αγελάδες.....	12
Εικόνα 3 Συσχέτιση θερμικού στρες με τα επίπεδα THI	12
Εικόνα 4 Μοριακός μηχανισμός για την εκφραση του HSP70 μέσα σε ένα κύτταρο.....	16
Εικόνα 5 Κύκλος δράσης των μοριακών συνοδών HSP 70.....	17
Εικόνα 6 Σχηματική αναπαράσταση της δομής του διμερούς HSP90.....	18
Εικόνα 7 Μορφή της σελίδας του ncbi gene κατά την αναζήτηση της ύπαρξης του γονιδίου HSPA1A στο είδος <i>Bos taurus</i> (domestic cattle).....	21
Εικόνα 8 Μορφή της σελίδας του MobaXterm κατά τον εντοπισμό και τη δημιουργία αρχείων με μεταλλάξεις συγκεκριμένων γονιδίων (πχ. του HSPA1A).....	22
Εικόνα 9 Μορφή της σελίδας της Interpro που περιέχει τα δεδομένα μετά την αναζήτηση για την πρωτεΐνη HSP90AA1.....	23
Εικόνα 10 Μορφή της σελίδας της UniProt που περιέχει τα δεδομένα μετά την αναζήτηση για την πρωτεΐνη HSPA1A.....	23
Εικόνα 11 Περιβάλλον εργασίας του IBS. Εισάγονται τα δεδομένα των πρωτεϊνών και αυτά αποτυπώνονται σχηματικά.....	24
Εικόνα 12 Σχέδιο πρωτεΐνης HSPA1A με το πρόγραμμα IBS.....	25
Εικόνα 13 Σχέδιο πρωτεΐνης HSPA1L με το πρόγραμμα IBS.....	26
Εικόνα 14 Σχέδιο πρωτεΐνης HSPA4L με το πρόγραμμα IBS.....	28
Εικόνα 15 Σχέδιο πρωτεΐνης DNAJB6 με το πρόγραμμα IBS.....	32
Εικόνα 16 Σχέδιο πρωτεΐνης DNAJB4 με το πρόγραμμα IBS.....	32
Εικόνα 17 Σχέδιο πρωτεΐνης DNAJB13 με το πρόγραμμα IBS.....	33

ΠΙΝΑΚΕΣ

Πίνακας 1 Τάση των ερευνητικών εργασιών που ερευνούν την θερμική καταπόνηση σε αγελάδες γαλακτοπαραγωγής.....	11
Πίνακας 2 Ομαδοποιημένα οι μεταλλάξεις στα HSP70 γονίδια.....	37
Πίνακας 3 Γράφημα με τις ομαδοποιημένες μεταλλάξεις στα HSP70 γονίδια.....	37
Πίνακας 4 Ομαδοποιημένα οι μεταλλάξεις στα HSP40 γονίδια.....	37
Πίνακας 5 Γράφημα με τις ομαδοποιημένες μεταλλάξεις στα HSP40 γονίδια.....	38
Πίνακας 6 Ομαδοποιημένα οι μεταλλάξεις στο σύνολο των HSP γονιδίων.....	38
Πίνακας 7 Γράφημα με τις ομαδοποιημένες μεταλλάξεις στο σύνολο των HSP γονιδίων.....	39

1. Εισαγωγή

Η κτηνοτροφία είναι μαζί με τη γεωργία οι κύριοι πυλώνες της διατροφικής αυτάρκειας των ανθρώπινων κοινωνιών. Κάθε παράμετρος που επηρεάζει αρνητικά την αποδοτικότητά τους χρίζει ιδιαίτερης προσοχής. Μια παράμετρος που χρίζει μεγάλης προσοχής είναι το θερμικό στρες που υποβάλλονται τα ζώα κτηνοτροφίας και επηρεάζει την απόδοσή τους. Ιδιαίτερα τα τελευταία χρόνια που η υπερθέρμανση του πλανήτη λόγω κλιματικής αλλαγής γίνεται ολοένα και πιο εμφανής το πρόβλημα αυτό θα γίνεται ολοένα και εντονότερο. Το θερμικό στρες εμφανίζεται στα ζώα όταν αυτά παράγουν και απορροφούν περισσότερη θερμότητα από αυτή που μπορούν εύκολα να αποβάλλουν με την αναπνοή και την εφίδρωση. Η παρούσα εργασία θα ασχοληθεί με το πρόβλημα του θερμικού στρες στα βοοειδή κτηνοτροφίας (*Bos taurus*).

1.1 Bos taurus



Εικόνα 1 Άτομο του είδους Bos taurus (NCBI taxonomy browser)

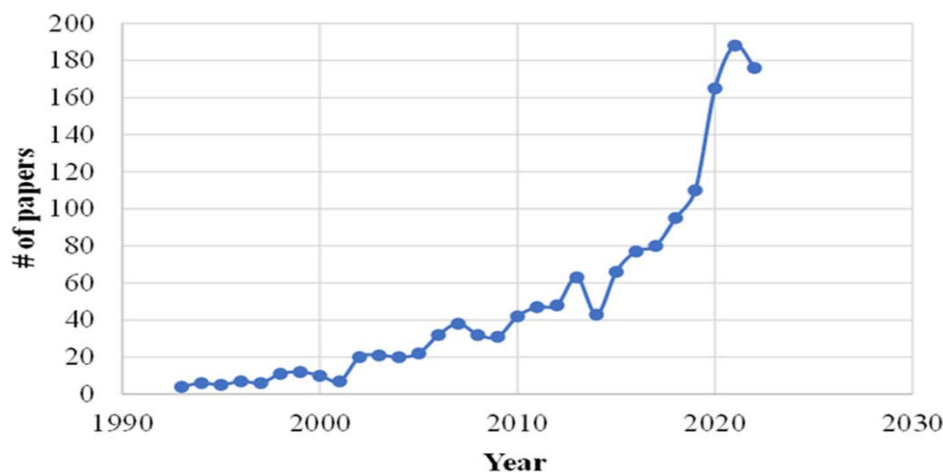
Οι οικόσιτες αγελάδες είναι μεγάλα, εύρωστα ζώα. Είναι ομοιόθερμα καθώς διατηρούν τη θερμοκρασία του σώματός τους σε περιορισμένα στενά όρια, ανεξάρτητα από τις μεταβολές της θερμοκρασίας του περιβάλλοντός τους. Το βάρος τους κυμαίνεται από 147 κιλά έως 1363 κιλά και το ύψος τους μεταξύ 120 και 150 εκατοστών. Το σώμα καλύπτεται από κοντές τρίχες, το χρώμα των οποίων ποικίλλει από μαύρο έως λευκό, κοκκινωπό και καφέ. Οι οικόσιτες αγελάδες έχουν κοντό λαιμό, δύο κούφια κέρατα και μια μακριά φουντωτή ουρά. Από τον άνθρωπο χρησιμοποιούνται για την παραγωγή γάλακτος και κρέατος ενώ ιδίως παλαιότερα χρησιμοποιούνταν ευρέως ως ζώα εργασίας για όργωμα και μετακίνηση βαρέων φορτίων (Tanya Dewey et al).

1.2 Θερμικό στρες

Το θερμικό στρες (heat stress) ονομάζεται το φαινόμενο κατά το οποίο η θερμότητα που παράγεται από τις βιολογικές διεργασίες μιας αγελάδας και η θερμότητα που απορροφάται από το περιβάλλον υπερβαίνει την ικανότητα της αγελάδας να αποβάλλει θερμότητα, γεγονός που οδηγεί σε φυσιολογικές αλλαγές για μείωση του θερμικού φορτίου στο σώμα. Το θερμικό στρες συνήθως σχετίζεται με περιβαλλοντικές συνθήκες, για παράδειγμα, σε ζώα που εκτρέφονται σε περιβάλλον που χαρακτηρίζεται από υψηλή θερμοκρασία, υψηλή υγρασία ή εκτεθειμένα σε ισχυρή ηλιακή ακτινοβολία. Σε λίγες περιπτώσεις, το θερμικό στρες μπορεί να αποδοθεί σε μια εσωτερική υπερπαραγωγή θερμότητας από το ζώο. Το θερμικό στρες είναι ένα μεγάλο και σε πολλές περιοχές ανερχόμενο πρόβλημα στον γαλακτοκομικό τομέα και προσελκύει ολοένα και περισσότερο την προσοχή ερευνητών και κτηνοτρόφων. Σε επιβεβαίωση, ο πίνακας 1 δείχνει την τάση της βιβλιογραφίας, σε χρονικό διάστημα 30 ετών, που

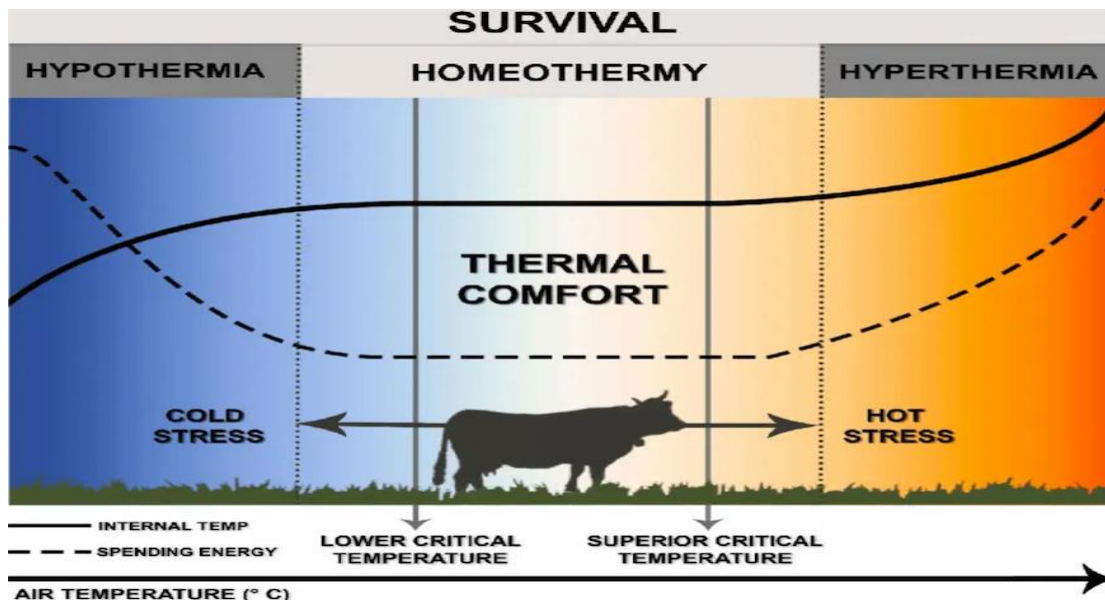
διερευνά τη θερμική καταπόνηση στις αγελάδες γαλακτοπαραγωγής όπως εξήχθη από το Scopus με φιλτράρισμα για τίτλο, λέξεις-κλειδιά και περίληψη (Claudia Giannone et al., 2023).

Πίνακας 1 Τάση των ερευνητικών εργασιών που ερευνούν την θερμική καταπόνηση σε αγελάδες γαλακτοπαραγωγής (Claudia Giannone et al., 2023).



Τα βοοειδή παρότι είναι ομοιόθερμα ζώα έχουν μια σειρά από θερμοκρασίες περιβάλλοντος στις οποίες βρίσκονται σε θερμική άνεση. Το εύρος αυτών των θερμοκρασιών ονομάζεται ζώνη θερμοουδετερότητας. Η θερμοουδέτερη ζώνη των αγελάδων γαλακτοπαραγωγής (δηλαδή, το εύρος θερμοκρασίας του αέρα εντός του οποίου η παραγωγή θερμότητας από το ζώο είναι στο ελάχιστο και η ποσότητα ενέργειας που είναι διαθέσιμη για την παραγωγή γάλακτος είναι στο μέγιστο) κυμαίνεται μεταξύ 5-25 ° C (Claudia Giannone et al., 2023).

Αυτή η ζώνη βρίσκεται μεταξύ της κατώτερης κρίσιμης θερμοκρασίας (TCI) και της ανώτερης κρίσιμης θερμοκρασίας (TCS). Κάτω από το TCI, η αγελάδα βρίσκεται υπό ψυχρό στρες και πάνω από το TCS, η αγελάδα βρίσκεται υπό θερμικό στρες. Εξακολουθεί να υπάρχει διαφωνία μεταξύ των επιστημόνων σχετικά με τις ακριβείς τιμές των TCI και TCS, αλλά μπορούμε να υποστηρίξουμε ότι η TCI βρίσκεται στους 5-10°C και η TCS είναι περίπου 20-25°C. Στη ζώνη θερμοουδετερότητας, το σύστημα θερμορύθμισης πρακτικά δεν ενεργοποιείται, είτε για δέσμευση θερμότητας είτε για απαγωγή θερμότητας, και κατά συνέπεια, καθώς η ενεργειακή δαπάνη για συντήρηση είναι ελάχιστη, υπάρχει πολλή ενέργεια για μέγιστη παραγωγή γάλακτος ή για ανάπτυξη του οργανισμού (Ana Vanessa Dias Sousa et al.).



Εικόνα 2 Συσχέτιση εσωτερικής με εξωτερική θερμοκρασία στις αγελάδες (Lucas Eduardo de Oliveira Aparecido et al., 2022).

1.2.1 Δείκτης θερμοκρασίας και υγρασίας - Temperature and Humidity Index (THI): Σημαντικό εργαλείο για την εκτίμηση της θερμικής καταπόνησης.

Πρέπει να επισημανθεί ότι το θερμικό περιβάλλον καθορίζεται από διάφορους παράγοντες όπως η θερμοκρασία περιβάλλοντος, η σχετική υγρασία, η ηλιακή ακτινοβολία και η ταχύτητα του αέρα.

Για να συσχετίσει τη θερμοκρασία και τη σχετική υγρασία και να διευκολύνει τους παραγωγούς και τους επαγγελματίες να προσδιορίσουν ποιες αγελάδες αντιμετωπίζουν θερμικό στρες, αναπτύχθηκε το THI. Η σοβαρότητα του θερμικού στρες εξαρτάται από τα επίπεδα THI όπως παρουσιάζεται στην εικόνα 3 (Ana Vanessa Dias Sousa et al.).

		Humidity (%)								
		20	30	40	50	60	70	80	90	100
Temperature (°C)	22	66	66	67	68	69	69	70	71	72
	24	68	69	70	70	71	72	73	74	75
	26	70	71	72	73	74	75	77	78	79
	28	72	73	74	76	77	78	80	81	82
	30	74	75	77	78	80	81	83	84	86
	32	76	77	79	81	83	84	86	88	90
	34	78	80	82	84	85	87	89	91	93
	36	80	82	84	86	88	90	93	95	97
	38	82	84	86	89	91	93	96	98	100
	40	84	86	89	91	94	96	99	101	104

Εικόνα 3 Συσχέτιση θερμικού στρες με τα επίπεδα THI (Lucas Eduardo de Oliveira Aparecido et al., 2022)

1.2.2 Συνέπειες από το θερμικό στρες

Οι φυσιολογικές και ψυχολογικές αντιδράσεις των οργανισμών στο θερμικό στρες αναφέρονται ως θερμική καταπόνηση (heat strain). Η έκθεση των κυττάρων στο στρες επηρεάζει σημαντικά τις πρωτεΐνες οι οποίες οδηγούνται πολλές φορές σε λανθασμένη αναδίπλωση και μπορεί να οδηγήσει σε κυτταρικό θάνατο, εκτός εάν προκύψουν προστατευτικές αποκρίσεις (Roger F Duncan et al., 2005). Πολυάριθμες μελέτες έχουν δείξει τη σημαντική μείωση της απόδοσης των βοοειδών όταν υποβάλλονται σε θερμικό στρες. Μειώσεις έχουν παρατηρηθεί στην απόδοση γάλακτος, στον ρυθμό ανάπτυξης, στην αναπαραγωγική απόδοση και στην πρόσληψη τροφής (Dwi Nur Happy Hariyono et al., 2022). Μάλιστα έχει υπολογιστεί σε υψηλότερες θερμοκρασίες από την ανώτερη κρίσιμη θερμοκρασία, τα ζώα μειώνουν την πρόσληψη τροφής κατά 3–5% ανά επιπλέον βαθμό θερμοκρασίας, με συνέπεια τη μείωση της παραγωγικότητας. Επίσης το θερμικό στρες αυξάνει τον ρυθμό αναπνοής και τη θνησιμότητα και καταστέλλει το ανοσοποιητικό και ενδοκρινικό σύστημα, αυξάνοντας έτσι την ευαισθησία των ζώων σε ορισμένες ασθένειες. Επιπλέον τροποποιεί τη συμπεριφορά των αγελάδων όπως η αναζήτηση σκιάς, η αύξηση του χρόνου που περνούν μέσα ή γύρω από τις δεξαμενές με νερό ενώ παράλληλα περνούν περισσότερο χρόνο όρθιες για να έχουν μεγαλύτερη επιφάνεια επαφής με τον αέρα και να διαχυθεί η θερμότητα.

Αξιοσημείωτες είναι και οι οικονομικές επιπτώσεις λόγω της πτώσης της απόδοσης των βοοειδών. Σε πρόσφατη μελέτη για ένα σενάριο υψηλών εκπομπών αερίων θερμοκηπίου, οι παγκόσμιες απώλειες παραγωγής από τη θερμική καταπόνηση εκτιμήθηκαν σε 39,94 δισεκατομμύρια δολάρια ετησίως μέχρι το τέλος του αιώνα, ή 9,8% της αξίας της παραγωγής κρέατος και γάλακτος από βοοειδή το 2005. Για ένα σενάριο χαμηλών εκπομπών, η αξία των απωλειών παραγωγής ήταν 14,89 δισεκατομμύρια δολάρια ετησίως, ή 3,7% της αξίας του 2005. Και στα δύο σενάρια, οι απώλειες στις περισσότερες τροπικές περιοχές προβλεπόταν να είναι πολύ μεγαλύτερες από ό,τι στις εύκρατες περιοχές (Philip Thornton et al., 2022). Πρέπει να σημειωθεί ότι αυτά τα δύο σενάρια βασίστηκαν στις αισιόδοξες και απαισιόδοξες προγνώσεις που έχει διατυπώσει η Διακυβερνητική Επιτροπή για την Κλιματική Αλλαγή του Οργανισμού Ηνωμένων Εθνών.

1.2.3 Τεχνικές αντιμετώπισης του θερμικού στρες

Η αντιμετώπιση του θερμικού στρες είναι μια δύσκολη υπόθεση και πολλές φορές απαιτούνται συνδυαστικά μέτρα για την αντιμετώπισή του.

Αρχικά μπορούν να εφαρμοστούν κάποια τεχνικά μέτρα μετριασμού του. Τα μέτρα αυτά είναι η τοποθέτηση σκιάστρων για τα ζώα, η τοποθέτηση ανεμιστήρων, ψεκαστήρων ή κλιματιστικών στις φάρμες (Sébastien Fournel et al., 2017). Επίσης βοηθάει και η τροποποίηση της διατροφής με περισσότερα θρεπτικά συστατικά και άφθονη πρόσβαση σε νερό (J.W. West, 2003).

Άλλη στρατηγική για την αντιμετώπιση της ολοένα και πιο έντονης θερμικής καταπόνησης των αγελάδων είναι να προτιμώνται, σε περιοχές με έντονο θερμικό στρες, άτομα με θερμοανθεκτικά χαρακτηριστικά. Θερμοανθεκτικό ζώο είναι αυτό που διατηρεί τη θερμική ισορροπία υπό συνθήκες θερμικού φορτίου. Τα ζώα με αυτά τα χαρακτηριστικά μπορεί να ανήκουν σε κάποιες συγκεκριμένες φυλές ή να προκύψουν

μέσω τεχνητής γενετικής επιλογής(Richard Osei-Amponsah et al., 2019). Πάνω σε αυτό τον τομέα είναι εστιασμένη η έρευνα πολλών επιστημονικών ομάδων. Γίνεται έρευνα στο πεδίο και στο εργαστήριο ώστε να βρεθούν οι θερμοανθεκτικές φυλές αλλά και ποια γονίδια προσδίδουν αυτά τα χαρακτηριστικά. Οι σύγχρονες μέθοδοι γονιδιωματικής έχουν βοηθήσει πολύ σε αυτή την κατεύθυνση. Ιδιαίτερα η συγκριτική γονιδιωματική και η ανάλυση γονιδιακής έκφρασης. Στη συγκριτική γονιδιωματική γίνεται σύγκριση των γονιδιωμάτων ανθεκτικών στη θερμότητα φυλών με άλλα λιγότερο ανθεκτικά ενώ στην ανάλυση γονιδιακής έκφρασης αναζητούνται ποια γονίδια είναι πιο ενεργά σε ανθεκτικά στη θερμότητα βοοειδή υπό συνθήκες υψηλής θερμοκρασίας.

Όταν εντοπίζεται μια φυλή με επιθυμητά χαρακτηριστικά ως προς την ανοχή στο θερμικό στρες δε σημαίνει ότι δε θα έχει μειονεκτήματα σε άλλους τομείς όπως στην λιγότερη ποσότητα γάλακτος που παράγει όλο το χρόνο, το μικρό μέγεθος σώματος ή την μικρή αντοχή στο κρύο. Οπότε οι επιστήμονες προσπαθούν να συνδυάσουν χαρακτηρίστηκα διαφόρων φυλών ώστε να επιτευχθεί το επιθυμητό αποτέλεσμα που είναι παραγωγικά θερμοανθεκτικά ζώα. Ορισμένοι επιστήμονες για παράδειγμα έχουν εξετάσει τη διασταύρωση των φυλών *Bos taurus* με τη *Bos indicus* που είναι μια φυλή των τροπικών περιοχών προσαρμοσμένη στη θερμότητα ή ακόμα και διασταύρωση ατόμων *Bos taurus* από βορειότερες περιοχές με *Bos taurus* από τη τροπική ζώνη που έχουν αναπτύξει κάποια θερμοανθεκτικά χαρακτηριστικά. Παρόλα αυτά τα άτομα της *Bos indicus* έχουν συνήθως χαμηλότερη παραγωγή γάλακτος και μικρότερη αντοχή στις ψυχρότερες θερμοκρασίες που υπάρχουν στις βορειότερες γεωγραφικές περιοχές το χειμώνα. Επομένως, η διασταύρωση παρόλο που μπορεί να οδηγήσει στην παραγωγή θερμοανθεκτικών απογόνων, αυτοί οι απόγονοι δεν είναι απαραίτητο ότι θα έχουν υψηλότερες αποδόσεις σε σχέση με τις φυλές *Bos taurus* σε ετήσια βάση. Γι'αυτό τον λόγο πολλοί ερευνητές επικεντρώνονται στο να βρεθούν ακριβώς ποια γονίδια ευθύνονται για θερμοανθεκτικά χαρακτηρίστηκα και μόνο αυτά να εισαχθούν στο γονιδίωμα των *Bos taurus*(Shannon L Cartwright et al., 2023). Μάλιστα η εισαγωγή μπορεί να γίνει με τη σύγχρονη μέθοδο CRISPR κάτι που έχει εφαρμοστεί με επιτυχία από επιστήμονες και σε βοοειδή. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η εισαγωγή του γονιδίου *PRLR-SLICK* το οποίο σχετίζεται με μία φυσική μετάλλαξη σε κάποιες φυλές βοοειδών και προσδίδει ένα πιο λείο και κοντό τρίχωμα το οποίο ενισχύει τη διάχυση θερμότητας και μειώνει το θερμικό στρες. Αυτό το γονίδιο εισήχθη με τη μέθοδο CRISPR σε έμβρυα *Bos taurus* τα οποία στη συνέχεια μετά τη γέννησή τους είχαν χαμηλότερη θερμοκρασία σώματος από τα βοοειδή που δεν είχαν αυτό το χαρακτηριστικό και συνεπώς τα πρώτα ήταν πιο ανθεκτικά στις υψηλές θερμοκρασίες(Mattia Pozzebon et al., 2024).

1.3 Πρωτεΐνες θερμικού σοκ - Heat shock proteins (HSPs)

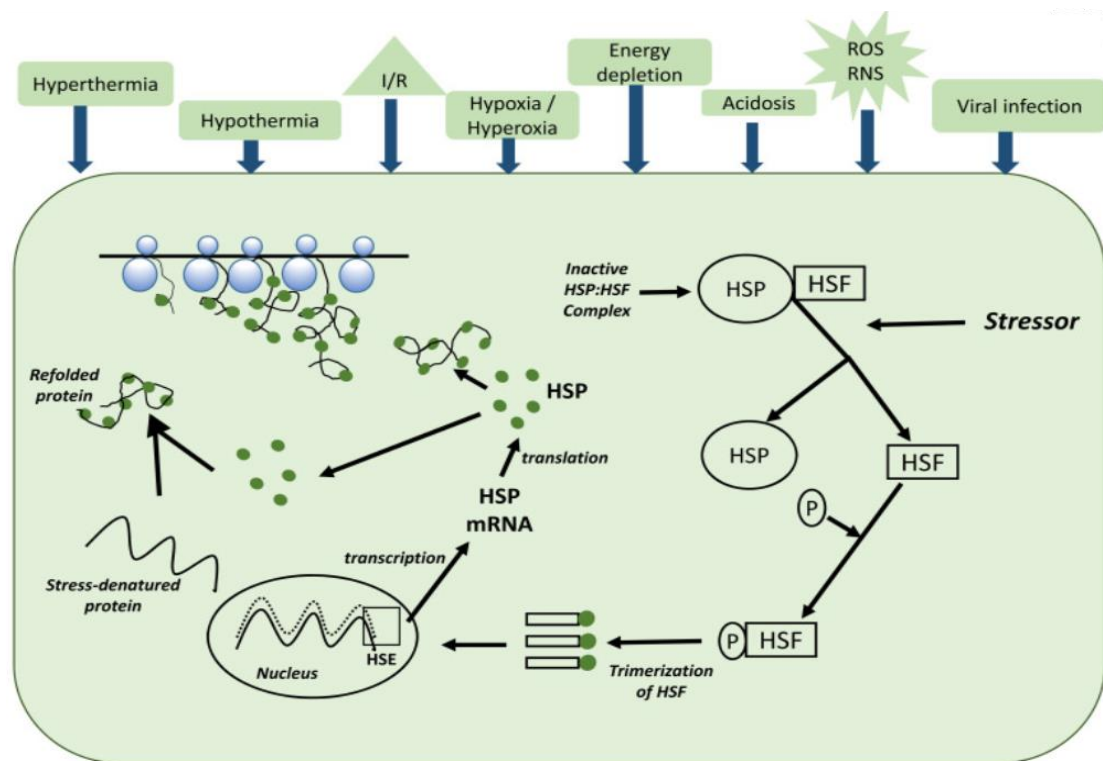
Τα γονίδια HSPs υπάρχουν τόσο σε προκαρυωτικά όσο και σε ευκαρυωτικά κύτταρα και το υψηλό επίπεδο συντήρησής τους υποδηλώνει ότι παίζουν σημαντικό ρόλο στις θεμελιώδεις κυτταρικές διεργασίες. Αυτά τα γονίδια HSPs εκφράζουν τις πρωτεΐνες HSPs οι οποίες είναι γνωστό ότι παράγονται από τα κύτταρα ως απόκριση στην έκθεση σε στρεσογόνες συνθήκες. Περιγράφηκαν για πρώτη φορά σε σχέση με το θερμικό σοκ , αλλά είναι πλέον γνωστό ότι εκφράζονται επίσης κατά τη διάρκεια άλλων καταπονήσεων, συμπεριλαμβανομένης της έκθεσης στο κρύο, στο υπεριώδες φως και κατά την επούλωση τραυμάτων ή την αναδιαμόρφωση των ιστών αλλά και στη ρύθμιση της απόπτωσης. Η κύρια λειτουργία των HSP είναι να δρουν ως μοριακοί συνοδοί (chaperones) και να βοηθούν τη διαδικασία αναδίπλωσης των πρωτεϊνών. Στις πρωτεΐνες θερμικού σοκ δίδεται ονομασία και χωρίζονται σε οικογένειες ανάλογα με το

μοριακό τους βάρος(Kevin C. Kregel, 2002, Chen Hu et al., 2022). Για παράδειγμα οι Hsp70 αναφέρονται στην οικογένεια πρωτεϊνών θερμικού σοκ μεγέθους της τάξης των 70 kilodaltons.

1.3.1 Heat shock protein 70 (HSP70)

Οι πρωτεΐνες μοριακής μάζας 70 kDa, που ονομάζονται HSP70, είναι μοριακός συνοδός πρωταρχικής σημασίας για όλα τα κύτταρα θηλαστικών. Παράλληλα οι Hsp70 έχουν πολύ υψηλή δομική ομολογία και διατηρούν λειτουργικές ιδιότητες μεταξύ των ειδών. Για παράδειγμα, το Hsp70 της *Drosophila* μπορεί να συμπληρώσει το Hsp70 των θηλαστικών σε προστασία από το θερμικό στρες (D Sharma et al., 2009). Οι Hsp 70 έχουν ποικίλες λειτουργίες στον οργανισμό με τη πιο γνωστή και μελετημένη να είναι η συνεισφορά στη σωστή αναδίπλωση των πρωτεϊνών και στη διόρθωση των λανθασμένα αναδιπλωμένων πρωτεϊνών. Ωστόσο έχουν ρόλο και στην αποικοδόμηση ασταθών πρωτεϊνών καθώς και στην απόπτωση. Συγκεκριμένα αν μια πρωτεΐνη έχει υποστεί ανεπανόρθωτη βλάβη την κατευθύνουν για αποικοδόμηση μέσω της πρωτεασωμικής οδού ενώ σε άλλες περιπτώσεις μπορεί να παίξουν και κυτταροπροστατευτικό ρόλο αναστέλλοντας την απόπτωση, μειώνοντας την αποπτωτική σηματοδότηση εντός του κυττάρου μέσω της αλληλεπίδρασής τους με το BAX που είναι μία προ-αποπτωτική πρωτεΐνη σηματοδότησης(Loredana Basiricò et al., 2011). Επίσης χρησιμεύουν ως ρυθμιστικά σήματα για ανοσολογικές και φλεγμονώδεις αποκρίσεις. Η έκφραση HSP70 υπό θερμικό στρες αυξάνεται και μάλιστα περισσότερο σε σύγκριση με άλλα HSPs. Επομένως, το προφίλ έκφρασης HSP70 θα μπορούσε να είναι ωφέλιμο ως βιοδείκτης για τον προσδιορισμό της επίδρασης του θερμικού στρες στα ζώα (Dwi Nur Happy Hariyono et al., 2022).

Μηχανισμός έκφρασης HSP70

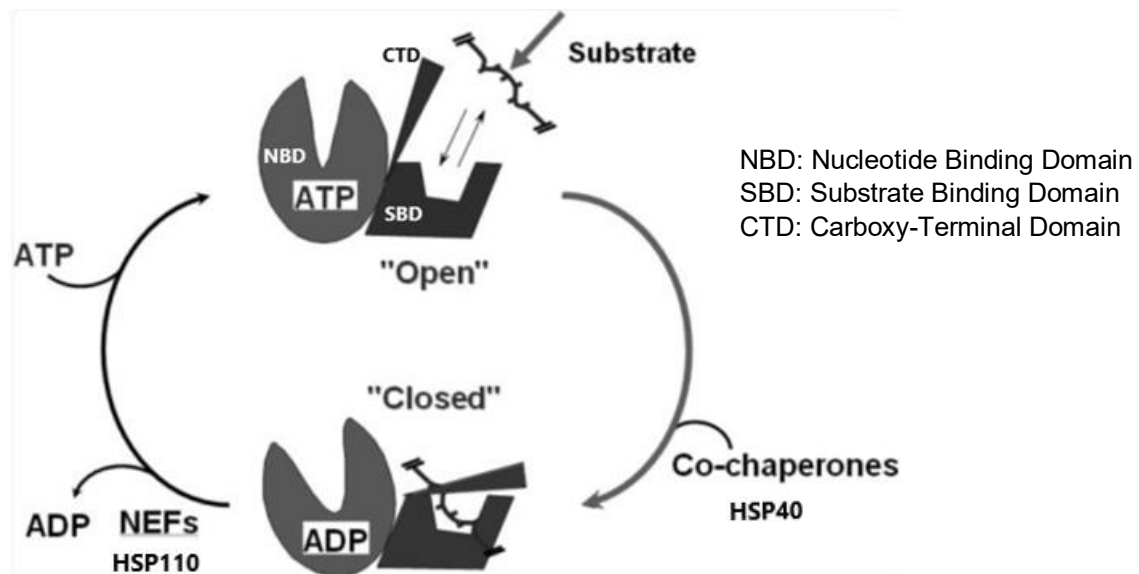


Εικόνα 4 Μοριακός μηχανισμός για την έκφραση του HSP70 μέσα σε ένα κύτταρο (Kevin C. Kregel, 2002).

Στην εικόνα 4 φαίνεται συνοπτικά ο μηχανισμός έκφρασης του HSP70. Σε φυσιολογικές καταστάσεις οι παράγοντες θερμικού σοκ (HSF), που υπάρχουν στο κυτταρόπλασμα, είναι δεσμευμένοι από πρωτεΐνες θερμικού σοκ (HSPs) και διατηρούνται σε ανενεργή κατάσταση. Ένα ευρύ φάσμα φυσιολογικών ερεθισμάτων («στρεσογόνοι παράγοντες») πιστεύεται ότι ενεργοποιεί τους HSF, προκαλώντας τον διαχωρισμό τους από τις HSP. Οι HSF φωσφορυλιώνονται (P) από πρωτεϊνικές κινάσες και σχηματίζουν τριμερή στο κυτταρόπλασμα. Αυτά τα σύμπλοκα τριμερούς HSF εισέρχονται στον πυρήνα και συνδέονται με στοιχεία θερμικού σοκ (HSE) στην περιοχή προαγωγέα του γονιδίου Hsp70. Το mRNA του Hsp70 στη συνέχεια μεταγράφεται και αφήνει τον πυρήνα για το κυτταρόπλασμα, όπου συντίθεται νέες Hsp70 οι οποίες στη συνέχεια επιτελούν τη λειτουργία τους ως μοριακοί συνοδοί. (Kevin C. Kregel, 2002)

Μηχανισμός δράσης HSP70

Οι πρωτεΐνες Hsp70 αποτελούνται από τρεις δομικούς τομείς: μια περιοχή αμινοτελικής ATPάσης 44 kDa (NBD) ακολουθούμενη από μια περιοχή σύνδεσης υποστρώματος 18 kD (SBD) και μια C-τελική 10 kD (CTD), η οποία σχηματίζει μια δομή που μοιάζει με καπάκι πάνω από τη θέση δέσμευση υποστρώματος, η οποία δομή βοηθά στην παγίδευση του υποστρώματος μέσα στην περιοχή σύνδεσης. Για τη λειτουργία της HSP70 απαιτείται η συνεργασία και των τριών τομέων. (D Sharma et al., 2009)



Εικόνα 5 Κύκλος δράσης των μοριακών συνοδών HSP 70 (D Sharma et al., 2009)

Το SBD αναγνωρίζει ένα μοτίβο που υπάρχει στις περισσότερες πρωτεΐνες κατά μέσο όρο σε κάθε 30 έως 40 βάσεις. Αυτό το μικρό μοτίβο πέντε βάσεων αποτελεί μια υδρόφοβη αλληλουχία και είναι συνήθως θαμμένο στον πυρήνα της πρωτεΐνης. Οπότε η προσβασιμότητά του σηματοδοτεί μια εσφαλμένη αναδίπλωση (María Rosario Fernández-Fernández et al., 2018).

Η λειτουργία των Hsp70 στηρίζεται στις διαμορφωτικές αλλαγές που προκύπτουν λόγω της υδρόλυσης του ATP. Η συνδεδεμένη με ATP μορφή του Hsp70 έχει χαμηλή συγγένεια δέσμευσης υποστρώματος και αυτό απομακρύνεται αμέσως μετά την πρόσδεσή του. Αντίθετα η συνδεδεμένη με ADP μορφή παρουσιάζει υψηλή συγγένεια. Όταν συνδεθεί στη SBD η λανθασμένα αναδιπλωμένη πρωτεΐνη δημιουργείται ένα σύμπλοκο HSP70-HSP40 που οδηγεί στην υδρόλυση της ATP. Η υδρόλυση ATP οδηγεί στο κλείσιμο του καπακιού και την παγίδευση του υποστρώματος (πρωτεΐνης) στον θύλακα σύνδεσης του υποστρώματος (SBD) ώστε να γίνει η σωστή αναδίπλωσή του (D Sharma et al., 2009). Ακολούθως το HSP40 φεύγει από το σύμπλεγμα και ο παράγοντας ανταλλαγής νουκλεοτιδίων (NEF) στρατολογείται στο σύμπλεγμα HSP70-πολυπεπτιδίου, διεγείροντας την ανταλλαγή από ADP σε ATP.

Οπότε η σύνδεση του ATP στο NBD του Hsp70 ανοίγει το καπάκι πάνω από την περιοχή δέσμευσης υποστρώματος και επάγει τόσο την απελευθέρωση του NEF όσο και του σωστά αναδιπλωμένου υποστρώματος και αφήνει το HSP70 έτοιμο για έναν νέο κύκλο (Anna E. Masser et al., 2020).

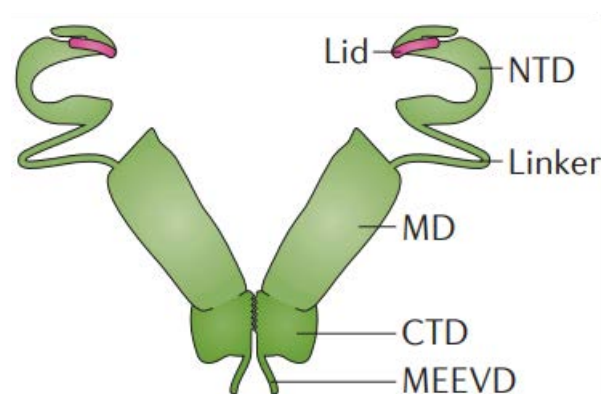
1.3.2 Heat shock protein 40 (HSP40)

Η οικογένεια γονιδίων HSP40 κωδικοποιεί για τις πρωτεΐνες HSP40, που αναφέρονται επίσης και ως DnaJ. Οι πρωτεΐνες Hsp40 δρουν ως co-chaperones (βοηθητικές πρωτεΐνες) των πρωτεϊνών Hsp70 με σκοπό την σωστή αναδίπλωση, μεταφορά και αποικοδόμηση των πρωτεϊνών. Για αυτή τη λειτουργία καθοριστικός και απαραίτητος είναι ο τομέας J των HSP40 που είναι μια εξαιρετικά διατηρημένη περιοχή των πρωτεϊνών. Συγκεκριμένα ο τομέας J των Hsp40 μπορεί να αλληλεπιδράσει με τον τομέα N-τερματικής ATPάσης των Hsp70. Η αλληλεπίδραση μπορεί να ρυθμίσει και να διεγείρει την δραστηριότητα της ATPάσης των Hsp70. Επιπλέον η C-τερματική περιοχή

των Hsp40 βοηθά στη φόρτωση των λανθασμένα αναδιπλωμένων πρωτεϊνών στις Hsp70 ώστε αυτές να τις διορθώσουν(Jingzhi Li et al., 2009).

1.3.3 Heat shock protein 90 (HSP90)

Οι πρωτεΐνες θερμικού σοκ 90 (Hsp90) είναι εξαιρετικά διατηρημένοι εξαρτώμενοι από το ATP μοριακοί συνοδοί που εμπλέκονται στην ομοιόσταση των πρωτεϊνών (Olivier Genest et al., 2018). Εκφράζονται σε όλα τα ευκαρυωτικά κύτταρα, και αποτελούν το 1% έως 2% των κυτταρικών πρωτεϊνών ακόμα και υπό συνθήκες μη στρες. Όμως αυξάνονται και αποτελούν έως και το 4%-6% των συνολικών πρωτεϊνών υπό συνθήκες θερμικού στρες (Zhao-Shi Xu et al., 2012). Επίσης σύμφωνα με επιστημονική μελέτη έχει αποδειχθεί ότι η αναστολή της λειτουργίας Hsp90 επηρεάζει την αποκατάσταση από θερμικό σοκ. Απουσία λειτουργίας των Hsp90, τα κύτταρα δεν μπορούν να δημιουργήσουν μια θερμοανεκτική κατάσταση, ακόμη και με την έντονη αφθονία των άλλων κατηγοριών HSP (Roger F Duncan et al., 2005).



Εικόνα 6 Σχηματική αναπαράσταση της δομής του διμερούς HSP90 (Florian H. Schopf et al., 2017).

Το HSP90 λειτουργεί ως ομοδιμερές και ο διμερισμός είναι απαραίτητος για τη λειτουργία του in vivo. Όπως αποτυπώνεται και στην εικόνα ένα μονομερές HSP90 αποτελείται από τρεις εξαιρετικά συντηρημένους τομείς οι οποίοι είναι:

- 1) Η αμινοτελική περιοχή (NTD), η οποία μεσολαβεί στη σύνδεση με το ATP.
- 2) Ο μεσαίος τομέας (MD), ο οποίος είναι σημαντικός για την υδρόλυση ATP και τη δέσμευση του HSP90 στα υποστρώματα.
- 3) Η καρβοξυτελική περιοχή (CTD), η οποία είναι υπεύθυνη για τον διμερισμό του HSP90.

Στο τέλος η καρβοξυτελική περιοχή περιέχει ένα μοτίβο Met-Glu-Glu-Val-Asp (MEEVD), το οποίο είναι σημαντικό για την αλληλεπίδραση με τις co-chaperones(Florian H. Schopf et al., 2017). Επίσης το NTD και το MD συνδέονται με έναν μακρύ, εύκαμπτο, φορτισμένο σύνδεσμο (linker) ο οποίος επιτρέπει στο NTD και το MD να πλησιάζουν ή να απομακρύνονται εύκολα μεταξύ τους, προσαρμόζοντας τις δομικές αλλαγές που είναι απαραίτητες για την αλληλεπίδραση του HSP90 με διάφορες πρωτεΐνες υποστρώματα(Otmar Hainzl et al., 2009).

Ελλείψει ATP, το HSP90 υιοθετεί μια ανοιχτή διαμόρφωση σε σχήμα V.

1.3.4 Heat shock protein 60 (HSP60)

Οι πρωτεΐνες θερμικού σοκ 60 (HSP60) είναι μοριακοί συνοδοί που βοηθούν στη σωστή αναδίπλωση των καινούριων πρωτεϊνών στον οργανισμό καθώς η δράση τους εντοπίζονται κυρίως στα μιτοχόνδρια (Jinliang Wang et al., 2019). Αυτή η δράση λαμβάνει χώρα και υπό συνθήκες θερμικού στρες (Javid Ahmad Malik et al., 2021). Η λειτουργία τους εξαρτάται από το ATP καθώς και από τη συνεργασία με τη co-chaperone HSP10 (Jinliang Wang et al., 2019). Επίσης οι Hsp60 εμφανίζονται όχι μόνο μέσα στα μιτοχόνδρια αλλά και σε άλλες ενδοκυτταρικές τοποθεσίες, για παράδειγμα στο κυτταρόπλασμα αλλά και εξωκυτταρικά. Ωστόσο εκεί φαίνεται να συμβάλουν σε άλλες λειτουργίες. Για παράδειγμα μπορεί να ευνοήσουν ή να αναστείλουν την απόπτωση σε ορισμένα καρκινικά κύτταρα (Celeste Caruso Bavisotto et al., 2020).

1.3.5 Heat shock protein 110 (HSP110)

Οι πρωτεΐνες θερμικού σοκ 110 kDa (Hsp110s) βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα των ευκαρυωτών και παίζουν ουσιαστικό ρόλο στη διατήρηση της ομοιόστασης των κυτταρικών πρωτεϊνών κατά περιόδους στρες αλλά δεν είναι απαραίτητες για τα θηλαστικά υπό κανονικές συνθήκες. Οι Hsp 110 λειτουργούν τόσο ως ανεξάρτητες συνοδοί (chaperones) όσο και ως co-chaperones για τις Hsp70 με τις οποίες έχουν και πολλές δομικές ομοιότητες. Ανεξάρτητα τα Hsp110 έχουν δράση συνοδού στην πρόληψη της συσσώρευσης μετουσιωμένων πρωτεϊνών. Ως co-chaperones λειτουργούν ως οι κύριοι παράγοντες ανταλλαγής νουκλεοτιδίων (NEFs) για τα κυτταροπλασματικά Hsp70. Δηλαδή συνδέονται με το HSP70 και επιτυγχάνουν την ανταλλαγή ADP με ATP (Liqing Hu et al., 2023).

1.3.6 Μικρές πρωτεΐνες θερμικού σοκ - Small Heat shock proteins (sHSP)

Οι sHSP ανήκουν στην οικογένεια των πρωτεϊνών θερμικού σοκ (HSP). Χαρακτηρίζονται από το μικρό τους μέγεθος (12-43 kDa) και μια διατηρημένη περιοχή α-κρυσταλλίνης (Zhihui Zhu et al., 2018, Maria K Janowska et al., 2019). Τα γονίδια sHSP εκφράζονται σε όλα τα βασίλεια της ζωής, συμπεριλαμβανομένων των βακτηρίων, των φυτών και των ζώων. Οι sHSP συνδέονται με μεγάλη ικανότητα με μια μεγάλη ποικιλία λανθασμένα αναδιπλωμένων πρωτεϊνών που κυμαίνονται από πεπτιδία έως μεγάλες πρωτεΐνες. Σε αντίθεση με τα εξαρτώμενα από ATP HSP (π.χ. HSP70, HSP90), τα sHSP λειτουργούν ανεξάρτητα από το ATP και δεν είναι σε θέση να επεξεργαστούν περαιτέρω τις δεσμευμένες πρωτεΐνες. Ο γενικός ρόλος τους φαίνεται να είναι να παγιδεύουν τις πρωτεΐνες με λανθασμένη αναδίπλωση σε μια κατάσταση από την οποία μπορούν να αναδιπλωθούν στη φυσική τους κατάσταση με τη βοήθεια συνοδών που εξαρτώνται από το ATP (Martin Haslbeck et al., 2018).

1.3.7 Παράγοντες θερμικού σοκ - Heat shock factors (HSFs)

Οι HSFs είναι μια οικογένεια μεταγραφικών παραγόντων που παίζουν κεντρικό ρόλο στην κυτταρική απόκριση στο στρες, ιδιαίτερα στο θερμικό στρες. Ρυθμίζουν την έκφραση των πρωτεϊνών θερμικού σοκ (HSP) βοηθώντας τα κύτταρα να επιβιώσουν και να προσαρμοστούν σε δυσμενείς συνθήκες. Οι HSF ενεργοποιούνται ως απόκριση σε παράγοντες στρες, όπως η άνοδος της θερμοκρασίας, ενώ είναι ανενεργοί σε κύτταρα που δεν υπόκεινται σε στρες. Οι HSF ενεργοποιούν παροδικά τη μεταγραφή των HSP καθώς δεσμεύονται στους προαγωγείς τους. Η οικογένεια HSF αποτελείται από τέσσερα μέλη στα θηλαστικά, οι HSF1, HSF2, HSF3 και HSF4. Ωστόσο ο HSF1 είναι ο κύριος ρυθμιστής της μεταγραφής των γονιδίων θερμικού σοκ σε απόκριση σε συνθήκες στρες (Dwi Nur Happy Hariyono et al., 2022).

1.4 Αλληλούχιση ολόκληρου του γονιδιώματος - Whole Genome Sequencing (WGS)

Η αλληλούχιση ολόκληρου του γονιδιώματος είναι η διαδικασία προσδιορισμού της πλήρους αλληλουχίας DNA ενός οργανισμού σε ένα μόνο πείραμα, συμπεριλαμβανομένης τόσο της κωδικοποιητικής όσο και της μη κωδικοποιητικής περιοχής. Η WGS επιτρέπει την ανίχνευση όλων των τύπων γενετικών παραλλαγών, συμπεριλαμβανομένων των single-nucleotide polymorphisms (SNPs). Αυτή η δυνατότητα έχει δώσει τεράστια ώθηση στη βιολογική έρευνα και έχει εφαρμογές μεταξύ άλλων στην εξειδικευμένη ιατρική (Petar Brlek et al., 2024), στην εξελικτική βιολογία, στη γενετική, στην γεωργική και κτηνοτροφική έρευνα (Jonah N Cullen et al. 2023).

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν δεδομένα αλληλούχισης ολόκληρου του γονιδιώματος από βοοειδή για να αποκαλυφθούν πιθανές μεταλλάξεις που συμβάλλουν στη θερμοανεκτικότητα.

1.5 Sift (Sorting Intolerant From Tolerant)

Είναι ένα ευρέως χρησιμοποιούμενο υπολογιστικό εργαλείο που προβλέπει εάν μια μη συνώνυμη μετάλλαξη θα επηρεάσει τη λειτουργία μιας πρωτεΐνης. Το SIFT βασίζεται στην εξελικτική διατήρηση των αμινοξέων στις πρωτεΐνες. Εάν μια θέση σε μια πρωτεΐνη διατηρείται σε μεγάλο βαθμό σε διαφορετικά είδη, είναι πιθανώς κρίσιμη για τη λειτουργία της πρωτεΐνης και οι αλλαγές σε αυτή τη θέση είναι πιο πιθανό να είναι επιβλαβείς. Οι βαθμολογίες κοντά στο μηδέν είναι πιο πιθανό να είναι επιβλαβείς. Οι μεταλλάξεις με βαθμολογία $< 0,05$ ταξινομούνται ως «επιβλαβείς» (deleterious), ενώ οι υπόλοιπες ως «ανεκτές» (tolerated) (Ngak-Leng Sim et al., 2012).

1.6 Αντιστοίχιση μεταλλάξεων με θερμοανοχή

Για να αντιστοιχίσουν τις μεταλλάξεις με τη θερμοαντοχή οι ερευνητές καταγράφουν διάφορες φυσιολογικές παραμέτρους υπό διαφορετικές συνθήκες στα άτομα με τους διαφορετικούς γονότυπους. Οι παράμετροι είναι η θερμοκρασία του σώματος (BT), η θερμοκρασία του ορθού (RT), ο αναπνευστικός ρυθμός (RR), οι καρδιακοί παλμοί (HR) και ο ρυθμός εφίδρωσης (SR). Αυτοί σχετίζονται με την ικανότητα των ζώων να αντέχουν το θερμικό στρες καθώς υπό το στρες οι παράμετροι αυξάνονται. Στα ζώα που μπορούν και μετριάζουν τις συνέπειες του θερμικού στρες η αύξηση αυτών των παραμέτρων είναι περιορισμένη. Με αυτό τον τρόπο μπορεί να γίνει μία πιθανή αντιστοίχιση μεταλλάξεων με θερμοανοχή (Dwi Nur Happy Hariyono et al., 2022, Gbolabo Olaitan Onasanya et al., 2021).

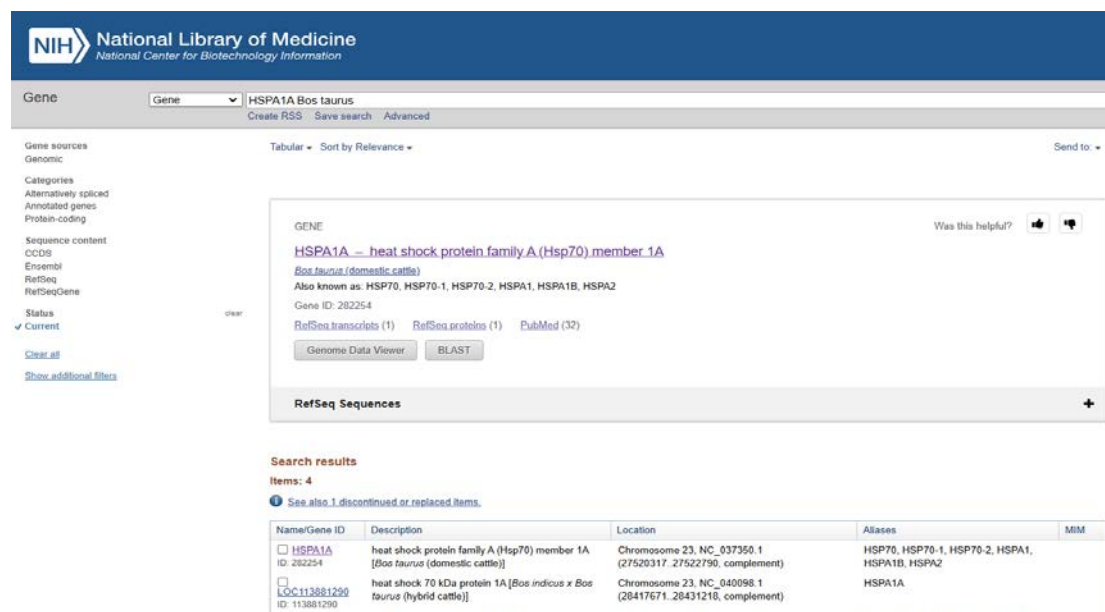
2. Σκοπός

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι να εντοπιστούν και να χαρτογραφηθούν οι μεταλλάξεις των πρωτεϊνών HSPs σε θερμοανθεκτικές αγελάδες και να βρεθεί σε ποιες περιοχές των γονιδίων βρίσκονται ώστε να ερευνηθεί ο πιθανός ρόλος τους στην εμφάνιση θερμοανθεκτικότητας.

3. Υλικά και Μέθοδοι

3.1 Αναζήτηση όλων των γονιδίων της οικογένειας HSP στις αγελάδες.

Η αναζήτηση έγινε με τη χρήση της βάσης δεδομένων NCBI gene και από ερευνητικά άρθρα. Στη βάση δεδομένων NCBI gene εκτός από την εύρεση των γονιδίων HSP στις αγελάδες υπάρχουν και στοιχεία για αυτά τα γονίδια όπως η αλληλουχία των νουκλεοτιδίων τους και η αλληλουχία των αμινοξέων της πρωτεΐνης που παράγουν.



The screenshot shows the NCBI Gene database interface. The search bar at the top contains 'HSPA1A Bos taurus'. Below the search bar, there are links for 'Create RSS', 'Save search', and 'Advanced'. The left sidebar lists various categories like 'Gene sources', 'Genomic', 'Categories', 'Sequence content', 'Status', and 'Current'. The main content area displays the gene details for HSPA1A, including its description as 'heat shock protein family A (Hsp70) member 1A' and its location on Chromosome 23. Below the gene details, there is a section for 'Search results' showing a table with columns for Name/Gene ID, Description, Location, Aliases, and MM. The table lists two entries: HSPA1A (ID: 282254) and LOC113881299 (ID: 113881299).

Name/Gene ID	Description	Location	Aliases	MM
HSPA1A ID: 282254	heat shock protein family A (Hsp70) member 1A [Bos taurus (domestic cattle)]	Chromosome 23, NC_037350.1 (27520317..27522790, complement)	HSP70, HSP70-1, HSP70-2, HSPA1, HSPA1B, HSPA2	
LOC113881299 ID: 113881299	heat shock 70 kDa protein 1A [Bos indicus x Bos taurus (hybrid cattle)]	Chromosome 23, NC_040098.1 (28417671..28431218, complement)	HSPA1A	

Εικόνα 7 Μορφή της σελίδας του ncbi gene κατά την αναζήτηση της ύπαρξης του γονιδίου HSPA1A στο είδος *Bos taurus* (domestic cattle).

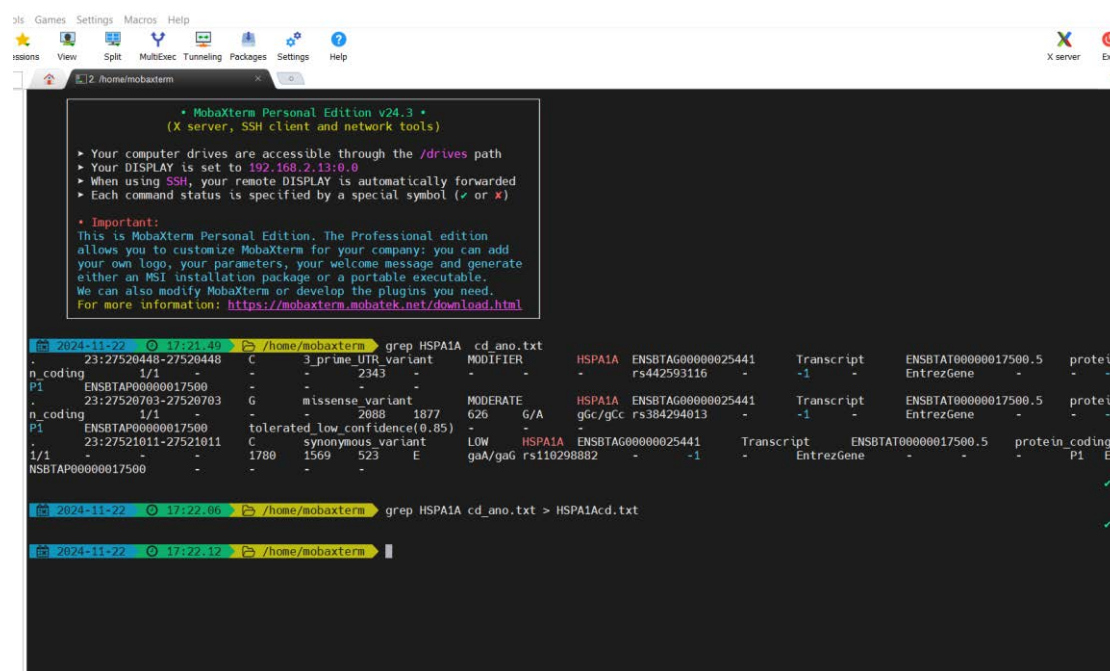
3.2 Εύρεση όλων των μεταλλάξεων σε γονίδια HSP από δεδομένα αλληλούχισης ολόκληρου γονιδιώματος από αγελάδες Holstein.

Από το αρχείο με τα δεδομένα της αλληλούχισης ολόκληρου του γονιδιώματος διαχωρίστηκαν σε άλλα αρχεία τα δεδομένα που αφορούσαν μεταλλάξεις των γονιδίων HSP.

Αυτό πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του προγράμματος MobaXterm. Με το συγκεκριμένο πρόγραμμα μέσω κάποιων εντολών εντοπίστηκαν τα δεδομένα που αφορούν τα συγκεκριμένα γονίδια και δόθηκε εντολή να καταχωρηθούν σε ξεχωριστά αρχεία σε συγκεκριμένο φάκελο.

Συγκεκριμένα με την εντολή `<< grep HSPA1A therm.txt > HSPA1Atherm.txt >>` δίνεται η εντολή στο πρόγραμμα να εντοπίσει τις αναφορές του γονιδίου HSPA1A μέσα στο αρχείο με το όνομα therm (εντολή: `grep HSPA1A therm.txt`) και στη συνέχεια να δημιουργήσει καινούργιο αρχείο txt στο οποίο να περιέχονται μόνο τα δεδομένα τα οποία αφορούν το HSPA1A και το καινούργιο αρχείο να το ονομάσει HSPA1Atherm (εντολή: `> HSPA1Atherm.txt`).

Η αντίστοιχη εντολή δόθηκε για όλα τα γονίδια της HSP οικογένειας ώστε να εντοπιστούν και να διαχωριστούν τα δεδομένα για αυτά.

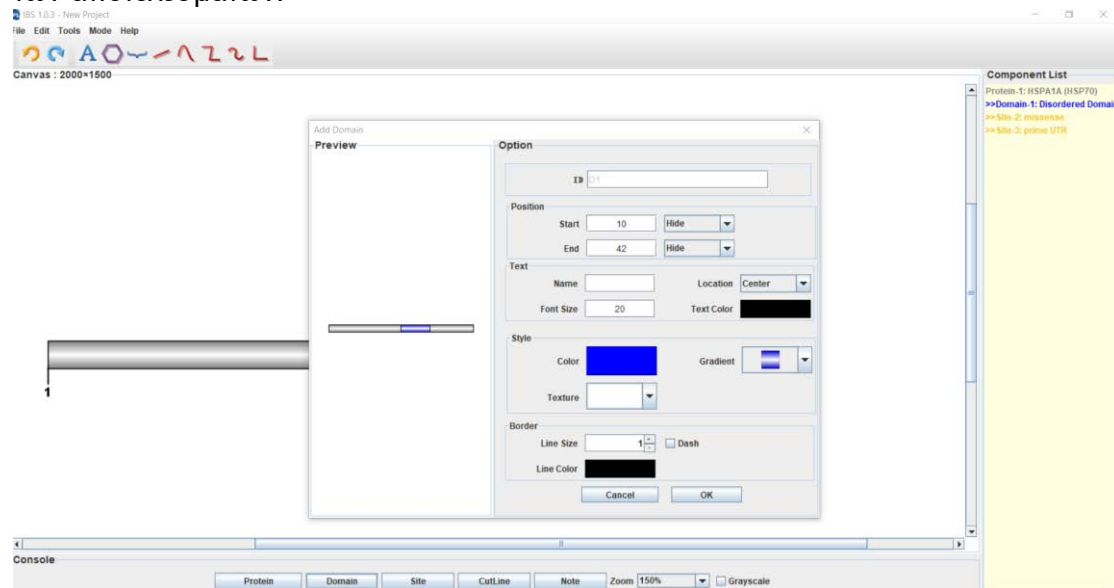


Εικόνα 8 Μορφή της σελίδας του MobaXterm κατά τον εντοπισμό και τη δημιουργία αρχείων με μεταλλάξεις συγκεκριμένων γονιδίων (πχ. του HSPA1A).

3.3 Εύρεση των περιοχών της πρωτεϊνικής αλληλουχίας που επηρεάζονται από τις μεταλλάξεις.

Μέσω της βάσης δεδομένων InterPro εντοπίστηκαν οι συγκεκριμένες domains των πρωτεϊνών όπου βρίσκεται η μετάλλαξη. Η InterPro ενσωματώνει δεδομένα από πολλαπλές βάσεις δεδομένων για να παρέχει αξιόπιστες πληροφορίες της δομής και της λειτουργίας της πρωτεΐνης. Είναι ένα ισχυρό εργαλείο για την ανάλυση των πρωτεϊνικών αλληλουχιών και την κατανόηση του βιολογικού τους ρόλου. Η αναζήτηση στην InterPro έγινε με την πρωτεϊνική ακολουθία η οποία βρέθηκε μέσω της βάσης δεδομένων NCBI.

το IBS κάτι που βοήθησε στον τομέα της επικοινωνίας και της συνοπτικής αποτύπωσης των αποτελεσμάτων.

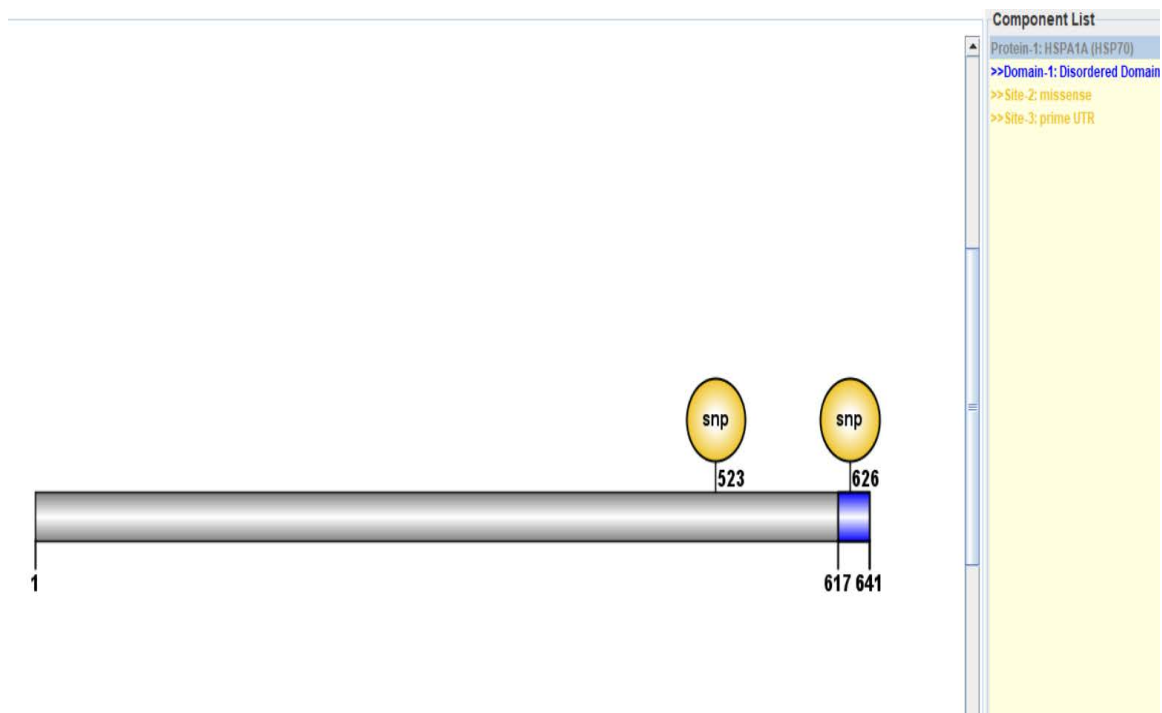


Εικόνα 11 Περιβάλλον εργασίας του IBS. Εισάγονται τα δεδομένα των πρωτεϊνών και αυτά αποτυπώνονται σχηματικά.

4. Αποτελέσματα

4.1 Οικογένεια πρωτεϊνών HSP70

4.1.1 HSPA1A



Εικόνα 12 Σχέδιο πρωτεΐνης HSPA1A με το πρόγραμμα IBS.

Το γονίδιο *HSPA1A* κωδικοποιεί πρωτεΐνες της οικογένειας HSP70 και εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 23. Η πρωτεΐνη HSPA1A αποτελείται από 641 αμινοξέα και είναι ιδιαίτερα χρήσιμη στην προστασία από το θερμικό στρες καθώς εμπλέκεται σε διάφορα ρυθμιστικά μονοπάτια που σχετίζονται με την απόκριση των κυττάρων στο στρες. Συγκεκριμένα διασφαλίζει τη σωστή αναδίπλωση των πρωτεϊνών και τη ρύθμιση της απόπτωσης (Sertaç Atalay et al., 2024). Σύμφωνα με τα δεδομένα της αλληλούχισης ολόκληρου γονιδιώματος στις θερμοανθεκτικές αγελάδες στο γονίδιο *HSPA1A* βρέθηκαν τρεις μεταλλάξεις.

1) Σημειακή μετάλλαξη στο αμινοξύ 626 της πρωτεΐνης. Ως αποτέλεσμα της σημειακής μετάλλαξης το αμινοξύ Γλυκίνη (G^CC) αντικαθίσταται από Αλανίνη (G^CC) στην ακολουθία της πρωτεΐνης. Η γλυκίνη είναι το μικρότερο αμινοξύ, παρέχοντας υψηλή ευελιξία λόγω της απλής δομής του (ένα μόνο άτομο υδρογόνου ως πλευρική αλυσίδα). Η αλανίνη παρότι είναι και αυτή μικρή, είναι μεγαλύτερη και πιο υδρόφοβη σε σύγκριση με τη γλυκίνη. Η ευελιξία της γλυκίνης, της επιτρέπει να υιοθετεί ένα ευρύ φάσμα γωνιών στρέψης, κάτι που είναι ζωτικής σημασίας σε περιοχές όπου η δομή της πρωτεΐνης απαιτεί στενές στροφές ή ασυνήθιστες διαμορφώσεις. Η αλανίνη, όντας μεγαλύτερη και λιγότερο ευέλικτη, δεν μπορεί να μιμηθεί αυτή τη συμπεριφορά. Η μεγαλύτερη πλευρική αλυσίδα της αλανίνης μπορεί να δημιουργήσει στερικές συγκρούσεις οδηγώντας σε εξογκώματα ή παραμορφώσεις στην τρισδιάστατη δομή της πρωτεΐνης. Αυτή η αλλαγή μπορεί να επηρεάσει τη συνολική σταθερότητα και λειτουργία της πρωτεΐνης.

Επίσης η μετάλλαξη γίνεται στην Διαταραγμένη περιοχή (Disordered Region) της πρωτεΐνης σύμφωνα με τη βάση δεδομένων UniProt.

Οι διαταραγμένες περιοχές στις πρωτεΐνες είναι περιοχές που δεν έχουν σταθερή τρισδιάστατη δομή. Με αυτό το δεδομένο μπορούμε να υποθέσουμε ότι εφόσον οι διαταραγμένες περιοχές δεν έχουν σταθερή δομή, μια αλλαγή αμινοξέος μπορεί να μην αλλάξει δραστικά τη συνολική αναδίπλωση της πρωτεΐνης.

Ωστόσο όπως προαναφέρθηκε οι πρωτεΐνες μοριακοί συνοδοί όπως οι Hsp70

υφίστανται μεγάλες διαμορφωτικές αναδιατάξεις που ρυθμίζουν τις αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης- υποστρώματος, οι οποίες εξαρτώνται από τη δέσμευση και υδρόλυση ATP καθώς και από co-chaperons. Μερικές από αυτές τις διαμορφωτικές αλλαγές έχουν συσχετιστεί με τις διαταραγμένες περιοχές (James C A Bardwell et al., 2012). Στην ανάλυση sift η μετάλλαξη χαρακτηρίστηκε ως ανεκτή με σκορ 0,85.

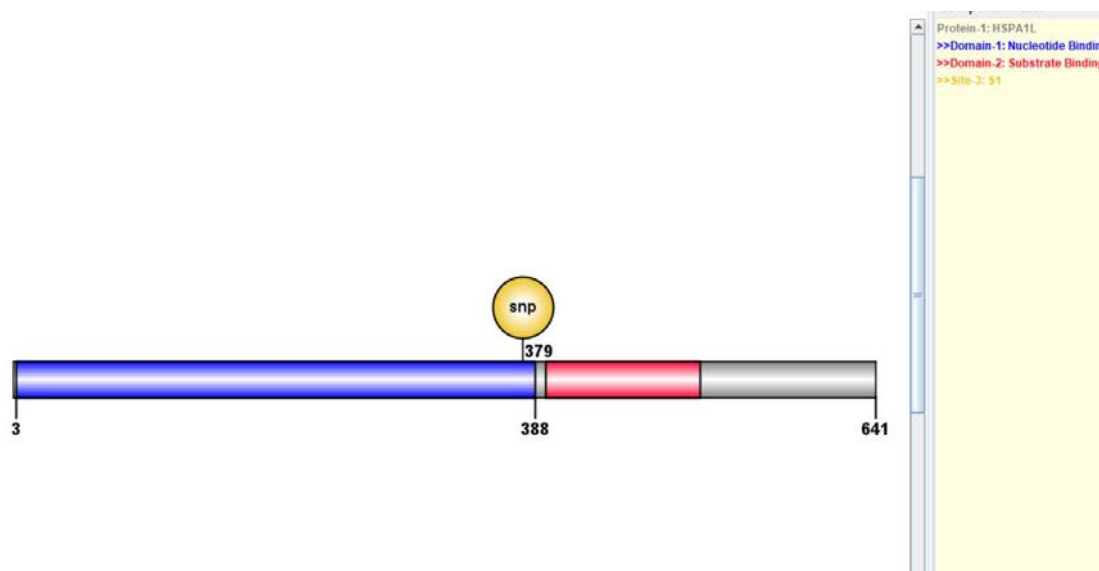
2) Συνώνυμη μετάλλαξη στο αμινοξύ 523 της πρωτεΐνης. Ως αποτέλεσμα το κωδικόνιο GAA αλλάζει σε GAG που όμως και τα δύο κωδικοποιούν το αμινοξύ γλουταμινικό οξύ λόγω του γεγονότος ότι ο γενετικός κώδικας είναι εκφυλισμένος.

Επειδή δεν αλλάζει το αμινοξύ στην αλληλουχία συνήθως δε παρατηρούνται σημαντικές επιπτώσεις στη δομή και τη λειτουργία της πρωτεΐνης που εκφράζεται. Παρόλα αυτά σε κάποιες περιπτώσεις μια συνώνυμη μετάλλαξη μπορεί να επηρεάσει τη μεταγραφή, το μάτισμα, τη μεταφορά mRNA και τη μετάφραση (J. V. Chamary et al., 2006). Σίγουρα όμως είναι πολύ πιο δύσκολο να επηρεάσει τη λειτουργία της πρωτεΐνης σε σχέση με μια σημειακή μετάλλαξη όπως αυτή που αναφέρθηκε νωρίτερα και επέφερε αλλαγή του αμινοξέος. Επίσης από τις βάσεις δεδομένων Uniprot και InterPro δε βρέθηκε κάποια γνωστή πρωτεϊνική domain στη θέση 523.

3) Μετάλλαξη στην 3' αμετάφραστη περιοχή του γονιδίου (UTR). Η 3' UTR αν και μεταγράφεται σε mRNA, δεν μεταφράζεται σε πρωτεΐνη. Οπότε η μετάλλαξη σε αυτή την περιοχή δεν αλλάζει την ακολουθία των αμινοξέων της πρωτεΐνης.

Ωστόσο τα SNP στην περιοχή 3' UTR μπορούν να επηρεάσουν τη μεταμεταγραφική ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης επηρεάζοντας τη σταθερότητα του mRNA και αλλάζοντας τις θέσεις δέσμευσης miRNA τα οποία επιδρούν στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης. Προηγούμενες μελέτες έχουν επίσης δείξει ότι τα miRNA παίζουν ρόλο στη θερμορύθμιση στοχεύοντας τα HSPs (Sertac Atalay et al., 2024).

4.1.2 HSPA1L



Εικόνα 13 Σχέδιο πρωτεΐνης HSPA1L με το πρόγραμμα IBS.

Το γονίδιο *HSPA1L* κωδικοποιεί πρωτεΐνες της οικογένειας HSP70 και εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 23.

Σύμφωνα με τα δεδομένα της αλληλούχισης ολόκληρου γονιδιώματος στις θερμοανθεκτικές αγελάδες στο γονίδιο *HSPA1L* βρέθηκαν έξι μεταλλάξεις.

1) Συνώνυμη μετάλλαξη στο αμινοξύ 379 της πρωτεΐνης. Ως αποτέλεσμα το κωδικόνιο GCA αλλάζει σε GCG που όμως και τα δύο κωδικοποιούν το αμινοξύ Αλανίνη. Η θέση 379 βρίσκεται εντός της Nucleotide-binding domain (NBD) της πρωτεΐνης σύμφωνα με τη βάση δεδομένων UniProt. Η συγκεκριμένη περιοχή είναι υπεύθυνη για τη σύνδεση και τη υδρόλυση του ATP, συνδέεται αλλοστερικά με την περιοχή σύνδεσης υποστρώματος (SBD) και σχετίζεται με τη σύνδεση του υποστρώματος κάτι που περιγράφηκε στην εισαγωγή. Οπότε η μετάλλαξη είναι σε σημαντική περιοχή για τη λειτουργία της πρωτεΐνης.

2) Μετάλλαξη στην 3' αμετάφραστη περιοχή του γονιδίου (UTR).

3) Τέσσερις μεταλλάξεις στην περιοχή των ιντρονίων. Τα ιντρόνια είναι μη κωδικοποιητικές περιοχές ενός μεταγράφου RNA, ή του DNA που το κωδικοποιεί, τα οποία απομακρύνονται με το μάτισμα πριν από τη μετάφραση. Παρόλα αυτά οι μεταλλάξεις σε αυτά τα σημεία μπορεί να επηρεάσουν τη γονιδιακή έκφραση. Καταρχάς μεταλλάξεις στην περιοχή των ιντρονίων μπορεί να επηρεάσουν τη διαδικασία του μάτισματος και οδηγούν στη συμπερίληψη ιντρονικών αλληλουχιών σε ώριμο mRNA (κατακράτηση ιντρονίων) ή αποκλεισμό βασικών εξονίων (παράλειψη εξονίων)(15,16). Επίσης ορισμένα εσώνια εκφράζουν microRNA (miRNAs) που ρυθμίζουν την έκφραση γονιδίων μετά τη μεταγραφή. Μεταλλάξεις που τα τροποποιούν μπορεί να επηρεάσουν την έκφραση των πρωτεϊνών (Shi-Lung Lin et al., 2006). Επιπλέον τα ιντρόνια περιέχουν συχνά ρυθμιστικά στοιχεία όπως ενισχυτές της γονιδιακής έκφρασης(Alan B. Rose et al., 2018) ενώ τα εσώνια εμπλέκονται και σε διαδικασίες επιγενετικών τροποποιήσεων (Geoffray Monteuis et al., 2019).

4.1.3 HSPA2

Το γονίδιο *HSPA2* κωδικοποιεί πρωτεΐνες της οικογένειας HSP70, εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 10 και η πρωτεΐνη που κωδικοποιεί αποτελείται από 631 αμινοξέα.

Σε αυτό το γονίδιο εντοπίστηκε μία μόνο μετάλλαξη στην 3' αμετάφραστη περιοχή (UTR).

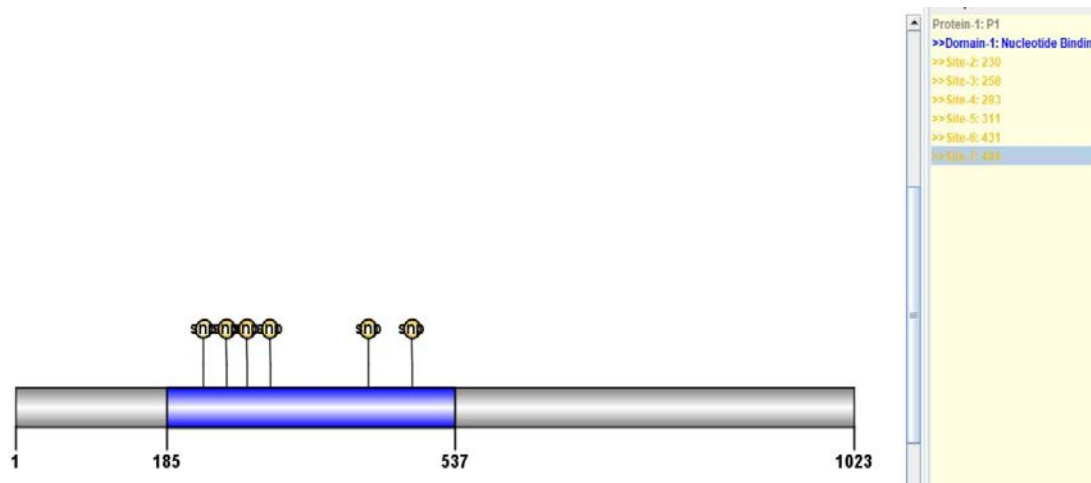
Στις θερμοευαίσθητες αγελάδες εντοπίστηκαν 2 συνώνυμες μεταλλάξεις στα αμινοξέα 209 και 308. Σε αναζήτηση στη Interpro δε βρέθηκε κάποια συγκεκριμένη domain σε αυτές τις θέσεις.

4.1.4 HSPA4

Το γονίδιο *HSPA4* κωδικοποιεί πρωτεΐνες της οικογένειας HSP70 και εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 7.

Στις θερμοανθεκτικές αγελάδες σε αυτό το γονίδιο εντοπίστηκαν 15 μεταλλάξεις όλες σε περιοχές ιντρονίων.

4.1.5 HSPA4L



Εικόνα 14 Σχέδιο πρωτεΐνης HSPA4L με το πρόγραμμα IBS.

Το γονίδιο *HSPA4L* κωδικοποιεί πρωτεΐνες της οικογένειας HSP70, εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 17 και η πρωτεΐνη που εκφράζει αποτελείται από 1023 αμινοξέα. Σύμφωνα με τα δεδομένα της αλληλούχησης ολόκληρου γονιδιώματος στις θερμοανθεκτικές αγελάδες στο γονίδιο *HSPA4L* βρέθηκαν 76 μεταλλάξεις.

1) Σημειακές μεταλλάξεις στα αμινοξέα 230, 258, 283, 311, 431, 484 της πρωτεΐνης. Όλα αυτά τα αμινοξέα εντοπίζονται σύμφωνα με τη βάση δεδομένων UniProt εντός της Nucleotide-binding domain (NBD) της πρωτεΐνης, της οποίας η λειτουργία επεξηγήθηκε πιο πάνω.

Στις μεταλλάξεις 230, 258 και 431 το γλουταμινικό οξύ (E) μετατρέπεται σε ασπαρτικό οξύ (D) (gaA/gaC). Το γλουταμινικό οξύ όσο και το ασπαρτικό οξύ έχουν παρόμοιες ιδιότητες (αρνητικό φορτίο και πολικότητα). Ωστόσο το γλουταμινικό οξύ έχει μεγαλύτερη πλευρική αλυσίδα από το ασπαρτικό οξύ. Αυτή η αλλαγή μπορεί να επηρεάσει τη συνολική σταθερότητα και λειτουργία της πρωτεΐνης.

Στις μεταλλάξεις 283, 311 και 484 η Αλανίνη (A) μετατρέπεται σε Θρεονίνη (T) (Gct/Act). Η αλανίνη είναι ένα μικρό, μη πολικό, υδρόφοβο αμινοξύ. Συχνά βρίσκεται στον υδρόφοβο πυρήνα ή σε περιοχές της πρωτεΐνης που δεν αλληλεπιδρούν άμεσα με το νερό ή άλλα μόρια. Όμως η θρεονίνη είναι ένα πολικό, αφόρτιστο αμινοξύ. Περιέχει μια ομάδα υδροξυλίου (-OH), που την καθιστά πιο υδρόφιλη και ικανή να σχηματίζει δεσμούς υδρογόνου. Αυτή η αντικατάσταση από ένα μη πολικό σε ένα πολικό υπόλειμμα θα μπορούσε να αλλάξει σε κάποιο βαθμό τις ιδιότητες της πρωτεΐνης και σε μεγαλύτερο βαθμό από τις μεταλλάξεις στα 230, 258 και 431 αμινοξέα που αναφέρθηκαν νωρίτερα, ιδιαίτερα αν συνυπολογιστεί το γεγονός ότι τα συγκεκριμένα σηρ βρίσκονται σε μια βασική περιοχή της πρωτεΐνης όπως η NBD.

Στην ανάλυση sift οι μεταλλάξεις στις θέσεις 230, 258 και 431 χαρακτηρίστηκαν ως ανεκτές ενώ αυτές στις θέσεις 283, 311 και 484 χαρακτηρίστηκαν ως επιβλαβείς με σκορ 0,02.

2) 70 μετάλλαξεις που βρίσκονται στην περιοχή των ιντρονίων.

Στις θερμοευαίσθητες αγελάδες εντοπίστηκαν 38 μεταλλάξεις που βρίσκονται στην περιοχή των ιντρονίων.

4.1.6 HSPA6

Το γονίδιο *HSPA6* κωδικοποιεί πρωτεΐνες της οικογένειας HSP70, εντοπίζεται στο

χρωμόσωμα 3 και η πρωτεΐνη που εκφράζει αποτελείται από 643 αμινοξέα. Σύμφωνα με τα δεδομένα της αλληλούχισης ολόκληρου γονιδιώματος στις θερμοανθεκτικές αγελάδες στο γονίδιο *HSPA6* βρέθηκε μία μετάλλαξη. Στο αμινοξύ 294 εντοπίστηκε συνώνυμη μετάλλαξη. Ως αποτέλεσμα το κωδικόνιο TCC αλλάζει σε TCT που όμως και τα δύο κωδικοποιούν το αμινοξύ Σερίνη.

4.1.7 HSPA8

Το γονίδιο *HSPA8* κωδικοποιεί πρωτεΐνες τις οικογένειας HSP70, εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 15.

Στις θερμοευαίσθητες αγελάδες εντοπίστηκαν 3 μεταλλάξεις που βρίσκονται στην περιοχή των ιντρονίων.

4.1.8 HSPA9

Το γονίδιο *HSPA9* κωδικοποιεί πρωτεΐνες τις οικογένειας HSP70, εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 7.

Στις θερμοευαίσθητες αγελάδες εντοπίστηκαν 10 μεταλλάξεις σε περιοχές ιντρονίων. Επίσης εντοπίστηκε μία συνώνυμη μετάλλαξη στο αμινοξύ 114 της αλληλουχίας της πρωτεΐνης. Στην περιοχή αυτή σύμφωνα με τη UniProt βρίσκεται η περιοχή αλληλεπίδρασης με το NFS1. Το γονίδιο NFS1 κωδικοποιεί το ένζυμο δεσουλφουράση της κυστεΐνης, μια κρίσιμη πρωτεΐνη που εμπλέκεται στη βιοσύνθεση συστάδων σιδήρου-θείου (Fe-S). Αυτές οι ομάδες είναι βασικοί συμπαράγοντες για πολλές πρωτεΐνες, ιδιαίτερα εκείνες που εμπλέκονται στην κυτταρική αναπνοή, την επιδιόρθωση του DNA και άλλες θεμελιώδεις μεταβολικές διεργασίες.

4.1.9 HSPA12A

Το γονίδιο *HSPA12A* κωδικοποιεί πρωτεΐνες τις οικογένειας HSP70, εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 26 και η πρωτεΐνη που εκφράζει αποτελείται από 692 αμινοξέα.

Σύμφωνα με τα δεδομένα της αλληλούχισης ολόκληρου γονιδιώματος στις θερμοανθεκτικές αγελάδες στο γονίδιο *HSPA12* βρέθηκαν 71 μεταλλάξεις.

1) Μεταλλάξεις σε 69 σημεία που βρίσκονται στην περιοχή των ιντρονίων.

2) Συνώνυμες μεταλλάξεις στα αμινοξέα 447 και 463 της πρωτεΐνης. Ως αποτέλεσμα το κωδικόνιο GAC αλλάζει σε GAT που όμως και τα δύο κωδικοποιούν το αμινοξύ Ασπαρτικό οξύ.

Στις θερμοευαίσθητες αγελάδες εντοπίστηκαν 329 μεταλλάξεις σε περιοχές ιντρονίων εκ των οποίων δύο είναι σε περιοχές ματίσματος. Αυτές οι δύο μεταλλάξεις μπορεί να επηρεάσουν σημαντικά την έκφραση του γονιδίου. Η συγκεκριμένη μετάλλαξη μπορεί να οδηγήσει στο να παραμείνουν στο ώριμο mRNA και να εκφραστούν περιοχές των ιντρονίων οι οποίες κανονικά θα έπρεπε να απομακρυνθούν κατά τη διαδικασία του ματίσματος. Αυτό συχνά οδηγεί στη δημιουργία τροποποιημένων και μη φυσιολογικών πρωτεϊνών.

Επίσης εντοπίστηκαν δύο μεταλλάξεις στην 3' UTR.

4.1.10 HSPA12B

Το γονίδιο *HSPA12B* κωδικοποιεί πρωτεΐνες τις οικογένειας HSP70, εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 13.

Στις θερμοευαίσθητες αγελάδες εντοπίστηκαν 2 μεταλλάξεις στις περιοχές ιντρονίων.

4.1.11 HSPA13

Το γονίδιο *HSPA13* κωδικοποιεί πρωτεΐνες τις οικογένειας HSP70, εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 1 και η πρωτεΐνη που εκφράζει αποτελείται από 471 αμινοξέα.

Σύμφωνα με τα δεδομένα της αλληλούχισης ολόκληρου γονιδιώματος στις θερμοανθεκτικές αγελάδες στο γονίδιο *HSPA13* βρέθηκαν 4 μεταλλάξεις που βρίσκονται στην περιοχή των ιντρονίων.

Στις θερμοευαίσθητες αγελάδες εντοπίστηκαν 10 μεταλλάξεις στις περιοχές των ιντρονίων.

4.1.12 HSPA14

Το γονίδιο *HSP14* κωδικοποιεί πρωτεΐνες της οικογένειας HSP70, εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 13 και η πρωτεΐνη που εκφράζει αποτελείται από 509 αμινοξέα.

Σύμφωνα με τα δεδομένα της αλληλούχισης ολόκληρου γονιδιώματος στις θερμοανθεκτικές αγελάδες στο γονίδιο *HSPA14* βρέθηκαν 7 μεταλλάξεις.

1) Μεταλλάξεις σε 4 σημεία που βρίσκονται στην περιοχή των ιντρονίων.

2) Συνώνυμη μετάλλαξη στο αμινοξύ 85 της πρωτεΐνης. Ως αποτέλεσμα το κωδικόνιο GGC αλλάζει σε GGT που όμως και τα δύο κωδικοποιούν το αμινοξύ Γλυκίνη. Η μετάλλαξη σύμφωνα με τη βάση δεδομένων Interpro συμβαίνει εντός της Nucleotide-binding domain της πρωτεΐνης.

3) Δύο μεταλλάξεις στην 5' αμετάφραστη περιοχή του γονιδίου (UTR). Η 5' UTR είναι η περιοχή του mRNA ανάντη του κωδικονίου έναρξης και ενώ δεν κωδικοποιεί την πρωτεΐνη, παίζει κρίσιμο ρόλο στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης. Περιέχει πολλά ρυθμιστικά στοιχεία που εμπλέκονται στο μάτισμα, στη σταθερότητα και την έκφραση του mRNA, στην έναρξη της μετάφρασης ενώ περιέχει και θέσεις δέσμευσης microRNA και διαφόρων μεταγραφικών παραγόντων (Natalia Ryczek et al., 2023, Zaheer Abbas et al., 2020).

Στις θερμοευαίσθητες αγελάδες εντοπίστηκαν 3 μεταλλάξεις στις περιοχές των ιντρονίων.

4.1.13 HSPBP1

Το γονίδιο *HSPBP1* κωδικοποιεί πρωτεΐνες της οικογένειας HSP70, εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 18 και η πρωτεΐνη που εκφράζει αποτελείται από 357 αμινοξέα.

Σύμφωνα με τα δεδομένα της αλληλούχισης ολόκληρου γονιδιώματος στις θερμοανθεκτικές αγελάδες στο γονίδιο *HSPBP1* βρέθηκαν 5 μεταλλάξεις.

1) Οι 4 μεταλλάξεις βρίσκονται στην περιοχή των ιντρονίων.

2) Συνώνυμη μετάλλαξη στο αμινοξύ 315 της πρωτεΐνης. Ως αποτέλεσμα το κωδικόνιο CTG αλλάζει σε TTG που όμως και τα δύο κωδικοποιούν το αμινοξύ Λευκίνη.

Στις θερμοευαίσθητες αγελάδες εντοπίστηκαν 2 μεταλλάξεις στις περιοχές των ιντρονίων.

4.2 Οικογένεια HSP90

4.2.1 HSP90AA1

Το γονίδιο *HSPAA1* κωδικοποιεί πρωτεΐνες της οικογένειας HSP90 και εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 21.

Στις θερμοανθεκτικές αγελάδες εντοπίστηκε μία μετάλλαξη στην περιοχή των ιντρονίων ενώ στις θερμοευαίσθητες μία στην περιοχή του 3'UTR.

4.2.2 HSP90AB1

Το γονίδιο *HSPAB1* κωδικοποιεί πρωτεΐνες τις οικογένειας HSP90 και εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 23 και κωδικοποιεί 724 αμινοξέα.

Στις θερμοευαίσθητες αγγελάδες εντοπίστηκε μία συνώνυμη μετάλλαξη στο αμινοξύ 514 της πρωτεΐνης.

4.2.3 HSP90B1

Το γονίδιο *HSPB1* κωδικοποιεί πρωτεΐνες τις οικογένειας HSP90 και εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 5. Στις θερμοανθεκτικές αγγελάδες εντοπίστηκαν δύο μεταλλάξεις στις περιοχές των ιντρονίων.

4.3 Οικογένεια HSP110

4.3.1 HSPH1

Το γονίδιο *HSPH1* κωδικοποιεί πρωτεΐνες τις οικογένειας HSP110, εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 12 και αποτελείται από 859 αμινοξέα.

Στις θερμοανθεκτικές αγγελάδες εντοπίστηκαν 2 μεταλλάξεις στις περιοχές των ιντρονίων. Στις θερμοευαίσθητες αγγελάδες εντοπίστηκαν 5 μεταλλάξεις στις περιοχές των ιντρονίων και μία συνώνυμη μετάλλαξη στη θέση 688. Η θέση αυτή δε βρίσκεται σε κάποια κρίσιμη domain για τη λειτουργία της πρωτεΐνης σύμφωνα με την βάση δεδομένων InterPro.

4.4 Οικογένεια HSP60

4.4.1 HSPD1

Το γονίδιο *HSPD1* κωδικοποιεί πρωτεΐνες τις οικογένειας HSP60 και εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 2.

Στις θερμοανθεκτικές αγγελάδες εντοπίστηκαν 4 μεταλλάξεις στις περιοχές των ιντρονίων.

Στις θερμοευαίσθητες αγγελάδες εντοπίστηκαν 4 μεταλλάξεις στις περιοχές των ιντρονίων και μία μετάλλαξη στην περιοχή 5'UTR.

4.5 Οικογένεια HSP10

4.5.1 HSPE1

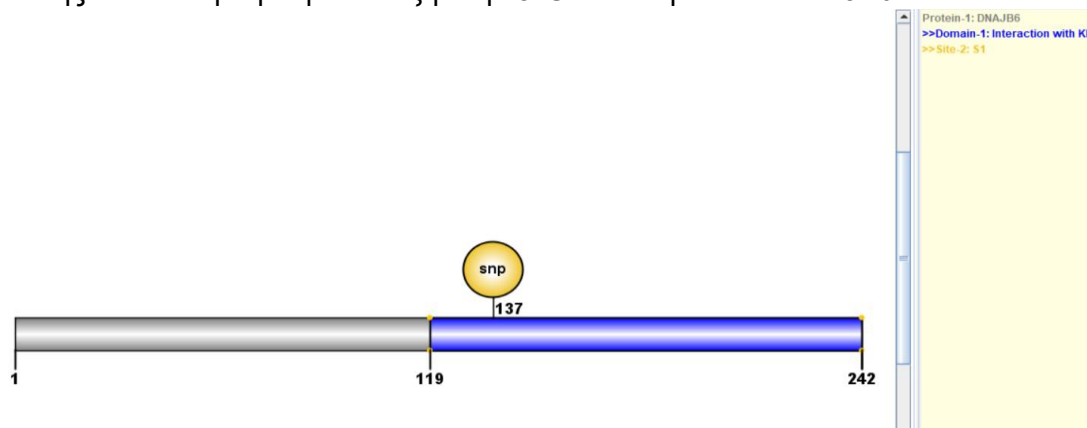
Το γονίδιο *HSPE1* κωδικοποιεί πρωτεΐνες τις οικογένειας HSP10 και εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 2.

Στις θερμοευαίσθητες αγγελάδες εντοπίστηκαν 3 μεταλλάξεις στις περιοχές των ιντρονίων.

4.6 Οικογένεια HSP40

Στις θερμοανθεκτικές αγγελάδες στα γονίδια της υποοικογένειας DNAJB που κωδικοποιούν πρωτεΐνες της οικογένειας HSP40 εντοπίστηκαν συνολικά 92 μεταλλάξεις στις περιοχές των ιντρονίων.

Επίσης εντοπίστηκε μία μετάλλαξη στην 3' UTR του γονιδίου *DNAJB6*.



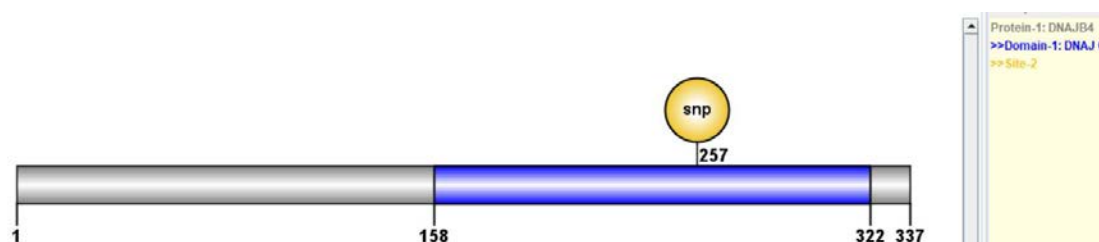
Εικόνα 15 Σχέδιο πρωτεΐνης *DNAJB6* με το πρόγραμμα IBS.

Επιπλέον μία σημειακή μετάλλαξη (Missense) στο γονίδιο *DNAJB6* (κωδικοποιεί 242 αμινοξέα και βρίσκεται στο χρωμόσωμα 4) στο αμινοξύ 137. Λόγω αυτής της μετάλλαξης το αμινοξύ Θρεονίνη (ACG) μετατρέπεται στο αμινοξύ Μεθειονίνη (ATG). Αυτή η μετάλλαξη θα μπορούσε να επηρεάσει τη δομή, τη σταθερότητα ή τη λειτουργία της πρωτεΐνης καθώς η θρεονίνη είναι πολικό, υδρόφιλο αμινοξύ και περιέχει μια ομάδα υδροξυλίου (-OH), η οποία μπορεί να σχηματίσει δεσμούς υδρογόνου ή να υποστεί φωσφορυλίωση. Αντίθετα η μεθειονίνη είναι μη πολικό, υδρόφοβο αμινοξύ το οποίο περιέχει ένα άτομο θείου, το οποίο μπορεί να συμμετέχει σε συγκεκριμένες χημικές αντιδράσεις, αλλά στερείται της ομάδας -OH.

Σε αναζήτηση στη βάση δεδομένων Uniprot βρέθηκε ότι αυτή η μετάλλαξη συμβαίνει εντός της περιοχής αλληλεπίδρασης με το KRT18.

Η KRT18 (Κερατίνη 18) είναι μια πρωτεΐνη καθοριστικό ρόλο στη διατήρηση της δομικής ακεραιότητας και λειτουργικότητας των επιθηλιακών κυττάρων ιδιαίτερα σε συνθήκες μηχανικής και φυσικής καταπόνησης οπότε και στο θερμικό στρες (Ichiro Izawa et al., 2000).

Στην ανάλυση sift η μετάλλαξη χαρακτηρίστηκε ως ανεκτή.



Εικόνα 16 Σχέδιο πρωτεΐνης *DNAJB4* με το πρόγραμμα IBS.

Τέλος εντοπίστηκε μία ακόμα σημειακή μετάλλαξη (Missense) στο γονίδιο *DNAJB4*. Το συγκεκριμένο γονίδιο εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 3 και αποτελείται από 337 αμινοξέα. Η σημειακή μετάλλαξη εντοπίστηκε στο 257 αμινοξύ της πρωτεΐνης. Λόγω αυτής της μετάλλαξης το αμινοξύ Σερίνη (AGT) μετατρέπεται στο αμινοξύ Ασπαραγίνη (AAT). Αυτά είναι και τα δύο πολικά αμινοξέα αλλά έχουν διαφορετικές πλευρικές ομάδες καθώς η Σερίνη περιέχει μία ομάδα υδροξυλίου ενώ η Ασπαραγίνη μία ομάδα αμιδίου. Σημαντική διαφορά είναι ότι η σερίνη μπορεί να υποστεί φωσφορυλίωση από τις κινάσες λόγω της παρουσίας της ομάδας υδροξυλίου (-OH) στην πλευρική της αλυσίδα

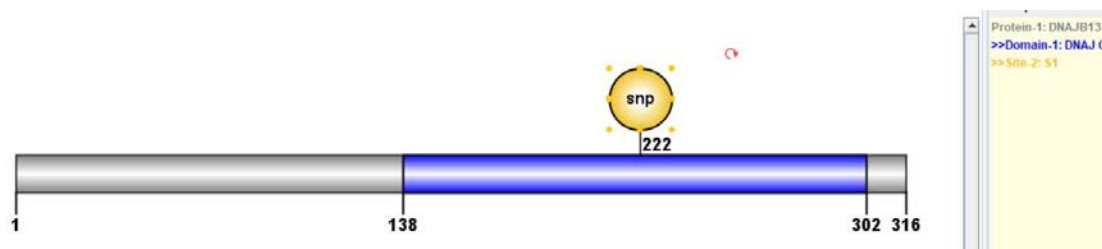
ενώ η ασπαραγίνη όχι.

Σε αναζήτηση στη βάση δεδομένων InterPro βρέθηκε ότι αυτή η μετάλλαξη συμβαίνει εντός της DnaJ C-terminal Domain της πρωτεΐνης. Η συγκεκριμένη περιοχή παίζει ρόλο στην αναγνώριση και τη δέσμευση υποστρωμάτων πρωτεϊνών που δεν έχουν υποστεί σωστή αναδίπλωση και στη συνέχεια στη μεταφορά τους στις πρωτεΐνες HSP70 (Jingzhi Li et al., 2009).

Στην ανάλυση sift η μετάλλαξη χαρακτηρίστηκε ως επιβλαβής με σκορ 0,04.

Στις θερμοευαίσθητες αγελάδες στα γονίδια της υποοικογένειας DNAJB εντοπίστηκαν 169 μεταλλάξεις στις περιοχές των ιντρονίων, 2 μεταλλάξεις σε περιοχές της 3' αμετάφραστης περιοχής του γονιδίου (UTR), μία συνώνυμη μετάλλαξη και μία σημειακή μετάλλαξη (Missense).

Η συνώνυμη μετάλλαξη εντοπίστηκε στο γονίδιο DNAJB1 το οποίο κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη 340 αμινοξέων και η θέση της μετάλλαξης είναι στο 131 αμινοξύ (φαινουλαανίνη). Σε αναζήτηση στην interpro δε προκύπτει ότι στη συγκεκριμένη θέση βρίσκεται κάποια συγκεκριμένη domain κρίσιμη για τη λειτουργία της πρωτεΐνης.



Εικόνα 17 Σχέδιο πρωτεΐνης DNAJB13 με το πρόγραμμα IBS.

Η σημειακή μετάλλαξη (Missense) εντοπίστηκε στο γονίδιο DNAJB13 το οποίο κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη 316 αμινοξέων.

Η θέση της μετάλλαξης είναι στο 222 αμινοξύ και η Αργινίνη αντικαθίσταται από Ιστιδίνη. Φυσικά αυτά είναι δύο διαφορετικά αμινοξέα οπότε πιθανώς θα υπάρχουν διαφορές. Η αργινίνη είναι πάντα θετικά φορτισμένη, ενώ το φορτίο της ιστιδίνης εξαρτάται από το pH. Η πλευρική αλυσίδα της ιστιδίνης είναι μικρότερη και λιγότερο εύκαμπτη από την αργινίνη, γεγονός που μπορεί να διαταράξει τη δομική ακεραιότητα της πρωτεΐνης.

Σύμφωνα με την InterPro η μετάλλαξη αυτή γίνεται εντός DnaJ C-terminal Domain της πρωτεΐνης που όπως επεξηγήθηκε παραπάνω παίζει κρίσιμο ρόλο στις λειτουργίες της πρωτεΐνης.

Στην ανάλυση sift η μετάλλαξη χαρακτηρίστηκε ως ανεκτή.

Στις θερμοανθεκτικές αγελάδες στα γονίδια της υποοικογένειας DNAJC που κωδικοποιούν πρωτεΐνες της οικογένειας HSP40 εντοπίστηκαν συνολικά 842 μεταλλάξεις στις περιοχές των ιντρονίων.

Στη πρωτεΐνη DNAJC28 (αποτελείται από 380 αμινοξέα) εντοπίστηκε σημειακή μετάλλαξη στο αμινοξύ 336. Εξαιτίας της μετάλλαξης μια Τυροσίνη (Y) αντικαθίσταται σε Κυστεΐνη (C). Αυτά και τα δύο είναι πολικά αμινοξέα. Η Τυροσίνη περιέχει μια ομάδα υδροξυλίου (-OH) στον αρωματικό του δακτύλιο και συχνά εμπλέκεται σε δεσμούς υδρογόνου και φωσφορυλίωση. Η Κυστεΐνη περιέχει μια ομάδα θειόλης (-SH). Μπορεί να σχηματίσει δισουλφιδικούς δεσμούς με άλλα υπολείμματα κυστεΐνης. Οπότε μπορεί να επηρεαστούν οι αλληλεπιδράσεις και η δομή της πρωτεΐνης με αυτή την αλλαγή.

Παρόλα αυτά σε αναζήτηση στις βάσεις δεδομένων interpro και uniprot δε βρέθηκε ότι η συγκεκριμένη μετάλλαξη συμβαίνει σε domain σημαντική για τη λειτουργία της πρωτεΐνης.

Στην ανάλυση sift η μετάλλαξη χαρακτηρίστηκε ως επιβλαβής με σκορ 0,03.

Στην πρωτεΐνη DNAJC13 (αποτελείται από 2243 αμινοξέα) εντοπίστηκαν δύο συνώνυμες μεταλλάξεις. Η πρώτη στο αμινοξύ 1331(Τυροσίνη) και η δεύτερη στο αμινοξύ 1740(Γλουταμικό οξύ). Η πρώτη εντοπίζεται σύμφωνα με την interpro μέσα σε DNAJ domain η οποία παίζει βασικό ρόλο στην αλληλεπίδραση με τις πρωτεΐνες HSP70. Για τη δεύτερη δεν εντοπίστηκε ότι βρίσκεται σε κάποια συγκεκριμένη domain(Pierre Genevaux et al., 2002).

Στην πρωτεΐνη DNAJC17 (αποτελείται από 304 αμινοξέα) εντοπίστηκε μία συνώνυμη μετάλλαξη. Αυτή εντοπίζεται στο αμινοξύ 236 (Γλυκίνη). Σύμφωνα με την Interpro βρίσκεται εντός της RNA Recognition Motif domain(183-247) της πρωτεΐνης. Αυτός ο τομέας έχει αποδειχθεί ότι παίζει ρόλο στην επεξεργασία RNA (π.χ. μάτισμα),στη μεταφορά RNA, στη σταθεροποίηση RNA, ή στην αποικοδόμηση RNA(Christophe Maris et al.,2005).

Στα γονίδια DNAJC5, DNAJC15 και DNAJC18 βρέθηκαν από μία μετάλλαξη στο καθένα στην περιοχή του 3'UTR.

Στο γονίδιο DNAJC3 βρέθηκαν 3 μεταλλάξεις στην περιοχή των ιντρονίων και συγκεκριμένα στην θέση ματίσματος οπότε είναι πολύ πιθανό να επηρεάζεται το μάτισμα του RNA.

Στη πρωτεΐνη DNAJC8 (αποτελείται από 253 αμινοξέα) εντοπίστηκε σημειακή μετάλλαξη στο αμινοξύ 211. Εξαιτίας της μετάλλαξης ένα Ασπαρτικό οξύ (D) αντικαθίσταται σε Ασπαραγίνη (N).Το Ασπαρτικό οξύ είναι ένα αρνητικά φορτισμένο αμινοξύ με πλευρική αλυσίδα καρβοξυλικού οξέος. Παίζει ρόλο στις ιοντικές αλληλεπιδράσεις, στη σύνδεση με μεταλλικά ιόντα και στην ενζυματική κατάλυση. Αντίθετα η Ασπαραγίνη είναι ένα ουδέτερο, πολικό αμινοξύ με πλευρική αλυσίδα αμιδίου. Σχηματίζει κυρίως δεσμούς υδρογόνου αλλά στερείται φορτίου.

Σε αναζήτηση στην InterPro δε βρέθηκε στην περιοχή της μετάλλαξης κάποια συγκεκριμένη domain.

Στην πρωτεΐνη DNAJC6 (αποτελείται από 910 αμινοξέα) εντοπίστηκαν 4 συνώνυμες μεταλλάξεις στις θέσεις αμινοξέων 554, 564, 567, 598. Και οι τέσσερις μεταλλάξεις εντοπίστηκαν στο αμινοξύ Θρεονίνη. Στην Interpro δεν αναφέρεται κάποια συγκεκριμένη domain στις θέσεις όπου βρίσκονται τα συγκεκριμένα αμινοξέα.

Στη πρωτεΐνη DNAJC18 (αποτελείται από 358 αμινοξέα) εντοπίστηκε σημειακή μετάλλαξη στο αμινοξύ 71. Εξαιτίας της μετάλλαξης μία Λευκίνη (L) αντικαθίσταται σε Βαλίνη (V). Η Λευκίνη και η Βαλίνη είναι και τα δύο υδρόφοβα μη πολικά αμινοξέα και έχουν παρόμοιες ιδιότητες. Η Βαλίνη έχει όμως πιο μικρή πλευρική αλυσίδα. Στην interpro δεν αναφέρεται στην περιοχή της μετάλλαξης κάποια συγκεκριμένη domain.

Στην ανάλυση sift η μετάλλαξη χαρακτηρίστηκε ως ανεκτή.

Στις θερμοευαίσθητες αγελάδες στα γονίδια της υποοικογένειας DNAJC που κωδικοποιούν πρωτεΐνες της οικογένειας HSP40 εντοπίστηκαν συνολικά 612 μεταλλάξεις στις περιοχές των ιντρονίων.

Στην πρωτεΐνη DNAJC28 (αποτελείται από 380 αμινοξέα) εντοπίστηκαν δύο σημειακές και μία συνώνυμη μετάλλαξη.

Η συνώνυμη μετάλλαξη εντοπίστηκε στο αμινοξύ 75 (Ασπαρτικό οξύ).

Η πρώτη σημειακή μετάλλαξη εντοπίστηκε στο αμινοξύ 69. Εξαιτίας της μετάλλαξης μία Αλανίνη αντικαθίσταται από Θρεονίνη. Τα δύο αυτά αμινοξέα έχουν αρκετές διαφορές.

Η αλανίνη είναι μη πολικό, υδρόφοβο αμινοξύ με μικρή πλευρική αλυσίδα. Αντίθετα η Θρεονίνη είναι πολικό, υδρόφιλο αμινοξύ με μεγαλύτερη πλευρική αλυσίδα η οποία περιέχει υδροξυλομάδα. Μπορεί να σχηματίσει δεσμούς υδρογόνου και συχνά βρίσκεται στην επιφάνεια πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με το νερό ή άλλα πολικά μόρια.

Στην ανάλυση sift η μετάλλαξη χαρακτηρίστηκε ως επιβλαβής με σκορ 0.

Η δεύτερη σημειακή μετάλλαξη εντοπίστηκε στο αμινοξύ στη θέση 76. Εξαιτίας της μετάλλαξης μία Γλυκίνη αντικαθίσταται από Σερίνη. Αυτά τα δύο αμινοξέα έχουν αρκετές διαφορές. Το μικρότερο αμινοξύ με μόνο υδρογόνο ως πλευρική αλυσίδα. Έχει υψηλή ευελιξία λόγω της έλλειψης στερεοχημικής παρεμπόδισης. Η Σερίνη είναι λίγο μεγαλύτερο, πολικό αμινοξύ με πλευρική αλυσίδα υδροξυμεθυλίου. Ικανό να σχηματίζει δεσμούς υδρογόνου μέσω της υδροξυλικής του ομάδας. Λιγότερο ευέλικτο σε σύγκριση με τη Γλυκίνη.

Στην ανάλυση sift η μετάλλαξη χαρακτηρίστηκε ως ανεκτή.

Οι τρεις αυτές μεταλλάξεις σύμφωνα με την InterPro βρίσκονται εντός της domain dhaj της πρωτεΐνης η οποία παίζει βασικό ρόλο στην αλληλεπίδραση με τις πρωτεΐνες HSP70.

Στο γονίδιο DNAJC17 βρέθηκε μία μετάλλαξη στην περιοχή των ιντρονίων αλλά συγκεκριμένα στην θέση ματίσματος οπότε είναι πολύ πιθανό να επηρεάζεται το μάτισμα του RNA.

Στην πρωτεΐνη DNAJC15 (αποτελείται από 149 αμινοξέα) εντοπίστηκαν 2 συνώνυμες μεταλλάξεις στις θέσεις αμινοξέων 116 και 117. Και οι δύο μεταλλάξεις εντοπίστηκαν στο αμινοξύ Αργινίνη ενώ βρίσκονται εντός της domain dhaj (94-148) της πρωτεΐνης σύμφωνα με την interpro.

Στο γονίδιο DNAJC3 βρέθηκαν 2 μεταλλάξεις στην περιοχή των ιντρονίων και συγκεκριμένα στην θέση ματίσματος οπότε είναι πολύ πιθανό να επηρεάζεται το μάτισμα του RNA.

Επίσης στην πρωτεΐνη DNAJC3 εντοπίστηκε μία σημειακή μετάλλαξη στο αμινοξύ 156. Εξαιτίας της μετάλλαξης μία Αργινίνη αντικαθίσταται από Ιστιδίνη. Η Αργινίνη είναι θετικά φορτισμένο αμινοξύ σε φυσιολογικό pH λόγω της ομάδας του γουανιδίνιου. Πολύ πολικό και συχνά εμπλέκεται σε ιοντικές αλληλεπιδράσεις. Διαθέτει μακριά και εύκαμπτη πλευρική αλυσίδα.

Η Ιστιδίνη μπορεί να είναι θετικά φορτισμένη ή ουδέτερη σε φυσιολογικό pH, ανάλογα με το περιβάλλον. Περιέχει μια ομάδα ιμιδαζολίου, η οποία μπορεί να συμμετέχει στη μεταφορά πρωτονίων και να σχηματίσει δεσμούς υδρογόνου. Έχει μικρότερη πλευρική αλυσίδα σε σύγκριση με την αργινίνη.

Στην ανάλυση sift η μετάλλαξη χαρακτηρίστηκε ως ανεκτή.

Στο γονίδιο DNAJC1 βρέθηκαν μία μετάλλαξη στην περιοχή των ιντρονίων και συγκεκριμένα στην θέση ματίσματος οπότε είναι πολύ πιθανό να επηρεάζεται η διαδικασία ματίσματος του RNA.

Στο γονίδιο DNAJC5 εντοπίστηκε μια μετάλλαξη στην 3' UTR. Επίσης στην πρωτεΐνη DNAJC5 (αποτελείται από 198 αμινοξέα) εντοπίστηκε μια συνώνυμη μετάλλαξη στο αμινοξύ 170(Προλίνη). Σε αναζήτηση στην Interpro δεν εντοπίστηκε να βρίσκεται σε κάποια γνωστή domain.

Στο γονίδιο DNAJC24 εντοπίστηκαν δύο μεταλλάξεις στην 5' UTR. Επίσης στην πρωτεΐνη DNAJC24 (αποτελείται από 149 αμινοξέα) εντοπίστηκε μία σημειακή μετάλλαξη στο αμινοξύ 51. Εξαιτίας της μετάλλαξης μία Αργινίνη αντικαθίσταται από Γλουταμίνη. Η Αργινίνη είναι θετικά φορτισμένη σε φυσιολογικό pH λόγω της ομάδας γουανιδινίου. Έχει μεγάλη πλευρική αλυσίδα, είναι εξαιρετικά πολική και υδρόφιλη. Συχνά σχηματίζει ισχυρές ιοντικές αλληλεπιδράσεις με αρνητικά φορτισμένα αμινοξέα και μόρια. Παράλληλα συχνά εμπλέκεται σε αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης. Η Γλουταμίνη είναι μη φορτισμένη σε φυσιολογικό pH αλλά πολική λόγω της αμιδικής της πλευρικής αλυσίδας. Έχει μικρότερο μέγεθος πλευρικής αλυσίδας σε σχέση με την Αργινίνη και είναι υδρόφιλη. Σχηματίζει δεσμούς υδρογόνου αλλά δεν έχει την ικανότητα να συμμετέχει σε ισχυρές ιοντικές αλληλεπιδράσεις όπως η Αργινίνη. Σύμφωνα με την interpro η μετάλλαξη βρίσκεται εντός της dhaj domain. Στην ανάλυση sift η μετάλλαξη χαρακτηρίστηκε ως επιβλαβής.

Στα γονίδια DNAJC21 και DNAJC22 εντοπίστηκαν από μια μετάλλαξη στο καθένα στην 3' UTR.

Στην πρωτεΐνη DNAJC4 (αποτελείται από 276 αμινοξέα) εντοπίστηκε μία συνώνυμη μετάλλαξη στη θέση 169(Τυροσίνη). Σε αναζήτηση στην Interpro δεν εντοπίστηκε βρίσκεται σε κάποια γνωστή domain.

4.7 Οικογένεια small HSP

Στις θερμοανθεκτικές αγελάδες εντοπίστηκαν 7 μεταλλάξεις σε περιοχές ιντρονίων. Μόνο στο γονίδιο HSPB3 εντοπίστηκε μία μετάλλαξη στην 5' UTR.

Στις θερμοευαίσθητες εντοπίστηκαν 8 μεταλλάξεις σε περιοχές ιντρονίων.

4.8 Οικογένεια Heat shock factor

Δεν εντοπίστηκε καμία μετάλλαξη στο γονίδιο *HSF1* το οποίο είναι ο κύριος ρυθμιστής της μεταγραφής των γονιδίων θερμικού σοκ σε απόκριση σε συνθήκες στρες.

Ωστόσο σε άλλους HSF στις θερμοανθεκτικές αγελάδες εντοπίστηκαν 28 μεταλλάξεις στις περιοχές των ιντρονίων.

Επίσης εντοπίστηκε μία σημειακή μετάλλαξη στην πρωτεΐνη HSF4 (αποτελείται από 490 αμινοξέα) στο αμινοξύ 426. Συγκεκριμένα το αμινοξύ Κυστεΐνη αντικαθίσταται από Γλυκίνη. Τα δύο αμινοξέα διαφέρουν αρκετά. Η Κυστεΐνη είναι ένα πολικό αμινοξύ που περιέχει μια ομάδα θειόλης (-SH) , η οποία μπορεί να σχηματίσει δισουλφιδικούς δεσμούς με άλλα υπολείμματα κυστεΐνης. Οι δισουλφιδικοί δεσμοί είναι ζωτικής σημασίας για τη σταθεροποίηση της τριτοταγούς και τεταρτοταγούς δομής των πρωτεϊνών.

Η γλυκίνη είναι μη πολικό αμινοξύ με μόνο ένα άτομο υδρογόνου ως πλευρική αλυσίδα του. Φυσικά η γλυκίνη δεν έχει τη δυνατότητα να σχηματίσει δισουλφιδικούς δεσμούς. Σε αναζήτηση στην InterPro δεν εντοπίστηκε στη θέση της μετάλλαξης να υπάρχει κάποια γνωστή domain.

Στην ανάλυση sift η μετάλλαξη χαρακτηρίστηκε ως ανεκτή.

Στις θερμοευαίσθητες εντοπίστηκαν 25 μεταλλάξεις όλες σε περιοχές ιντρονίων.

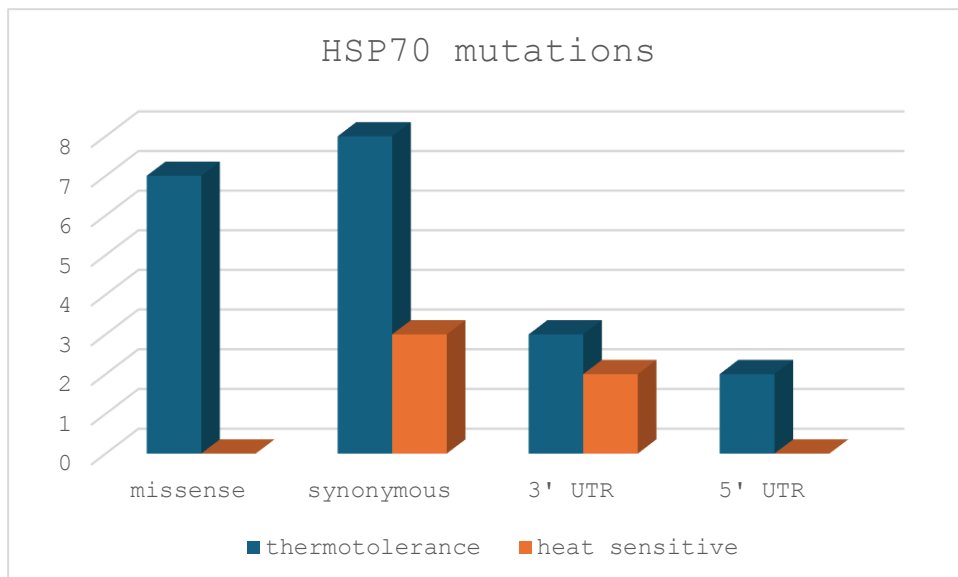
4.9 Ομαδοποιημένα εντοπίστηκαν οι παρακάτω μεταλλάξεις:

Στα γονίδια HSP70 εντοπίστηκαν:

Πίνακας 2 Ομαδοποιημένα οι μεταλλάξεις στα HSP70 γονίδια.

mutation	thermotolerance	Heat sensitive
missense	7	0
synonymous	8	3
3' UTR	3	2
5' UTR	2	0
intron	170	397

Πίνακας 3 Γράφημα με τις ομαδοποιημένες μεταλλάξεις στα HSP70 γονίδια.



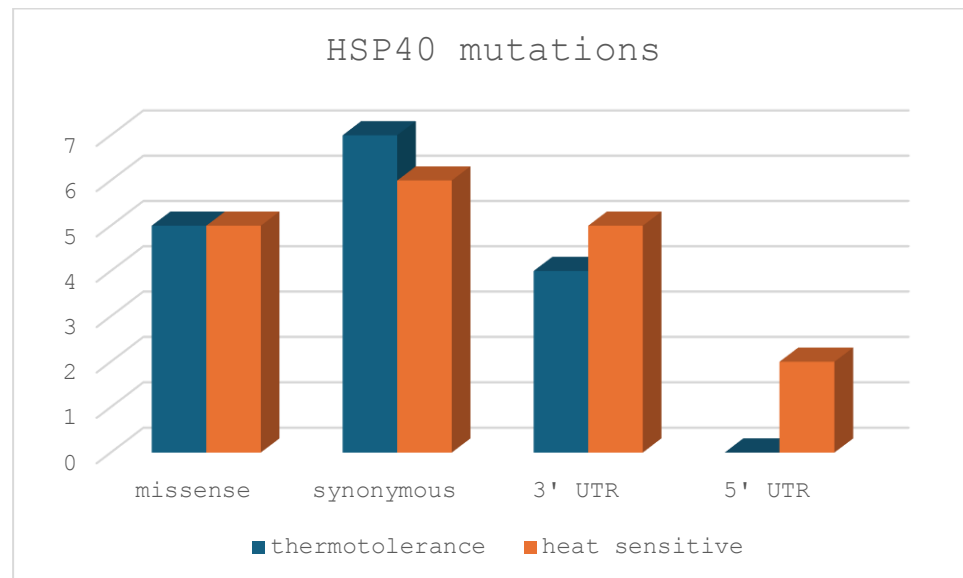
Από τις 7 missense μεταλλάξεις στις θερμοανθεκτικές αγελάδες οι 3 χαρακτηρίστηκαν ως επιβλαβείς από το εργαλείο Sift.

Στα γονίδια HSP40:

Πίνακας 4 Ομαδοποιημένα οι μεταλλάξεις στα HSP40 γονίδια.

mutation	thermotolerance	Heat sensitive
missense	5	5
synonymous	7	6
3' UTR	4	5
5' UTR	0	2
intron	934	781

Πίνακας 5 Γράφημα με τις ομαδοποιημένες μεταλλάξεις στα HSP40 γονίδια.



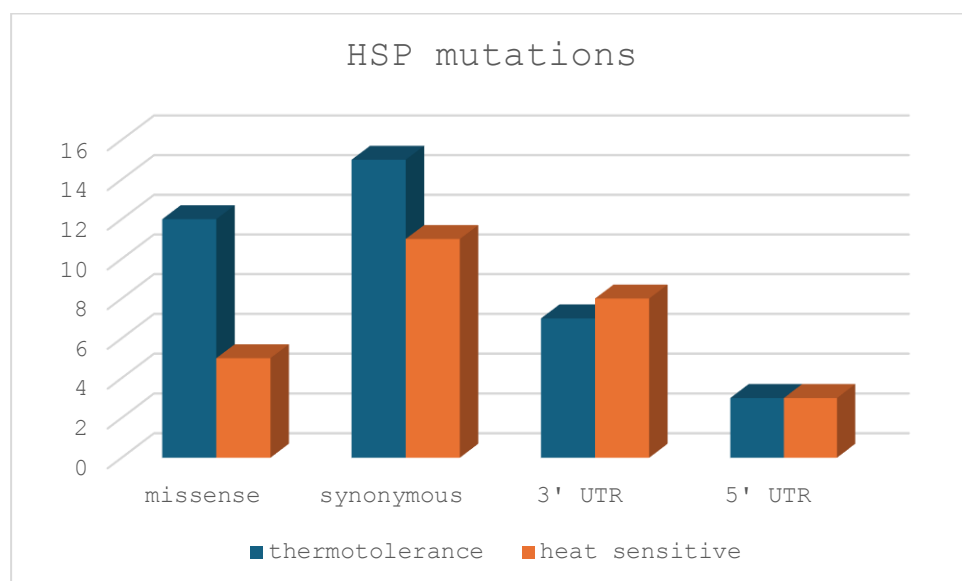
Από τις 5 missense μεταλλάξεις στις θερμοανθεκτικές αγελάδες οι 2 χαρακτηρίστηκαν ως επιβλαβείς από το εργαλείο Sift ενώ άλλες 2 χαρακτηρίστηκαν ως επιβλαβείς από τις θερμοευαίσθητες.

Συνολικά εντοπίστηκαν:

Πίνακας 6 Ομαδοποιημένα οι μεταλλάξεις στο σύνολο των HSP γονιδίων.

mutation	thermotolerance	Heat sensitive
missense	12	5
synonymous	15	11
3' UTR	7	8
5' UTR	3	3
intron	1120	1198

Πίνακας 7 Γράφημα με τις ομαδοποιημένες μεταλλάξεις στο σύνολο των HSP γονιδίων.



5. Συζήτηση

Το θερμικό στρες έχει αρνητικό αντίκτυπο σε πολλές πτυχές της ζωής και της παραγωγικότητας των αγελάδων. Για αυτό τον λόγο τα ζώα έχουν αναπτύξει ένα ευρύ φάσμα προστατευτικών αποκρίσεων σε αυτό. Μία από αυτές τις αποκρίσεις είναι η παραγωγή πρωτεϊνών θερμικού σοκ (HSP) οι οποίες έχουν κυτταροπροστατευτικούς ρόλους κάτω από συνθήκες στρες.

Κατά την ανάλυση των δεδομένων του whole genome sequencing σε θερμοανθεκτικές και θερμοευαίσθητες αγελάδες εντοπίστηκαν αρκετές και διαφορετικές μεταξύ τους μεταλλάξεις στα άτομα των δύο κατηγοριών.

Υπήρξε και διαφορά στην ποσότητα των μεταλλάξεων στις δύο κατηγορίες αν και αυτό που μετράει κυρίως είναι ο ρόλος και ο αντίκτυπος των μεταλλάξεων και όχι η ποσότητά τους. Μεγαλύτερη πιθανότητα να επηρεάσουν τη λειτουργία των πρωτεϊνών έχουν οι μη συνώνυμες (missense) μεταλλάξεις, ακολουθούν οι συνώνυμες, μετά οι 3',5' UTR και λιγότερο αυτές στα ιντρόνια.

Για καλύτερη αξιοποίηση των αποτελεσμάτων και της παρούσης εργασίας θα πρέπει να ακολουθήσει πείραμα σε πληθυσμό αγελάδων στις οποίες θα έχει ταυτοποιηθεί το γονιδίωμά τους με Whole Genome Sequencing ώστε να διαθέτουν μεμονωμένα μόνο τις μεταλλάξεις που αναφέραμε και αγελάδες που δεν τις διαθέτουν. Θα πρέπει να εκτεθούν σε διάφορες συνθήκες συμπεριλαμβανομένων των υψηλών θερμοκρασιών και οι επιστήμονες να καταγράψουν τις διάφορες φυσιολογικές παραμέτρους (θερμοκρασία σώματος και ορθού, αναπνευστικός ρυθμός, καρδιακοί παλμοί, ρυθμός εφίδρωσης) που αναφέρθηκαν στην εισαγωγή ώστε να γίνει πιο ακριβής αντιστοίχιση μεταλλάξεων με θερμοανοχή.

Επίσης θα βοηθήσει και ο υπολογισμός των επιπέδων έκφρασης του κάθε γονιδίου υπό διαφορετικές συνθήκες καθώς η έκφραση μπορεί να αλλάζει ανάλογα με το αν το ζώο είναι θερμοανθεκτικό ή θερμοευαίσθητο. Έτσι μπορεί να βρεθεί ένα μοριακός δείκτης ώστε να εντοπίζονται θερμοανθεκτικά ή θερμοευαίσθητα ζώα. Αυτό θα

βοηθήσει στην επιλογή των ζώων κατάλληλων για τις συνθήκες κάθε περιοχής καθώς μέχρι στιγμής, η επιλογή των ζώων γίνεται κυρίως με φαινοτυπικά κριτήρια (δηλαδή δυνατότητα διατήρησης της παραγωγής και αναπαραγωγής κατά το καλοκαίρι) μαζί με βιοχημικούς δείκτες (έκκριση ορμονών) (Maria Kalemkeridou et al., 2022). Επιπλέον με την εισαγωγή των επωφελών πολυμορφισμών στο γονιδίωμα των αγελάδων, μέσω επιλεκτικών διασταυρώσεων, θα υπάρξουν προοπτικές γενετικής βελτίωσης των ζώων.

Οι μελέτες για μεταλλάξεις στα γονίδια HSP που σχετίζονται με το θερμικό στρες στις αγελάδες είναι περιορισμένες σε αριθμό.

Καταρχάς την ίδια σημειακή μετάλλαξη που εντοπίστηκε στην παρούσα μελέτη στο αμινοξύ 626 της πρωτεΐνης HSPA1A την έχουν εντοπίσει πρόσφατα και ερευνητές στην Τουρκία στις φυλές αγελάδων Turkish Grey και Holstein cattle (Sertaç Atalay et al., 2024). Στην πρώτη φυλή η συχνότητα του snp ήταν περίπου διπλάσια απότι στη δεύτερη. Η πρώτη φυλή όμως είναι και αυτή που εμφανίζει και τη μεγαλύτερη αντοχή στο θερμικό στρες σύμφωνα με έρευνες. Άρα από αυτό το γεγονός θα μπορούσαμε να υποψιαστούμε ότι ενδεχομένως η μετάλλαξη έχει μερίδιο ευθύνης στην θερμοανθεκτικότητα. Παρόλα αυτά οι ερευνητές χρησιμοποίησαν τέσσερα χρήσιμα εργαλεία βιοπληροφορικής που συσχετίζουν την επίπτωση των snp στη δομή και τη λειτουργία της πρωτεΐνης.

Το πρώτο εργαλείο ονομάζεται ConSurf το οποίο εξετάζει την εξελικτική διατήρηση των υπολειμμάτων αμινοξέων σε μία πρωτεΐνη. Προβλέπει τη λειτουργική και δομική σημασία κάθε θέσης αμινοξέος με βάση το πόσο διατηρημένο είναι σε συγγενικά είδη. Τα διατηρημένα αμινοξέα είναι συχνά κρίσιμα για τη λειτουργία της πρωτεΐνης. Συγκεκριμένα το εργαλείο συλλέγει ομόλογες αλληλουχίες της πρωτεΐνης στόχου από διάφορες βάσεις δεδομένων. Αυτές οι αλληλουχίες στη συνέχεια συγκρίνονται με την αλληλουχία της πρωτεΐνης στόχου. Η εξελικτική βαθμολογία διατήρησης (1-9) για κάθε θέση αμινοξέος στην πρωτεΐνη στόχο υπολογίζεται χρησιμοποιώντας αυτές τις ομόλογες αλληλουχίες. Στα αποτελέσματα του ConSurf, μια βαθμολογία διατήρησης 1 υποδεικνύει το χαμηλότερο επίπεδο διατήρησης, που σημαίνει ότι το αμινοξύ σε αυτή τη θέση είναι πολύ μεταβλητό μεταξύ διαφορετικών ειδών, υποδεικνύοντας ότι είναι λιγότερο κρίσιμο για τη λειτουργία ή τη δομή της πρωτεΐνης. Αντίθετα, η βαθμολογία 9 αντιπροσωπεύει το υψηλότερο επίπεδο διατήρησης, υποδεικνύοντας ότι το αμινοξύ είναι εξαιρετικά διατηρημένο και πιθανότατα απαραίτητο για τη σωστή λειτουργία της πρωτεΐνης. Στη περίπτωση μας η βαθμολογία στη θέση 626 ήταν 1 η οποία δείχνει ότι αυτή η θέση δεν έχει μεγάλο βαθμό διατήρησης και μπορεί να μην είναι κρίσιμη για τις βασικές λειτουργίες της πρωτεΐνης.

Το δεύτερο εργαλείο βιοπληροφορικής που χρησιμοποίησαν οι ερευνητές ήταν το SIFT που επεξηγήθηκε στην εισαγωγή. Η βαθμολογία για τη μετάλλαξη στη θέση 626 είναι 1, που είναι η υψηλότερη δυνατή βαθμολογία, υποδηλώνοντας ότι αυτή η αντικατάσταση αμινοξέος είναι καλά ανεκτή και πολύ απίθανο να επηρεάσει τη λειτουργία της πρωτεΐνης.

Το τρίτο εργαλείο ονομάζεται HOPE που έχει σχεδιαστεί για την ανάλυση των επιπτώσεων των υποκαταστάσεων αμινοξέων στη δομή και τη λειτουργία των πρωτεϊνών. Το εργαλείο αξιολογεί παράγοντες όπως αλλαγές στο μέγεθος, το φορτίο και την υδροφοβικότητα του μεταλλαγμένου αμινοξέος και τη θέση του εντός της πρωτεΐνης. Σύμφωνα με το HOPE η αντικατάσταση της γλυκίνης με αλανίνη επηρεάζει τη λειτουργία και τη δομή της πρωτεΐνης.

Το τέταρτο εργαλείο ονομάζεται DUET. Αυτό είναι μια υπολογιστική μέθοδος που χρησιμοποιείται για την πρόβλεψη του αντίκτυπου των υποκαταστάσεων ενός αμινοξέος στη σταθερότητα της πρωτεΐνης. Το DUET συνδυάζει πολλαπλά εργαλεία

πρόβλεψης για να παρέχει μια συναινετική πρόβλεψη των αποσταθεροποιητικών ή σταθεροποιητικών επιδράσεων των μεταλλάξεων στη δομή της πρωτεΐνης. Σύμφωνα με τους ερευνητές που χρησιμοποίησαν αυτό το εργαλείο η συγκεκριμένη μετάλλαξη που εξετάζουμε παρουσιάζει ελάχιστη επίδραση στη σταθερότητα της πρωτεΐνης.

Στη μελέτη των Zaheer Abbas et al., 2020 ερευνήθηκε η συσχέτιση 4 SNPs στην 5' πλευρική περιοχή του γονιδίου HSP70 με βιοχημικές παραμέτρους του αίματος που σχετίζονται με το θερμικό και ψυχρό στρες στις αγελάδες Holstein. Υπό θερμική καταπόνηση, τα SNPs A-12G και C181T συνδέθηκαν με υψηλότερα επίπεδα γαλακτικού (LA) και το A72G με υψηλότερα επίπεδα υπεροξειδίου των λιπιδίων (LPO), ενώ υπό ψυχρό στρες, το A-12G συνδέθηκε με αυξημένη δραστηριότητα ντοπαμίνης (DA) και το C131G με αυξημένη υπεροξειδική δισμουτάση (SOD).

Στη μελέτη των Loredana Basiricò et al., 2011 δείχνει ότι συγκεκριμένα snp στην 5'-UTR του γονιδίου HSPA1A σχετίζονται με αυξημένη ικανότητα των μονοπύρηνων κυττάρων του περιφερικού αίματος (PBMC) να εκφράζουν το HSPA1A σε συνθήκες θερμικού στρες.

Στη μελέτη των Tarig Badri et al., 2021 συνδέθηκε το SNP G462T στην κωδικεύουσα περιοχή του γονιδίου HSP70 σε κινεζικά βοοειδή Holstein με ανοχή στη θερμότητα. Η συγκεκριμένη μετάλλαξη αφορά αντικατάσταση αμινοξέος στη θέση 154 από γλουταμίνη σε ιστιδίνη.

Στη μελέτη των Rakesh Kumar et al., 2016 εντοπίστηκε μία σημειακή μετάλλαξη στο γονίδιο HSP90AA1(g.1209A>G). Τα άτομα που την εμφάνιζαν είχαν μικρότερο ρυθμό αναπνοής (RR) και θερμοκρασία ορθού (RT) τις ώρες πολύ υψηλών θερμοκρασιών κάτι που υποδηλώνει καλύτερη ανοχή στο θερμικό στρες.

Η μελέτη των T M Badri et al., 2018 αναφέρεται σε μία σημειακή μετάλλαξη στον προαγωγέα του γονιδίου HSP90AA1(g.-87 G>C). Τα άτομα που την εμφάνιζαν είχαν σημαντικά υψηλότερη έκφραση mRNA HSP90AA1 από τα υπόλοιπα. Σύμφωνα με τους ερευνητές αυτή η μετάλλαξη φαίνεται να ενισχύει τη δραστηριότητα του προαγωγέα, οδηγώντας σε αυξημένη μεταγραφή του HSP90AA1 ως απόκριση στο θερμικό στρες.

Επιπλέον σε μελέτη των Hao Fang et al., 2021, δημοσιεύτηκε ότι σε μονοπύρηννα περιφερικά κύτταρα του αίματος η έκφραση του *DNAJB4* αυξήθηκε υπό συνθήκες θερμικού στρες.

Στη μελέτη των Renata de Fátima Bretanha Rocha et al., 2019 το γονίδιο *HSPA6* που κωδικοποιεί πρωτεΐνες της οικογένειας HSP70 είναι σχεδόν μη ανιχνεύσιμο στους περισσότερους ιστούς κατά τη διάρκεια φυσιολογικών συνθηκών χωρίς στρες, εκτός από ορισμένα κύτταρα του αίματος, όπου εκφράζεται σε σημαντικά επίπεδα. Αυτό μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι το γονίδιο *HSPA6* είναι υπεύθυνο να δρα για να βοηθά τους συγκεκριμένους ιστούς κάτω από συνθήκες έντονου στρες.

Στη μελέτη των Maria Kalemkeridou et al., 2022 αναφέρεται ότι υπό θερμικό στρες οι μέσες συγκεντρώσεις HSP70 στο πλάσμα ήταν χαμηλότερες κατά 20% στις θερμοανθεκτικές αγελάδες. Τα χαμηλότερα επίπεδα HSP70 υποδεικνύουν ότι αυτές οι αγελάδες αντιμετωπίζουν λιγότερο κυτταρικό στρες όταν εκτίθενται στη θερμότητα.

Μελέτες με ανάλογα αποτελέσματα όπως τα προαναφερθέντα έχουν γίνει και σε συγγενικά είδη με τις αγελάδες όπως πρόβατα (K M Singh et al., 2017).

Εν κατακλείδι, στην παρούσα μελέτη εντοπίστηκαν οι μεταλλάξεις στα γονίδια HSP θερμοανθεκτικών και θερμοευαίσθητων αγελάδων και αναλύθηκαν οι περιοχές των γονιδίων στις οποίες βρίσκονται καθώς και πιθανές επιπτώσεις τους. Από αυτές τις μεταλλάξεις κάποιες σχετίζονται ή και όχι με τη θερμοαντοχή ή τη θερμοευαισθησία. Για να διαπιστωθεί ο συσχετισμός με σιγουριά χρειάζεται περαιτέρω έρευνα αφού και η βιβλιογραφία σε αυτό το κομμάτι είναι ελλιπής. Μάλιστα η έρευνα είναι επιτακτική

ανάγκη να γίνει άμεσα καθώς η υπερθέρμανση του πλανήτη εξελίσσεται και οι συνέπειές της είναι πλέον πολύ εμφανείς στην κτηνοτροφία με φυσικά τεράστιο οικονομικό κόστος.

6. Βιβλιογραφία

Alan B. Rose et al., 2018, Introns as Gene Regulators: A Brick on the Accelerator, *Frontiers in Genetics*.

Ana Vanessa Dias Sousa, Ceva Santé Animale, THI: monitoring and management of heat stress in dairy cattle, cited 2024 Dec 2, <https://ruminants.ceva.pro/thi> .

Anna E. Masser et al., 2020, Hsf1 on a leash – controlling the heat shock response by chaperone titration, *Experimental Cell Research*.

Celeste Caruso Bavisotto et al., 2020, Hsp60 Post-translational Modifications: Functional and Pathological Consequences, *Frontiers in Molecular Biosciences*.

Chen Hu et al., 2022, Heat shock proteins: Biological functions, pathological roles, and therapeutic opportunities, *MedComm*.

Christophe Maris et al., 2005, The RNA recognition motif, a plastic RNA-binding platform to regulate post-transcriptional gene expression, *FEBS Journal*.

Claudia Giannone et al., 2023, Review of the Heat Stress-Induced Responses in Dairy Cattle, *Animals*.

D Sharma et al., 2009, Hsp70 Structure, Function, Regulation and Influence on Yeast Prions.

Dwi Nur Happy Hariyono et al., 2022, Association of selected gene polymorphisms with thermotolerance traits in cattle – A review, *Animal Bioscience*.

Florian H. Schopf et al., 2017, The HSP90 chaperone machinery, *Nature reviews*

Gbolabo Olaitan Onasanya et al., 2021, Heterozygous Single-Nucleotide Polymorphism Genotypes at Heat Shock Protein 70 Gene Potentially Influence Thermo-Tolerance Among Four Zebu Breeds of Nigeria, *Frontiers in Genetics*.

Geoffray Monteuis et al., 2019, The changing paradigm of intron retention: regulation, ramifications and recipes, *Nucleic Acids Research*.

Hai Lin et al., 2019, RegSNPs-intron: a computational framework for predicting pathogenic impact of intronic single nucleotide variants, *Genome Biology*.

Hao Fang et al., 2021, Identification of key Genes and Pathways Associated With Thermal Stress in Peripheral Blood Mononuclear Cells of Holstein Dairy Cattle, *Frontiers*.

Ichiro Izawa et al., 2000, Identification of Mrj, a DnaJ/Hsp40 Family Protein, as a Keratin 8/18 Filament Regulatory Protein, *Journal of Biological Chemistry*.

J. V. Chamary et al., 2006, Hearing silence: non-neutral evolution at synonymous sites in mammals, *Nature Reviews Genetics*

J.W. West, 2003, Effects of Heat-Stress on Production in Dairy Cattle, *Journal of Dairy Science*.

James C A Bardwell et al., 2012, Conditional disorder in chaperone action.

Javid Ahmad Malik et al., 2021, Heat shock proteins with an emphasis on HSP 60, *Molecular Biology Reports*

Jingzhi Li et al., 2009, Heat shock protein 40: Structural studies and their functional implications, *Protein and Peptide Letters*

Jinliang Wang et al, 2019, MitCHAP-60 and Hereditary Spastic Paraplegia SPG-13 Arise from an Inactive hsp60 Chaperonin that Fails to Fold the ATP Synthase β -Subunit, *Nature*.

Jonah N Cullen et al. 2023, Whole Animal Genome Sequencing: user-friendly, rapid, containerized pipelines for processing, variant discovery, and annotation of short-read whole genome sequencing data, *G3 Genes|Genomes|Genetics*.

Jürgen Radons, 2016, The human HSP70 family of chaperones: where do we stand?, *Cell Stress and Chaperones*

K M Singh et al., 2017, Association of heat stress protein 90 and 70 gene polymorphism with adaptability traits in Indian sheep (*Ovis aries*), *Cell Stress Chaperones*.

Kevin C. Kregel, 2002, Invited Review: Heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance, *Journal of Applied Physiology*.

Liqing Hu et al., 2023, A first-in-class inhibitor of Hsp110 molecular chaperones of pathogenic fungi, *Nature*.

Loredana Basiricò et al., 2011, Cellular thermotolerance is associated with heat shock protein 70.1 genetic polymorphisms in Holstein lactating cows, *Cell Stress Chaperones*.

Lucas Eduardo de Oliveira Aparecido et al., 2022, Bioclimatic zoning for dairy cows in Brazil by statistical modeling, *Journal of The Science of Food and Agriculture*.

Maria K Janowska et al., 2019, Mechanisms of Small Heat Shock Proteins, *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*.

Maria Kalemkeridou et al., 2022, Genetic diversity and thermotolerance in Holstein cows: Pathway analysis and marker development using whole-genome sequencing, *Reproduction in Domestic Animals*.

María Rosario Fernández-Fernández et al., 2018, Hsp70 chaperone: a master player in protein homeostasis.

Martin Haslbeck et al., 2018, Small heat shock proteins: Simplicity meets complexity, *Journal of Biological Chemistry*.

Mattia Pozzebon et al., 2024, Gene Editing Cattle for Enhancing Heat Tolerance: A Welfare Review of the “PRLR-SLICK Cattle” Case, *Studies of New and Emerging Technologies*.

Natalia Ryczek et al., 2023, The Functional Meaning of 5'UTR in Protein-Coding Genes, International Journal of Molecular Sciences.

Ngak-Leng Sim et al., 2012, SIFT web server: predicting effects of amino acid substitutions on proteins, Nucleic Acids Research.

Olivier Genest et al., 2018, Hsp90 and Hsp70 chaperones: Collaborators in protein remodeling, Journal of biological chemistry.

Otmar Hainzl et al., 2009, The Charged Linker Region Is an Important Regulator of Hsp90 Function, Journal of biological chemistry.

Petar Brlek et al., 2024, Implementing Whole Genome Sequencing (WGS) in Clinical Practice: Advantages, Challenges, and Future Perspectives, Cells.

Philip Thornton et al., 2022, Impacts of heat stress on global cattle production during the 21st century: a modelling study, The Lancet Planetary Health.

Pierre Genevaux et al., 2002, Scanning mutagenesis identifies amino acid residues essential for the in vivo activity of the Escherichia coli DnaJ (Hsp40) J-domain, GENETICS

Rakesh Kumar et al., 2016, Novel SNP identification in exon 3 of HSP90AA1 gene and their association with heat tolerance traits in Karan Fries (Bos taurus × Bos indicus) cows under tropical climatic condition, Tropical Animal Health and Production.

Renata de Fátima Bretanha Rocha et al., 2019, Differential expression of HSF1 and HSPA6 genes and physiological responses in Angus and Simmental cattle breeds, Journal of Thermal Biology.

Richard Osei-Amponsah et al., 2019, Genetic Selection for Thermotolerance in Ruminants, Animals.

Roger F Duncan et al., 2005, Inhibition of Hsp90 function delays and impairs recovery from heat shock, The FEBS Journal.

Ruidong Xiang et al., 2018, Genome variants associated with RNA splicing variations in bovine are extensively shared between tissues, BMC Genomics

Sébastien Fournel et al., 2017, Practices for Alleviating Heat Stress of Dairy Cows in Humid Continental Climates: A Literature Review, Animals.

Sertaç Atalay et al., 2024, Identification of Heat Stress-Associated the HSPA1A (HSP70) Gene in Holstein and Turkish Grey Cattle, International Journal of Innovative Approaches in Agricultural Research.

Shannon L Cartwright et al., 2023, Impact of heat stress on dairy cattle and selection strategies for thermotolerance: a review, Frontiers in Veterinary Science.

Shi-Lung Lin et al., 2006, Intronic MicroRNA (miRNA), BioMed Research International.

T M Badri et al., 2018, Genetic polymorphism in Hsp90AA1 gene is associated with the thermotolerance in Chinese Holstein cows, Cell Stress and Chaperones.

Tanya Dewey et al., Bos taurus (domesticated cattle), Animal Diversity Web (ADW), University of Michigan, https://animaldiversity.org/accounts/Bos_taurus/ .

Tarig Badri et al., 2021, Single nucleotide polymorphisms in HSP70–1 gene associated with cellular heat tolerance in Chinese Holstein cows, *Animal Gene*.

William B. Pratt et al., 2003, Regulation of Signaling Protein Function and Trafficking by the hsp90/hsp70-Based Chaperone Machinery, *Sage journals*.

Zaheer Abbas et al., 2020, Association Analysis of Polymorphisms in the 5' Flanking Region of the HSP70 Gene with Blood Biochemical Parameters of Lactating Holstein Cows under Heat and Cold Stress, *Animals*.

Zhao-Shi Xu et al., 2012, Heat Shock Protein 90 in Plants: Molecular Mechanisms and Roles in Stress Responses, *International Journal of Molecular Sciences*.

Zhihui Zhu et al., 2018, The small heat shock proteins, especially HspB4 and HspB5 are promising protectants in neurodegenerative diseases, *Neurochemistry International*