



Εξέλιξη των γονιδίων *Hsp70* και συσχέτιση με οικολογικούς παράγοντες

Evolution of *HSP70* Genes and Their Association With Ecological Factors



Παναγιώτης Τσίρκας του Ελευθερίου

Λάρισα, 2025

Τριμελή Επιτροπή

ΓΙΑΝΝΟΥΛΗΣ ΘΕΜΙΣΤΟΚΛΗΣ: Αναπληρωτής Καθηγητής Γενετική Ζωικών Πληθυσμών: Γονιδιωματική, Εξέλιξη, Βιοποικιλότητα, Τμήμα Επιστήμης Ζωικής Παραγωγής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΜΑΜΟΥΡΗΣ ΖΗΣΗΣ: Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

ΤΣΙΠΟΥΡΛΙΑΝΟΣ ΑΝΔΡΕΑΣ: Συμβασιούχος Διδάσκοντας Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Ευχαριστίες

Η παρούσα πτυχιακή εκπονήθηκε στο εργαστήριο «Γενετικής Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας», από τον Μάρτιο του 2025 έως τον Σεπτέμβριο του 2025. Θα ήθελα πρώτα, να εκφράσω την ιδιαίτερη εκτίμηση μου στον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Γιαννούλη Θεμιστοκλή για την αδιάλειπτη καθοδήγηση, τις χρήσιμες συμβουλές και την πολύτιμη βοήθεια του καθ' όλη την διάρκεια της συνεργασίας, καθώς και για την ευκαιρία που μου έδωσε για την υλοποίηση αυτής της πτυχιακής εργασίας. Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω τον συνεπιβλέποντα μου κ. Μαμούρη Ζήση για την υποστήριξη και τις χρήσιμες κατευθύνσεις του. Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω επίσης και σε όλα τα μέλη του εργαστηρίου Γενετικής Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας. Πιο συγκεκριμένα στον Αγγελακόπουλο Ραφαήλ για την πολύτιμη συνδρομή και καθοδήγηση του καθ' όλη την διάρκεια εκπόνηση της πτυχιακής μου εργασίας και που απαντούσε σε κάθε ερώτησή μου, μικρή ή μεγάλη, στον Ελένη Κωνσταντίνο για το ευχάριστο κλίμα και τις άψογες μουσικές επιλογές, καθώς και στον κ. Τσιπουρλιάνο Ανδρέα για τις χρήσιμες επισημάνσεις και την γενναιόδωρη μεταλαμπάδευση των γνώσεων του. Θα ήθελα να ευχαριστήσω επίσης και τους φίλους μου Κωνσταντία, Λάουρα, Ορθοδοξία και Σουζάνα που με στήριξαν με κάθε δυνατό τρόπο και ήταν πάντα δίπλα μου όλο αυτό το διάστημα. Τέλος, δεν θα μπορούσαν να μην ευχαριστήσω και την οικογένεια μου: αγαπημένο μου πατέρα, μητέρα, Έφη και Δήμητρα σας ευχαριστώ για όλη την ψυχική ενθάρρυνση και όλα τα εφόδια που μου προσεφέρατε για να καταφέρω να ολοκληρώσω αυτό το ταξίδι.

Περίληψη

Η άνοδος της παγκόσμιας θερμοκρασίας αποτελεί ένα ζήτημα μείζονος σημασίας και αυξανόμενης ανησυχίας, καθώς επηρεάζει σε μεγάλο βαθμό τόσο τις τροπικές όσο και τις εύκρατες ζώνες του πλανήτη. Οι επιπτώσεις της είναι εμφανείς σε ένα ευρύ φάσμα οργανισμών, συμπεριλαμβανομένων ζώων, ανθρώπων αλλά και φυτών, τα οποία καλούνται να προσαρμοστούν σε μεταβαλλόμενα και ολοένα πιο ακραία κλιματικά δεδομένα. Ιδιαίτερα σημαντική είναι η αρνητική επίδραση που ασκείται στην επιβίωση, την υγεία και τη γονιμότητα των παραγωγικών ζώων, όπως οι αγελάδες, με άμεσες συνέπειες στην αγροτική οικονομία και στην παγκόσμια επισιτιστική ασφάλεια. Με την αύξηση της θερμοκρασίας, οι αγελάδες, αλλά και άλλα πλακουντοφόρα θηλαστικά, οδηγούνται σε θερμική καταπόνηση, η οποία εκδηλώνεται με μείωση της πρόσληψης τροφής, σημαντική πτώση στην παραγωγή γάλακτος, μείωση της αναπαραγωγικής τους ικανότητας και, σε ακραίες περιπτώσεις, ακόμη και θνησιμότητα. Το φαινόμενο αυτό καθιστά αναγκαία τη διερεύνηση των μηχανισμών που συνδέονται με τη θερμοανθεκτικότητα και, ειδικότερα, την προέλευση και εξέλιξη των γονιδίων που σχετίζονται με την απόκριση στο θερμικό στρες. Τίθεται, λοιπόν, η ανάγκη να εξεταστεί πώς τα γονίδια αυτά έχουν διαμορφωθεί υπό την επίδραση εξελικτικών πιέσεων και ποιος είναι ο βαθμός στον οποίο η φυσική επιλογή συνέβαλε στη διατήρηση ή την τροποποίησή τους.

Στην παρούσα μελέτη αναλύεται η εξελικτική πορεία δεκατρία γονιδίων που ανήκουν στην οικογένεια *HSP70*, μιας οικογένειας γονιδίων γνωστής για τον κρίσιμο ρόλο της στην κυτταρική προστασία έναντι του θερμικού στρες. Τα γονίδια αυτά μελετήθηκαν σε αντιπροσωπευτικό σύνολο θηλαστικών ειδών, τα οποία ζουν, αναπτύσσονται και αναπαράγονται σε περιβάλλοντα με εντελώς διαφορετικές θερμοκρασιακές συνθήκες, καλύπτοντας έτσι ένα ευρύ φάσμα οικολογικών και κλιματικών παραμέτρων.

Για να διερευνηθεί εάν τα γονίδια αυτά υπόκεινται σε εξελικτικές πιέσεις που προέρχονται από περιβαλλοντικούς παράγοντες, κατασκευάστηκαν φυλογενετικά δέντρα, για κάθε ένα από τα γονίδια και τα αποτελέσματα συγκρίθηκαν με το species tree των ίδιων ζώων. Οι νουκλεοτιδικές αλληλουχίες που αξιοποιήθηκαν ανακτήθηκαν από τις βάσεις δεδομένων Ensembl και NCBI, με τη χρήση του αλγορίθμου BLAST, διασφαλίζοντας την ακρίβεια και την πληρότητα των δεδομένων. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης κατέδειξαν ότι κανένα από τα δεκατρία φυλογενετικά δέντρα δεν παρουσίασε απόκλιση από το species tree, γεγονός που υποδηλώνει ότι δεν υπήρχε καμία ένδειξη φυσικής επιλογής ή εξελικτικής πίεσης επί των συγκεκριμένων γονιδίων. Για την περαιτέρω επιβεβαίωση της υπόθεσης αυτής, εφαρμόστηκε η μέθοδος FEL μέσω της διαδικτυακής πλατφόρμας βιοπληροφορικής Datamonkey.

ABSTRACT

The rise of global temperature constitutes an issue of major significance and growing concern, as it profoundly affects both tropical and temperate regions of the planet. Its impacts are evident across a wide range of organisms, including animals, humans, and plants, all of which are compelled to adapt to increasingly variable and extreme climatic conditions. Of particular importance is the detrimental effect on the survival, health, and fertility of livestock, such as cattle, with direct consequences for agricultural economies and global food security. As temperatures rise, cattle and other placental mammals experience heat stress, manifested in reduced feed intake, substantial declines in milk production, diminished reproductive capacity, and, in extreme cases, mortality. This phenomenon underscores the necessity of investigating the mechanisms underlying thermotolerance, with special emphasis on the origin and evolutionary trajectory of genes associated with the response to thermal stress. It is therefore crucial to examine how these genes have been shaped under the influence of evolutionary pressures and the extent to which natural selection has contributed to their preservation or modification.

The present study analyzes the evolutionary history of thirteen genes belonging to the *HSP70* gene family, a family well recognized for its critical role in cellular protection against thermal stress. These genes were examined across a representative set of mammalian species inhabiting, developing, and reproducing in environments characterized by markedly different thermal conditions, thereby encompassing a wide spectrum of ecological and climatic parameters.

To determine whether these genes have been subjected to evolutionary pressures derived from environmental factors, phylogenetic trees were constructed for each gene and compared to the species tree of the corresponding organisms. Nucleotide sequences were retrieved from the Ensembl and NCBI databases using the BLAST algorithm, ensuring both accuracy and comprehensiveness of the dataset. The results of the analysis revealed that none of the thirteen phylogenetic trees exhibited any deviation from the species tree, indicating no evidence of natural selection or evolutionary pressure acting on these particular genes. To further substantiate this hypothesis, the FEL method was employed via the Datamonkey bioinformatics platform.

Πίνακας Περιεχομένων

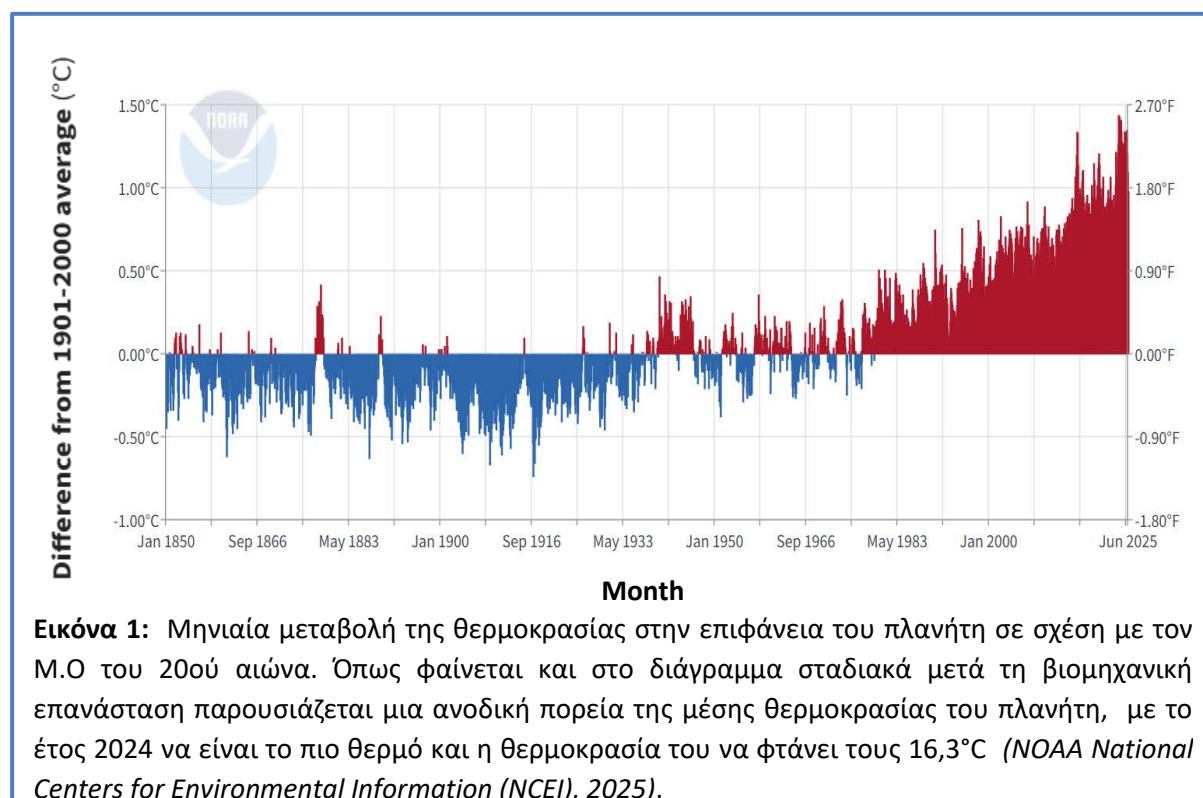
Τριμελή Επιτροπή.....	2
Ευχαριστίες.....	3
Περίληψη.....	4
ABSTRACT	5
Πίνακας Περιεχομένων	6
1. Εισαγωγή.....	8
1.1 Κλιματική αλλαγή	8
1.2 Heat stress and heat shock response	9
1.2.1 Heat Shock Protein 70	11
1.2.2 Δομή των Hsp70	12
1.2.3 Μηχανισμός Hsp70 / Κύκλος ATPases	14
1.2.4 Συνοδοί NEF και JDP	16
1.2.4.1 Hsp110/Grp170.....	16
1.2.4.2 HspBP1/Sil1.....	17
1.2.4.3 BAG	18
1.2.4.4 JDP.....	20
1.2.5 Αλληλεπίδραση πεπτιδίων με Hsp70.....	21
1.2.5.1 Αναδίπλωση πρωτεϊνών	22
1.2.5.2 Πρωτεϊνική αποικοδόμηση.....	23
1.2.5.3 Διάσπαση συσσωματωμάτων	24
1.2.5.4 Μετατόπιση πρωτεϊνών	25
1.3 Επίδραση οικολογικών παραγόντων σε γαλαктоπαγωγικά ζώα	25
2. Σκοπός	27
3. Υλικά και Μέθοδοι	28
3.1 Αναζήτηση γονιδίων και ανάκτηση αλληλουχιών.....	28
3.2 Στοιχισμός αλληλουχιών	31
3.3 Φυλογενετική ανάλυση	31
3.4 Δοκιμασία φυσικής επιλογής	31
4. Αποτελέσματα	33
4.1 Φυλογενετική ανάλυση	33
4.2 Ανάλυση φυσικής επιλογής.....	42

5.	Συζήτηση.....	46
5.1	Εξέλιξη των γονιδίων <i>Hsp70</i>	46
5.2	Φυλογενετικά δέντρα	46
5.2.1	<i>HSPA1A</i> & <i>HSPA1L</i>	47
5.2.2	<i>HSPA12A</i> & <i>HSPA12B</i>	49
5.3	Ανάλυση φυσικής επιλογής.....	49
6.	Βιβλιογραφία	51

1. Εισαγωγή

1.1 Κλιματική αλλαγή

Με τον όρο κλιματική αλλαγή εννοούμε την μεταβολή του κλίματος και των μετεωρολογικών συνθηκών της Γης για μεγάλα χρονικά διαστήματα. Μέχρι πριν το 1800 τέτοιες μεταβολές είχαν κάποια φυσική αιτία όπως, αλλαγές στην ηλιακή δραστηριότητα (ηλιακή ακτινοβολία - ηλιακές εκλάμψεις) ή μεγάλες ηφαιστειακές εκρήξεις. Από την Βιομηχανική Επανάσταση του 18ου αιώνα και μετά, οι ανθρώπινες δράσεις έχουν ενισχύσει περαιτέρω το φαινόμενο. Πιο συγκεκριμένα, δραστηριότητες που περιέχουν την καύση ορυκτών για την παραγωγή ενέργειας, δημιουργούν και συσσωρεύουν αέρια του θερμοκηπίου. Σε αυτά συγκαταλέγονται: το διοξείδιο του άνθρακα (CO_2) και το οξείδιο του αζώτου (NO_2). Αυτά ενισχύουν το Φαινόμενο του Θερμοκηπίου και οδηγούν στην υπερθέρμανση του πλανήτη. Η ηλιακή ακτινοβολία που κανονικά θα έπρεπε να ανακλάται από την επιφάνεια της γης στο διάστημα, παγιδεύεται λόγω των υψηλών συγκεντρώσεων των αερίων του θερμοκηπίου και επανεκπέμπεται πίσω, μεταβάλλοντας έτσι το ισοζύγιο της ακτινοβολίας και προκαλώντας αύξηση στην θερμοκρασία (Zandalinas et al, 2021). Χαρακτηριστικά ο μέσος όρος της θερμοκρασίας στην επιφάνεια της Γης σήμερα είναι περίπου $1,3^\circ\text{C}$ πιο πάνω συγκριτικά με τον 19^ο αιώνα (Εικόνα 1), ενώ η δεκαετία 2015 με 2024 είναι η θερμότερη που έχει καταγραφεί από το 1800, με θερμότερο το έτος 2024. Το 2024 η θερμοκρασία αυξήθηκε κατά 1.29°C , συγκριτικά την μέση τιμή του 20ού αιώνα, και έφτασε στους $13,9^\circ\text{C}$ κατά μέσο όρο (NOAA National Centers for Environmental Information (NCEI), 2025). Με την υπάρχουσα κατάσταση και αν δεν γίνουν άμεσες και δραστικές κινητοποιήσεις αναμένουμε μια αύξηση



μέχρι και 3,1°C μέχρι το τέλος του αιώνα, οδηγώντας σε καταστροφικές συνέπειες για όλους τους οργανισμούς (IPCC, 2023).

Πρόσφατες μελέτες δείχνουν ότι οι άνθρωποι που εκτίθενται σε επιβλαβή θερμότητα έχουν διπλασιαστεί σε σχέση με την προβιομηχανική κλίμακα (95 έναντι 275 εκατομμυρίων ανθρώπων), με προβλέψεις να δείχνουν ότι στα επόμενα 50 χρόνια θα ξεπεράσουν το 1 δις (Cheruiyot et al, 2021). Η υπερθέρμανση του πλανήτη από την κλιματική αλλαγή δύναται να επηρεάσει και άλλους τομείς, από την εκτροφή των ζώων και την καλλιέργεια των φυτών, για την παραλαβή πρώτων υλών, μέχρι την στέγαση και τον τρόπο εργασίας. Οι μεταβολές αυτές δεν έχουν αντίκτυπο μόνο στην ζωή των ανθρώπων αλλά ολόκληρου του ζωικού βασιλείου. Μια μικρή αλλαγή στην θερμοκρασία μπορεί να οδηγήσει σε καταστροφικές συνέπειες για την επιβίωση της άγριας ζωής, από την μείωση της διαθεσιμότητας της τροφής, μέχρι την ίδια την διαβίωση στα τοπικά οικοσυστήματα. Οι υψηλές θερμοκρασίες δημιουργούν στρες στα ζώα επιδρώντας αρνητικά σε καίριες λειτουργίες όπως είναι η αναπαραγωγή, η παραγωγή γάλακτος και αυγών, η μετανάστευση και η χειμέρια νάρκη. Όλα αυτά συνδυαστικά, μπορούν να δημιουργήσουν προβλήματα και σε μας τους ανθρώπους, τόσο στην διαβίωσή μας, μέσω οικονομικών καταστροφών τεραστίων διαστάσεων, όσο και στην ίδια την επιβίωσή μας, λόγω των προβλημάτων υγείας που μπορεί να προκύπτουν.

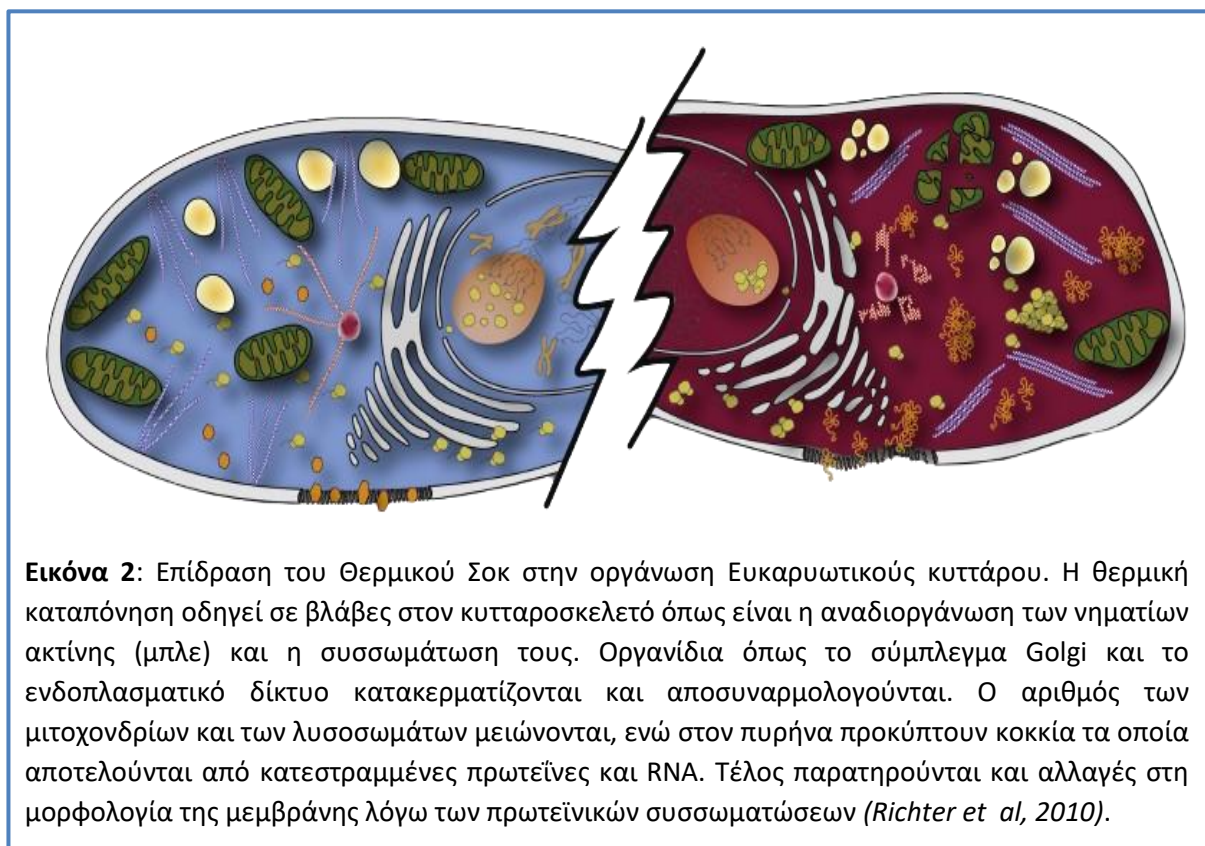
1.2 Heat stress and heat shock response

Συχνά οι οργανισμοί καλούνται να επιβιώσουν σε μια πληθώρα στρεσογόνων καταστάσεων, όπως είναι οι τοξίνες και οι αυξημένες -πάνω από το βέλτιστο- θερμοκρασίες που επηρεάζουν καίριες κυτταρικές δομές και λειτουργίες, οδηγώντας τους σε heat stress. Το heat stress ή στα ελληνικά θερμικό στρες ορίζεται ως η κατάσταση κατά την οποία διαταράσσεται η πρωτεϊνική και η κυτταρική ομοιόσταση, οδηγώντας σε αργή ή προβληματική ανάπτυξη, ακόμα και θάνατο (Kotak et al, 2007). Σαν απόκριση σε αυτό, οι οργανισμοί οδηγούνται σε θερμικό σοκ αυξάνοντας την παραγωγή πρωτεϊνών θερμικού σοκ (HSPs) που έχουν ως στόχο να σταθεροποιήσουν και να βοηθήσουν στην σωστή αναδίπλωση των πρωτεϊνών ή ακόμα και στην αποικοδόμηση τους αν αυτή είναι αναγκαία. Με αυτόν τον τρόπο θα επανέλθει η κυτταρική ομοιόσταση και θα προστατευτούν τόσο το κύτταρο, όσο και ο οργανισμός ο ίδιος, από τις βλαβερές συνέπειες της υψηλής θερμοκρασίας.

Μια αύξηση της θερμοκρασίας μόλις μερικών βαθμών είναι ικανή να πυροδοτήσει τους μηχανισμούς του θερμικού σοκ, κάτι που ισχύει και για τους οργανισμούς οι οποίοι ζουν σε ακραίες συνθήκες (Richter et al, 2010). Η μικρή αυτή αύξηση είναι ικανή να προκαλέσει ξεδίπλωμα πρωτεϊνών ή σχηματισμό πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων, που με τη σειρά τους θα πυροδοτήσουν την απόκριση στο θερμικό στρες.

Το θερμικό σοκ επηρεάζει σημαντικά και την εσωτερική οργάνωση του κυττάρου, πέρα από την ανάπτυξη των πρωτεϊνών. Σημαντικές είναι οι βλάβες που παρατηρούνται σε ευκαρυωτικά κύτταρα, τόσο στον κυτταροσκελετό, μέσω της αναδιοργάνωσης των νημάτων ακτίνης, όσο και στα ενδοπλασματικό δίκτυο και σύστημα Golgi τα οποία διασπώνται (Εικόνα 2). Εξίσου σημαντική είναι και η βλάβη που υφίστανται τα μιτοχόνδρια και τα λυσοσώματα, οδηγώντας τα σε μείωση του αριθμού τους και, κατ' επέκταση, μείωση και των ενδοκυτταρικών επιπέδων ATP. (Toivola et al, 2010).

Εκτός όμως από κυτταρικές δομές και πρωτεΐνες το θερμικό σοκ πλήττει και πυρηνικές διεργασίες, όπως το μάτισμα και η επεξεργασία του RNA. Εμφανίζονται συσσωματώματα από μη σωστά επεξεργασμένα ριβοσωμικά RNA με ριβοσωμικές πρωτεΐνες, καθώς και



μεγάλες δομές RNA-πρωτεΐνης που περιέχουν μη κωδικοποιητικά mRNA, πρωτεΐνες έναρξης της μετάφρασης και άλλες ρυθμιστικές πρωτεΐνες, οδηγώντας σε γενικευμένη καταστολή της πρωτεϊνικής σύνθεσης (Richter et al, 2010). Τέλος προκύπτουν και αλλαγές στην μορφολογία της μεμβράνης οι οποίες συμβαίνουν λόγω της μείωσης των πρωτεϊνών -άρα στην αύξηση της αναλογίας λιπίδια προς πρωτεΐνες- αυξάνοντας την ρευστότητά της, καθώς και την διαπερατότητα σε μόρια μεταγωγής σήματος (Kruun et al, 1983).

Όταν τα κύτταρα έρχονται σε επαφή με στρεσογόνους παράγοντες όπως είναι η UV ακτινοβολία και η χαμηλή ή υψηλή θερμοκρασία, αυξάνουν δραματικά την μεταγραφή γονιδίων για την παραγωγή μιας ειδικής ομάδας πρωτεϊνών των Hsps. Οι οικογένειες των πρωτεϊνών αυτών ταξινομούνται με βάση το μοριακό τους βάρος και τα κύρια μέλη τους είναι οι: Hsp90, Hsp70, Hsp60, Hsp40 και small Hsps. Δρουν κυρίως ως μοριακοί συνοδοί, συμμετέχοντας στην σωστή αναδίπλωση των νεοσυντηθέντων πολυπεπτιδίων και λανθασμένα αναδιπλωμένων και συσσωματωμένων πρωτεϊνών, στη μεμβράνη μετατόπιση των πρωτεϊνών, στον έλεγχο της δραστηριότητας των ρυθμιστικών πρωτεϊνών, καθώς και στην αποικοδόμηση μη σωστά αναδιπλούμενων πρωτεϊνών. Παίζουν επίσης σημαντικό ρόλο και στη μεταγωγή σήματος των κυττάρων, στον κυτταρικό κύκλο, καθώς και στη ρύθμιση της απόπτωσης. Υπό κανονικές συνθήκες οι HSPs αντιπροσωπεύουν το 5-10% των συνολικών κυτταρικών πρωτεϊνών και δρουν βοηθητικά για την διατήρηση της πρωτεϊνικής ομοιόστασης. Κάτω όμως από ακραίες συνθήκες ενεργοποιούνται οι πρωτεΐνες μεταγραφής του θερμικού σοκ (HSFs) που βοηθούν στη μεταγραφή άφθονων HSP και ρυθμίζουν την

ομοιοόσταση του κυττάρου. Στα ευκαρυωτικά κύτταρα ο κυρίως μεταγραφικός παράγοντας είναι ο HSP-1 (Hu et al, 2022).

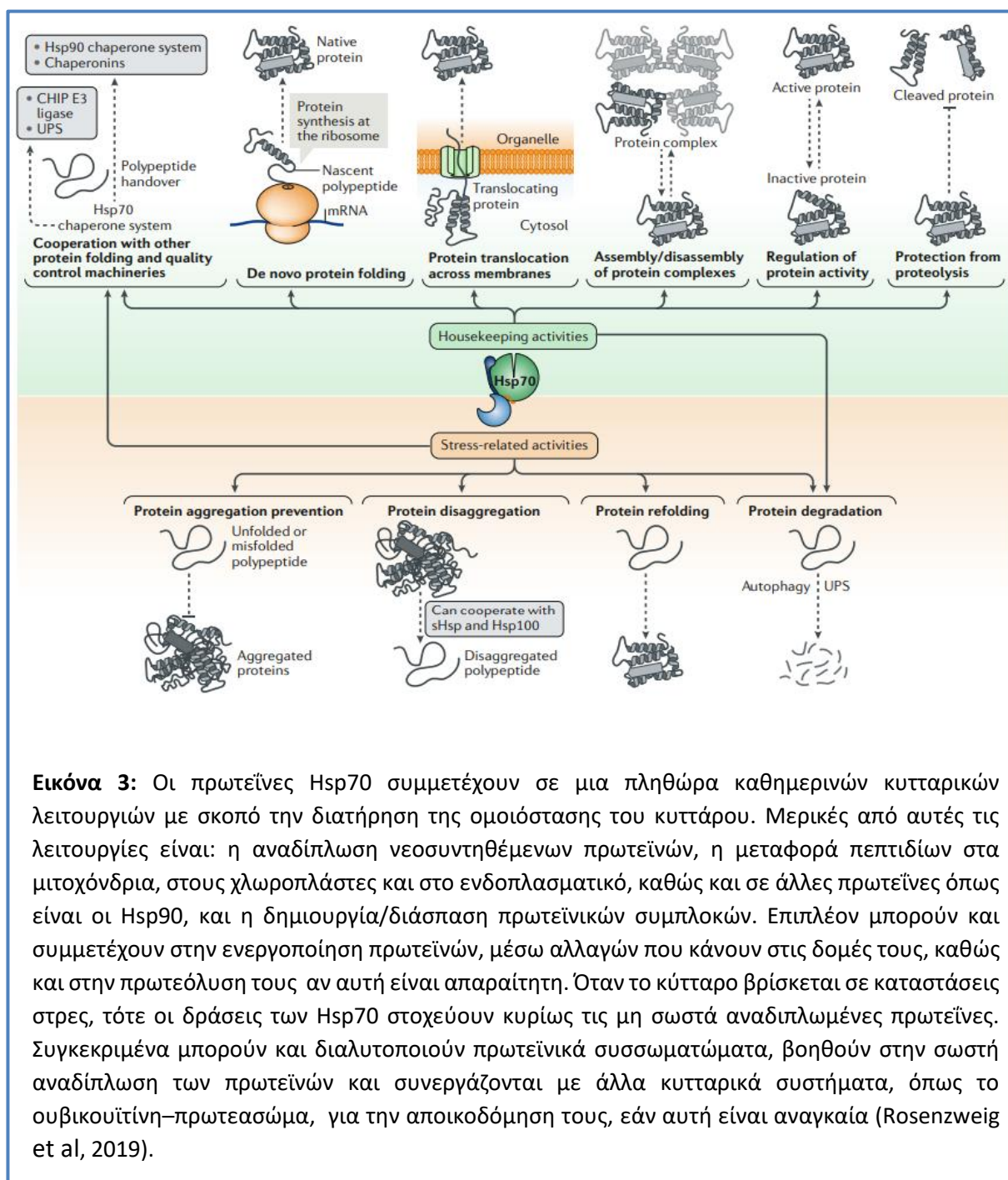
1.2.1 Heat Shock Protein 70

Οι Hsp70/DnaK μοριακοί συνοδοί είναι μια ομάδα πολύ καλά συντηρημένων πρωτεϊνών που εκφράζονται σε όλα τα κύτταρα των πρωκαρυωτικών και ευκαρυωτικών οργανισμών. DnaK ονομάζονται αυτές που εκφράζονται στα προκαρυωτικά, ενώ Hsp70 αυτές των ευκαρυωτικών. Όσον αφορά των ευκαρυωτικών υπάρχουν 2 κατηγορίες, αυτές που η έκφραση τους επάγεται από στρες που ονομάζονται Hsp70 και βοηθούν στην αντιμετώπιση η περιβαλλοντικών αλλαγών, και οι HSC70 που εκφράζονται σταθερά. Μέσα στο κύτταρο μπορούμε να τις βρούμε σε πολλές διαφορετικές θέσεις συμπεριλαμβανομένου του κυτταροπλάσματος, του ενδοπλασματικού δικτύου, των μιτοχονδρίων και του πυρήνα (Εικόνα 3) (Hu et al, 2022). Διαθέτουν ένα ευρύ φάσμα κυτταρικών λειτουργιών που επιτυγχάνεται τόσο μέσω της εξέλιξης των γονιδίων *Hsp70*, έχοντας δημιουργήσει πολύ εξειδικευμένους συνοδούς Hsp70, όσο και από την συνεργασία τους με άλλες HSP και με συν-συνοδούς που τους στρατολογούν οι ίδιες επιλεκτικά ανάλογα την εκάστοτε κυτταρική λειτουργία. Μερικές από τις λειτουργίες τους, είναι η αναδίπλωση (folding) των νεοσυντηθέντων πρωτεϊνών, η μεταφορά πολυπεπτιδίων στα μιτοχόνδρια, στους χλωροπλάστες και στο ενδοπλασματικό δίκτυο (ER), η αποσυναρμολόγηση πρωτεϊνικών συμπλόκων, καθώς και η ρύθμιση της λειτουργικότητας των πρωτεϊνών. Όταν το κύτταρο βρίσκεται σε κατάσταση θερμικού στρες, τότε αρχίζουν να συμμετέχουν και σε άλλες λειτουργίες που σχετίζονται με την διατήρηση την πρωτεϊνικής ομοιοόστασης στο κύτταρο (Εικόνα 3). Έτσι λοιπόν, οι Hsp70 ασκούν προστατευτική δράση στα κύτταρα έναντι των βλαβερών επιδράσεων που προκύπτουν από πληθώρα πρωτεοτοξικών καταπονήσεων, παθοφυσιολογικών καταστάσεων, αλλά και της γήρανσης, οι οποίες μπορούν να διαταράξουν την πρωτεϊνική ομοιοόσταση. (Rosenzweig et al, 2019).

Υπάρχουν 3 αλληλένδετες λειτουργίες των Hsp70 πρωτεϊνών κατά το θερμικό στρες που παίζουν ρόλο στην σωστή αναδίπλωση των πρωτεϊνών χωρίς να αλλάξουν το τελικό αποτέλεσμα: η αποτροπή συσσωματώματος, η ενίσχυση αναδίπλωσης στην φυσιολογική διαμόρφωση, καθώς και η διαλυτοποίηση και η εκ νέου αναδίπλωση ήδη συσσωματωμένων πρωτεϊνών. Αυτές οι λειτουργίες βασίζονται στην ιδιότητά τους να αλληλοεπιδρούν, μαζί με τις συν-συνοδούς πρωτεΐνες όπως οι NEF (Nucleotide Exchange Factor) και οι JPD (J-Domain Protein), με υδρόφοβα πεπτιδικά τμήματα πρωτεϊνών, με τρόπο που ελέγχεται από την υδρόλυση του ATP που πραγματοποιούν οι ίδιες (Mayer et al, 2005).

Η μετέπειτα αναδίπλωση των πρωτεϊνών εξαρτάται από την εκάστοτε Hsp70 και συμβαίνει σε ένα χρονικό περιθώριο μερικών λεπτών, εναλλάσσοντας μεταξύ καταστάσεων που βρίσκονται συνδεδεμένες στους συνοδούς και ελεύθερες μέχρι το μόριο συνολικά να πάρει την σωστή διαμόρφωση. Υπάρχουν 2 εναλλακτικοί τρόποι με τους οποίους συμβαίνει αυτό και στον πρώτο μηχανισμό οι Hsp70 παίζουν έναν παθητικό ρόλο. Συγκεκριμένα προσπαθούν να διατηρήσουν την ελεύθερη συγκέντρωση της πρωτεΐνης αρκετά χαμηλή, μέσω ενός επαναλαμβανόμενου κύκλου δέσμωσης και απελευθέρωσης, ώστε να αποφευχθεί η δημιουργία συσσωματωμάτων και έτσι να μπορούν τα ελεύθερα τμήματα να αναδιπλωθούν πίσω στην φυσική τους κατάσταση. Ο δεύτερος μηχανισμός βασίζεται πάλι στην λογική επαναλαμβανόμενης δέσμωσης και απελευθέρωσης τμημάτων, προκαλώντας ένα «τοπικό

ξεδίπλωμα» στην πρωτεΐνη που οδηγεί σε ξεμπέρδεμα ενός λανθασμένα αναδιπλωμένου τμήματος (Ben-Zvi et al, 2001).

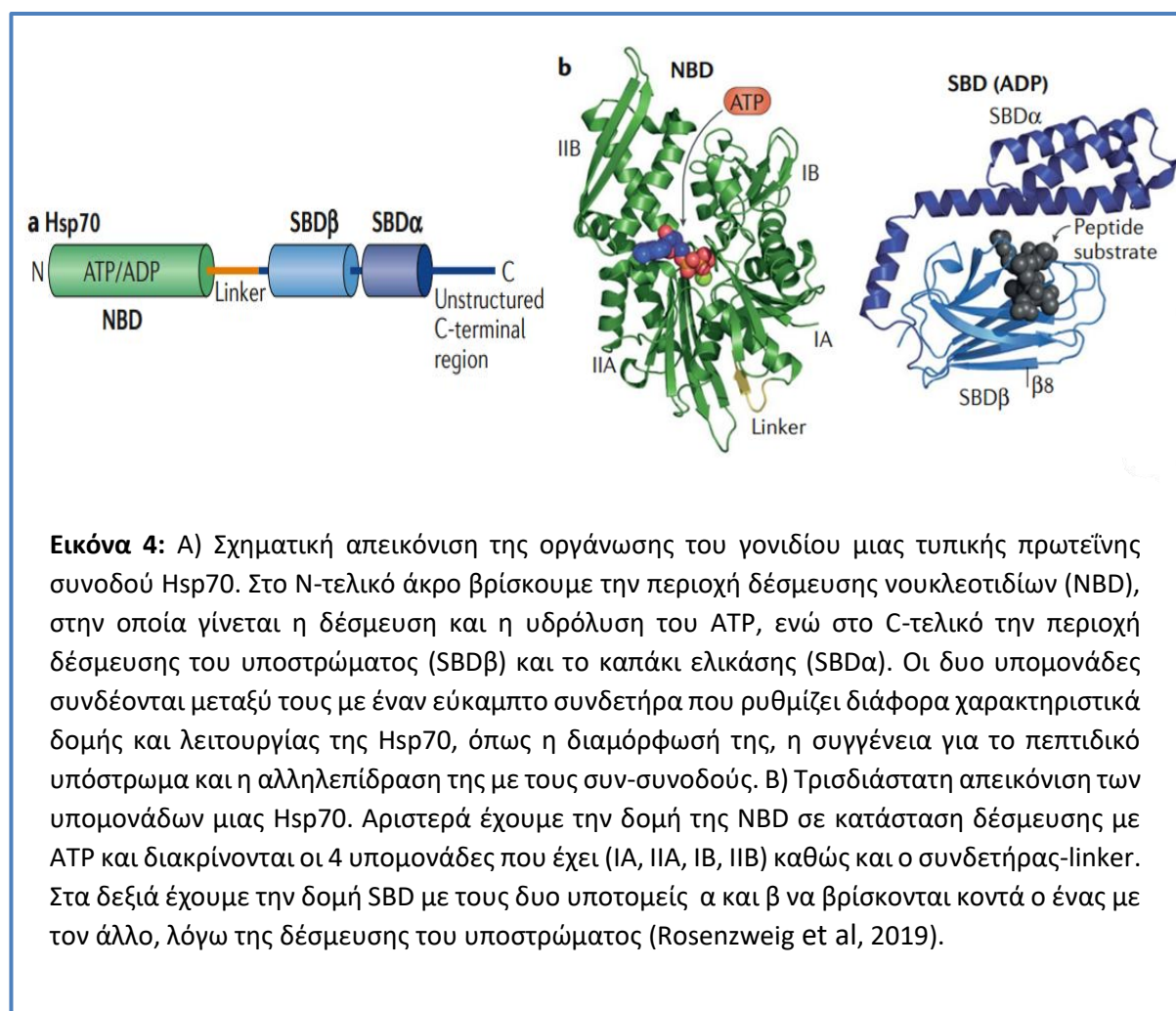


1.2.2 Δομή των Hsp70

Η δράση των Hsp70 ως μοριακών συνοδών βασίζεται κυρίως στον αλλοστερικό έλεγχο της αλληλεπίδρασής τους με τα υποστρώματα, ο οποίος ρυθμίζεται από συντονισμένες κινήσεις των υπομονάδων τους με την βοήθεια της υδρόλυσης του ATP. Όλα τα μέλη της οικογένειας έχουν τουλάχιστον δύο από τα τέσσερα δομικά στοιχεία μια τυπικής Hsp70. Αρχικά αποτελούνται από ένα N-τελικό άκρο δέσμευσης νουκλεοτιδίων (NBD), μεγέθους 45 kDa, στο οποία δεσμεύεται και υδρολύεται το ATP και ένα C-τελικό άκρο δέσμευσης

υποστρώματος (SBD) μεγέθους 25 kDa, που αποτελείται από 2 περαιτέρω υποτομείς. Έναν υποτομέα δέσμευσης υποστρώματος που αποτελείται από δύο β-πτυχωτά φύλλα τοποθετημένα αντικριστά (SBDβ) μεγέθους 15 kDa, δημιουργώντας μια κοιλότητα πρόσδεσης πολυπεπτιδίων, με μια κεντρική υδρόφοβη «τσέπη» και έναν α-ελικοειδή υποτομέα (SBDα) μεγέθους 10 kDa που δρα ως καπάκι και ελέγχει την πρόσβαση στην κοιλότητα του SBDβ (Εικόνα 4a). Στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς οι Hsp70 του κυτταροπλάσματος και του πυρήνα συνήθως καταλήγουν πάντα σε ένα συντηρημένο μοτίβο αλληλουχιών EEVD (Glu-Glu-Val-Asp), το οποίο βοηθά τους συνοδούς να αλληλοεπιδρούν με τους ειδικούς συν-συνοδούς (Ben-Zvi et al, 2001), (Rosenzweig et al, 2019).

Η NBD έχει αναδίπλωση που μοιάζει πολύ με αυτή της ακτίνης, αποτελείται από τέσσερις υποτομείς (IA, IB, IIA, IIB) που μοιράζονται σε δύο λοβούς και χωρίζονται από μια βαθιά



σχισμή, το καταλυτικό κέντρο, στο οποίο συνδέεται το ATP, ώστε να συντονίζει την κίνηση τους. Η λειτουργία της είναι να δεσμεύει και να υδrolύει ATP/ADP, κάτι που απαιτεί πολλά υδρόφιλα κατάλοιπα (π.χ. Lys, Asp, Glu) για να αλληλοεπιδρούν με το φωσφορικό τμήμα του νουκλεοτιδίου. Κάθε λοβός μπορεί να διαιρεθεί σε υποτομείς, IA και IB στον έναν και IIA και IIB στον δεύτερο, με τους IA και IIA να ενώνονται για να σχηματίσουν τον πυθμένα του θύλακα νουκλεοτιδίων. Η σχισμή που δημιουργείται από τις υπομονάδες IB και IIB μπορεί να είναι σημείο ρύθμισης, δηλαδή θέση όπου άλλα μόρια ή πρωτεΐνες συνδέονται για να επηρεάσουν τη λειτουργία του Hsp70. Το νουκλεοτίδιο μπορεί να συνδεθεί σε ένα σύμπλοκο

με ένα ιόν Mg^{2+} και δύο ιόντα K^+ που βρίσκονται σε επαφή με όλες τις υπομονάδες. Το ATP μπορεί να τοποθετείται στην ενεργό θέση μέσω αλληλεπιδράσεων που γίνονται από δύο βρόγχους δέσμησης φωσφορικών και από μια υδρόφοβη περιοχή (MP Mayer et al, 2005). Οι τέσσερις υπομονάδες έχουν εύπλαστη διαμόρφωση, μπορούν δηλαδή να αλλάξουν ανάλογα το νουκλεοτίδιο που είναι συνδεδεμένο. Αν είναι το ATP τότε η Hsp70 έχει ανοιχτή διαμόρφωση, ενώ αν είναι το ADP ή κανένα νουκλεοτίδιο τότε έχουμε κλειστή διαμόρφωση (Εικόνα 4b). Μέσα στην σχισμή δέσμησης, υπάρχουν συντηρημένα αμινοξέα, τα οποία συγκρατούν τα νουκλεοτίδια και ταυτόχρονα βοηθούν την υδρόλυση του ATP σε ADP + Pi (Young et al, 2010).

Η SBD αποτελείται και αυτή από 2 υπομονάδες, την α και β . Η SBD α είναι μια α -ελικοειδής δομή στο C-τελικό άκρο, που σχηματίζει ένα καπάκι πάνω από την θέση δέσμησης του υποστρώματος, περιοχή SBD β . Όταν έχουμε συνδεδεμένο το υπόστρωμα τότε το καπάκι κλείνει πλήρως, ώστε να μείνει σταθερά συνδεδεμένο. Η SBD β αποτελείται από μια δεσμίδα οκτώ β -κλώνων οργανωμένους σε τέσσερα β -φύλλα που περικλείουν μια υδρόφοβη αύλακα πρόσδεσης πεπτιδίων (Εικόνα 4b). Συνδέεται με την NBD μέσω ενός συνδετήρα-linker που είναι απαραίτητος για τον αλλοστερικό μηχανισμό που συζεύγει τη δέσμηση/υδρόλυση ATP με την πρόσδεση υποστρώματος (Kohler V et al, 2020).

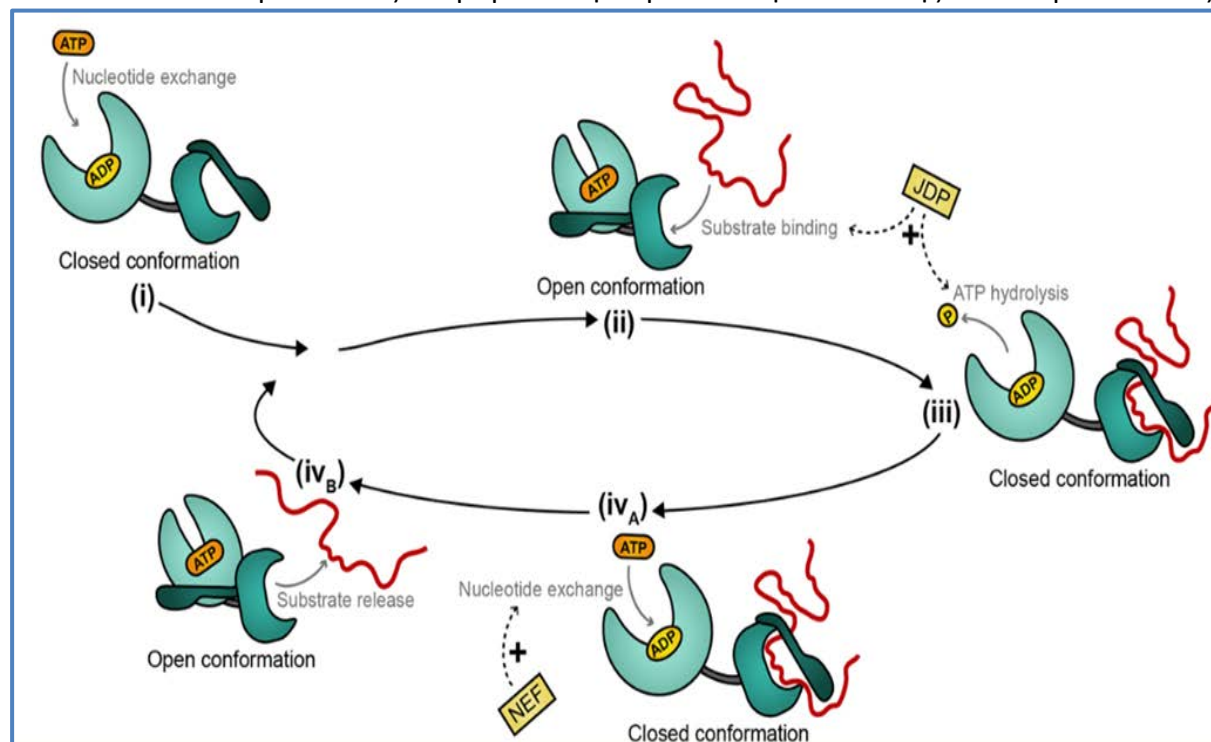
1.2.3 Μηχανισμός Hsp70 / Κύκλος ATPases

Οι Hsp70 έχουν την δυνατότητα να συνδέονται και να αποσυνδέονται με τα πεπτιδικά υποστρώματα με τρόπο ελεγχόμενο, μέσα από μια σειρά πολύπλοκων αλλοστερικών μηχανισμών που συσχετίζουν την υδρόλυση ATP στον NBD με τη δέσμηση του υποστρώματος από τον SBD.

Στην αρχική κατάσταση, πριν από τη δέσμηση κάποιου πεπτιδίου, στη σχισμή της υπομονάδας NBD μπορεί να βρίσκεται συνδεδεμένο το νουκλεοτίδιο ADP ή να απουσιάζει πλήρως. Οι δύο υπομονάδες της Hsp70 τότε, βρίσκονται σε απομακρυσμένη και απομονωμένη διάταξη και ενώνονται μέσω ενός εύκαπτου και εκτεθειμένου σε αλλαγές συνδετήρα. Ο συνδετήρας είναι ένα έντονα συντηρημένο και φορτισμένο πεπτίδιο, με αλληλουχία GDVKDVLILLDVT (Chakafana et al, 2019). Η SBD σε αυτή την φάση, είναι σε κλειστή διαμόρφωση με τον cup-domain SBD α να είναι πάνω από τον SBD β (Εικόνα 5, I). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα ο SBD να μπορεί να δεσμεύει πεπτιδικά υποστρώματα με πολύ υψηλή συγγένεια, της τάξεως $KD = 0,1 - 1\mu M$, αλλά όμως με πολύ αργούς ρυθμούς δέσμησης /αποδέσμησης (Rosenzweig et al, 2019).

Όταν πραγματοποιηθεί νουκλεοτιδική ανταλλαγή με τη συνδρομή των NEF, και το ADP αντικατασταθεί από ATP, προκαλείται περιστροφή των λοβών της υπομονάδας NBD. Η νέα αυτή διάταξη επιτρέπει, αφενός, τη σύνδεση του συνδετήρα και των υποτομέων της SBD σε διαφορετικές θέσεις πάνω στην υπομονάδα NBD+ATP και, αφετέρου, την αποσύνδεση του cup-domain SBD α από τον SBD β (Εικόνα 5, II). Με την σειρά του, ο SBD β «πιέζει» τους δύο λοβούς της NBD αλλάζοντας την διαμόρφωσή τους σε ακατάλληλη για υδρόλυση του ATP. Η δραστηριότητα της ATPάσης μειώνεται αισθητά σε 1 μόριο ATP ανά 6–40 λεπτά. Ταυτόχρονα η πρόσδεση ATP αποδυναμώνει την αλληλεπίδραση SBD–υποστρώματος, η SBD υιοθετεί μια ανοιχτή διαμόρφωση και αυξάνει το KD περίπου 10 φορές, με παράλληλη αύξηση στον ρυθμό σύνδεσης ($\times 100$) και αποσύνδεσης ($\times 1000$) πεπτιδίων (Rosenzweig et al, 2019). Μόλις συνδεθεί το πεπτιδικό υπόστρωμα στην υπομονάδα SBD μέσα την υδρόφοβη «τσέπη» που

διαθέτει, με την βοήθεια των πρωτεϊνών με j- τομέα, ο SBDβ και το κάλυμμα SBDα απελευθερώνονται από την NBD, υιοθετώντας και πάλι την αρχική κλειστή διαμόρφωση (Εικόνα 5, III). Αυτό δίνει την δυνατότητα και στον συνδετήρα να «γλιστρήσει» εκτός της σχισμής και η NBD να επανέλθει στην αρχική της διάταξη, επιτρέποντας της και πάλι την υδρόλυση του ATP σε ADP + Pi. Άρα καταλαβαίνουμε, πως τα πεπτιδικά υποστρώματα που συνδέονται από μόνα τους διεγείρουν την δραστικότητα ATPασης των Hsp70. Τέλος,



Εικόνα 5: Ο κύκλος των Hsp70. Ο αλλοστερικός κύκλος Hsp70 ενώνει την δέσμευση και υδρόλυση του ATP με την δέσμευση και απελευθέρωση των πεπτιδίων υποστρωμάτων. Στην κατάσταση NBD+ADP οι δύο κύριοι τομείς των Hsp70, NBD και SBD παραμένουν απομονωμένοι (I), με την υπομονάδα SBD να είναι σε κλειστή μορφή, εξασφαλίζοντας υψηλή συγγένεια υποστρώματος, αλλά και χαμηλή ικανότητα πρόσδεσης πεπτιδίων. Η δέσμευση του ATP, με νουκλεοτιδική αντικατάσταση, προκαλεί αναδιάταξη των λοβών της NBD (II), αποσταθεροποιεί την αλληλεπίδραση SBD–NBD και οδηγεί την SBD σε ανοιχτή διαμόρφωση. Ως αποτέλεσμα αυξάνεται ο ρυθμός σύνδεσης και αποσύνδεσης πεπτιδίων. Η πρόσδεση του πεπτιδίου στην υδρόφοβη κοιλότητα της SBD (III), με την βοήθεια των πρωτεϊνών με J-τομέα (JDP), προκαλεί επαναφορά της SBD σε κλειστή διαμόρφωση, απελευθέρωση του συνδετήρα και αποκατάσταση της ικανότητας, της NBD να υδρολύει το ATP. Στη συνέχεια οι παράγοντες ανταλλαγής νουκλεοτιδίων (NEF) διευκολύνουν την ανακύκλωση ADP με ATP (IVa), έχοντας ως αποτέλεσμα οι υπομονάδες NBD και SBD, μαζί με τον συνδετήρα, να ξανα έρθουν σε επαφή, η SBD να μεταβεί σε ανοιχτή διαμόρφωση και το πεπτίδιο να απελευθερωθεί (IVβ) (Kohler et al, 2020).

παρέχεται εκ νέου δράση από τους παράγοντες νουκλεοτιδικής ανταλλαγής (NEF). Έχουν τη δυνατότητα να ελέγχουν χρονικά την απελευθέρωση του πεπτιδικού υποστρώματος από τους Hsp70, μέσω της ανταλλαγής νουκλεοτιδίων στην υπομονάδα NBD. Οι NEFs μπορούν και σταθεροποιούν την υπομονάδα NBD σε κατάσταση χωρίς νουκλεοτίδιο, έτσι «ανοίγει» η τσέπη δέσμευσης νουκλεοτιδίων και γίνεται ανταλλαγή των νουκλεοτιδίων από ADP σε ATP

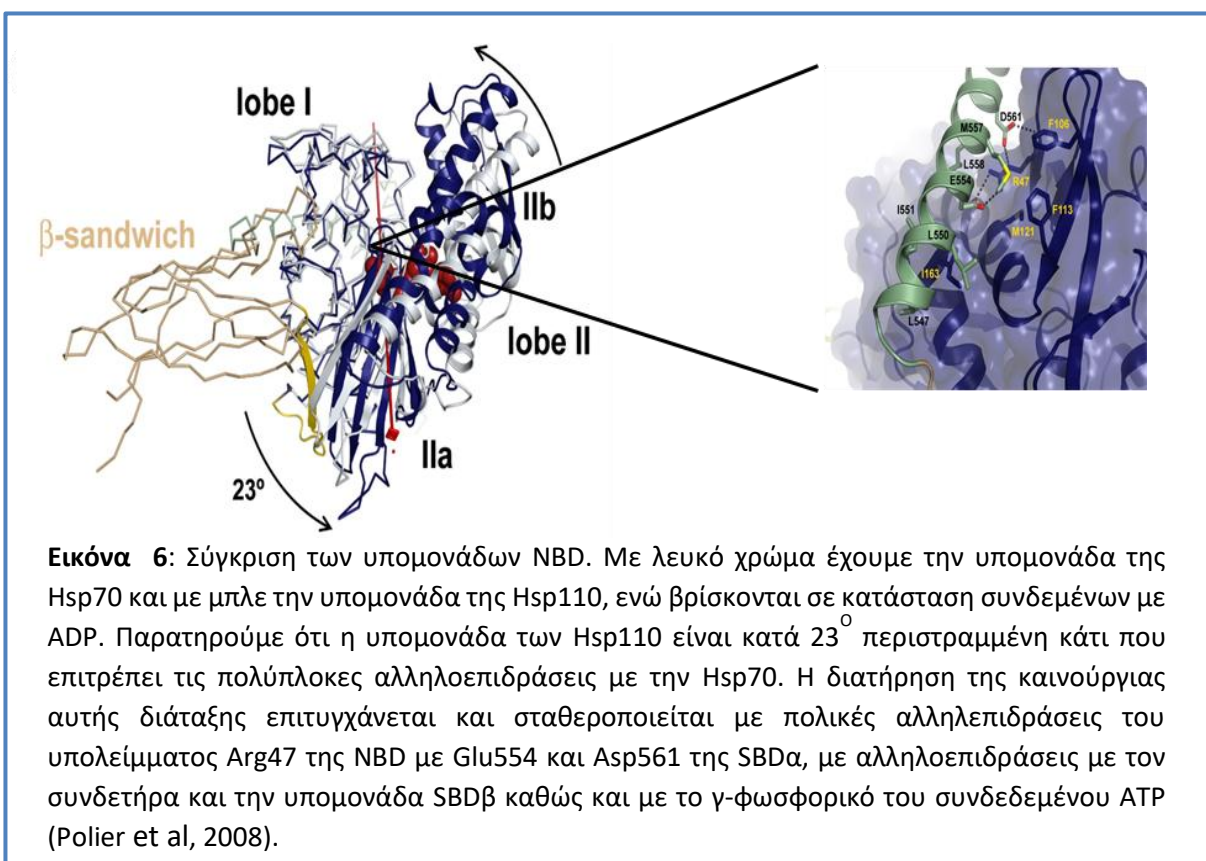
(Εικόνα 5, IVa). Αυτό με την σειρά του επάγει το άνοιγμα της SBD και την απελευθέρωση του πεπτιδίου και την επανασύνδεση των SBDα, SBDβ και του συνδετήρα στην NBD+ATP, ώστε επανεκκινήσει ο κύκλος ATP.

1.2.4 Συνοδοί NEF και JDP

Στα ευκαρυωτικά κύτταρα η ανταλλαγή νουκλεοτιδίων γίνεται με τη βοήθεια των πρωτεϊνών ανταλλαγής νουκλεοτιδίων NEF. Οι NEF μπορούν να ελέγχουν χρονικά, την απελευθέρωση του πεπτιδικού υποστρώματος από τις Hsp70 μέσω της ανταλλαγής ATP – ADP στην υπομονάδα NBD. Στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, υπάρχουν τρεις κύριες οικογένειες NEF που ρυθμίζουν τη δραστηριότητα των Hsp70: οι Hsp110/Grp170, HspBP1/Sil1 και οι πρωτεΐνες BAG. Στο ανθρώπινο γονιδίωμα κωδικοποιούνται 4 ομόλογα για Hsp110, δύο ομόλογα για HspBP1, πέντε πρωτεΐνες της οικογένειας BAG και δυο μιτοχονδριακές GrpE (Bracher et al, 2015).

1.2.4.1 Hsp110/Grp170

Οι πρωτεΐνες της οικογένειας Hsp110 εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα, ενώ οι ομόλογοί τους Grp170 στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Ανήκουν στην υπεροικογένεια των Hsp70, ωστόσο οι αλληλουχίες τους εμφανίζουν μεγαλύτερη πολυμορφία σε σύγκριση με τις άκρως συντηρημένες Hsp70 (Polier et al, 2008), και έχουν εξελιχθεί να λειτουργούν ως NEFs. Δομικά μοιάζουν πάρα πολύ με την ανοιχτή διαμόρφωση της Hsp70, όταν δηλαδή έχει συνδεδεμένο ATP και το καπάκι της, SBDα είναι ανοιχτό. Η δομή τους περιλαμβάνει στο N-τελικό άκρο μια περιοχή δέσμευσης νουκλεοτιδίων NBD, έναν συνδετήρα και στο C-τελικό άκρο 2 υπομονάδες SBD με επιπλέον στοιχεία, τα οποία και τις διαφοροποιούν από τις Hsp70. Οι επιπλέον αυτές εισαγωγές στην περιοχή των β-πτυχωτών φύλλων, αποτελούνται από αλληλουχίες αμινοξέων, πλούσιες σε αρνητικά φορτισμένα κατάλοιπα που έχουν τη δυνατότητα να αλλάζουν την επιφανειακή πολικότητα της SBD, μειώνοντας την ικανότητά



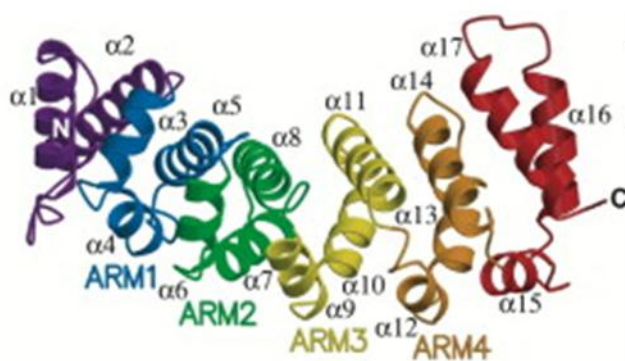
της να δεσμεύει μικρά πεπτίδια όπως οι κλασικές Hsp70. Οι επεκτάσεις στο C-τελικό άκρο σχηματίζουν ένα καπάκι που έχει εξελιχθεί ώστε να διευκολύνει αλληλεπιδράσεις με την NBD άλλων Hsp70 (Chakafana et al, 2019).

Για να λειτουργήσουν οι Hsp110 είναι απαραίτητη η σύνδεση τους με ένα μόριο ATP, χωρίς να γίνει υδρόλυση, που προκαλεί μια σημαντική δομική μετατόπιση της υπομονάδας NBD. Σε σύγκριση με την υπομονάδα NBD των Hsp70-ADP, η NBD των Hsp110 θα «στρίψει» κατά 23°, με την περιοχή IIB να μετατοπίζεται περισσότερο. Αυτή η νέα διάταξη των στραμμένων λοβών διασφαλίζεται και με συνεχείς αλληλεπιδράσεις μεταξύ των υπομονάδων (Εικόνα 6).

Η νέα τοπολογία της NBD θα δώσει την δυνατότητα να γίνουν πολύπλοκες αλληλοεπιδράσεις με την NBD των Hsp70. Συγκεκριμένα οι υπομονάδες NBD των Hsp110 και Hsp70 μπορούν και συνδέονται κατοπτρικά (Young et al, 2010), δημιουργώντας πολλαπλές επαφές στις επιφάνειες και των δυο (Sondermann et al, 2001). Συγκεκριμένα επαφές σχηματίζονται μεταξύ των υποτομών IIB και IB, IIA και IA, και των IB και IIB της Hsp110 και της Hsp70, αντίστοιχα (Polier et al, 2008). Το καπάκι ελικάσης της Hsp110 μπορεί να συνδεθεί και με την δική του NBD και με αυτή της Hsp70, προκαλώντας μια κλίση του υποτομέα IIB Hsp70 προς τα έξω κατά 27°. Αυτό θα οδηγήσει στο άνοιγμα της σχισμής δέσμευσής νουκλεοτιδίων, διευκολύνοντας την απελευθέρωση του ADP και την είσοδο ATP στην Hsp70 (Rosenzweig et al, 2019). Απαραίτητη προϋπόθεση είναι η σύνδεση ATP στην HSP110. Η σύνδεση αυτή, θα αλλάξει την διαμόρφωση της HSP110 και έτσι θα μπορέσει να αλληλοεπιδράσει καλύτερα με την HSP70. Το ATP λοιπόν, δεν είναι απλώς «καύσιμο» εδώ, αλλά δομικό στοιχείο που βοηθάει τις δύο πρωτεΐνες να αλληλοεπιδράσουν σωστά.

1.2.4.2 HspBP1/Sil1

Οι πρωτεΐνες HspBP1 και Sil1 αντιπροσωπεύουν τις κυτοσολικές και ενδοαυλικές μορφές, αντίστοιχα, μιας οικογένειας παραγόντων ανταλλαγής νουκλεοτιδίων. Αποτελούνται εξ ολοκλήρου από α-έλικες με δομή επαναλήψεων Armadillo και μέγεθος 40 kDa. Στο N-τελικό τους άκρο οι α-έλικες δεν επιτελούν κάποιο συγκεκριμένο σκοπό, σε αντίθεση με αυτές του



Εικόνα 7: Δομική αναπαράσταση της HspBP1. Η δευτεροταγή δομή της αποτελείται κυρίως από α-έλικες, 16 στο σύνολο. Οι α-έλικες α3 έως α14 δομούν τον πυρήνα της πρωτεΐνης, δημιουργώντας 4 υπομονάδες, όπου η κάθε μια αποτελείται από τρεις α-έλικες (ARM1-4). Σε κάθε ένα από τα δυο άκρα υπάρχουν δυο μεγαλύτερες α-έλικες που βοηθούν στην αλληλοεπίδραση με την υπομονάδα NBD, της Hsp70 (Shomura et al, 2005).

C-τελικού άκρου που είναι υπεύθυνες για τη δέσμευση της HspBP1 στην Hsp70 (Rauch, 2015). Οι επαναλήψεις των α-έλικων πακεντάρονται σε τέσσερις επαναλαμβανόμενες υπομονάδες (ARM1-4), των τριών α-έλικων η κάθε μια (α3-α14) σχηματίζοντας τον πυρήνα της πρωτεΐνης. Τον υδρόφοβο πυρήνα των 4 υπομονάδων περικλείουν δεξιά και αριστερά τέσσερις α-έλικες -δύο σε κάθε πλευρά- που είναι ελαφρώς μεγαλύτερες από τις κεντρικές (Shomura et al, 2005). Οι συνεχόμενες επαναλήψεις των α-ελικών οδηγούν στον σχηματισμό μια κυρτής και μιας κοίλης επιφάνειας (Εικόνα 7).

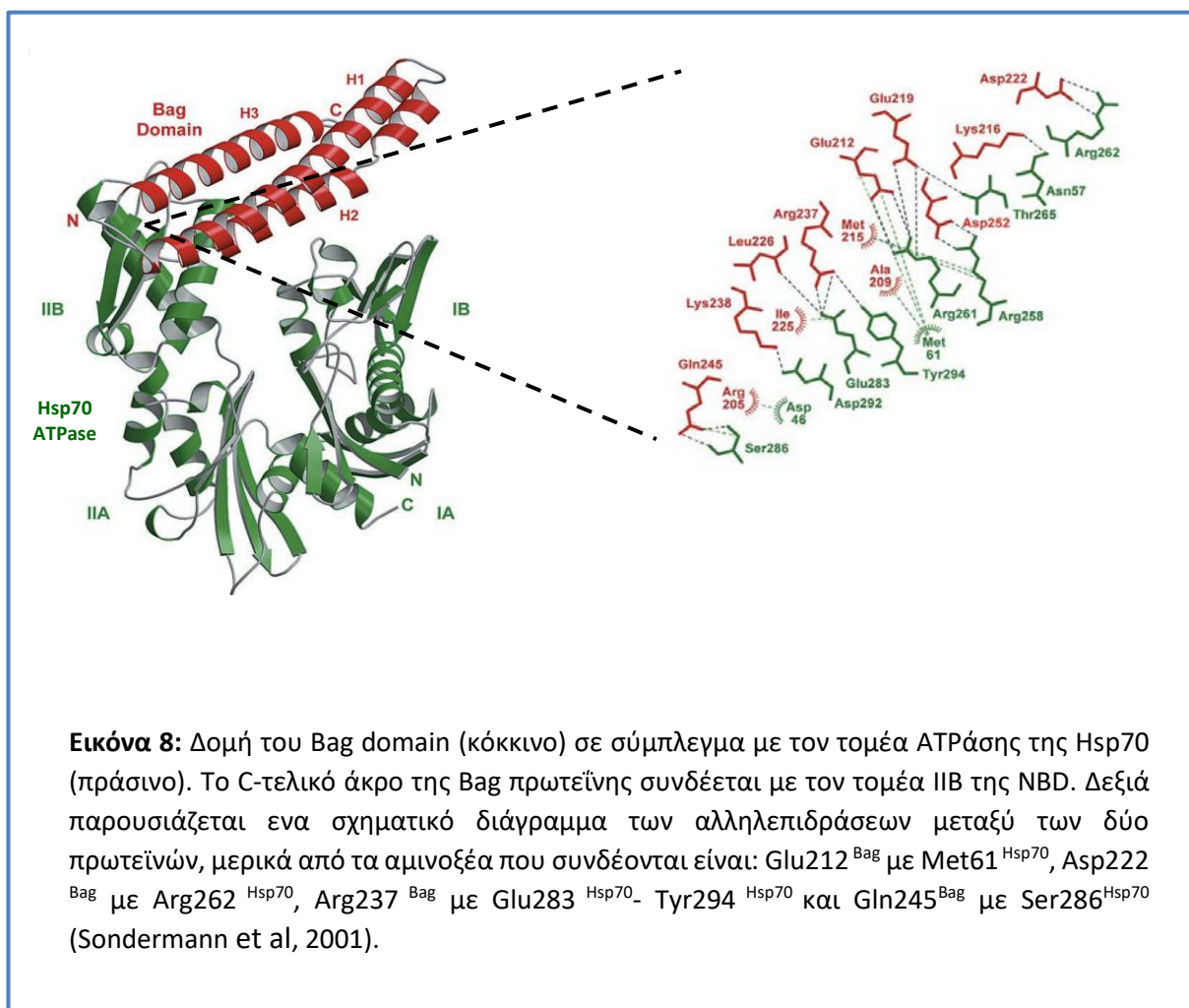
Η HspBP1 σχηματίζει ένα σταθερό σύμπλοκο με την υπομονάδα NBD της Hsp70, απουσίας ATP. Οι επαναλήψεις Armadillo περιελίσσονται γύρω από τον υποτομέα IIB της NBD κάμπτοντάς τον, ενώ ταυτόχρονα αναγκάζουν την Hsp70 να υιοθετήσει διαφορετική διαμόρφωση στην υπομονάδα NBD, προκειμένου να αποφευχθούν πιθανές στερεοχημικές συγκρούσεις του N-τελικού άκρου της HspBP1 και του τομέα IB. Αν δεν γίνονταν τοπικό ξεδίπλωμα το μεγαλύτερο μέρος της HspBP1 θα συγκρούονταν στερεοχημικά με την υποπεριοχή IB (έλικες α1 και α3) (Bracher et al, 2015). Η διαταραχή αυτή στην συνολική δομή της NBD προάγει την απελευθέρωση του συνδεδεμένου νουκλεοτιδίου, αυξάνοντας την αποτελεσματικότητα από 5 έως 10 φορές (Rosenzweig et al, 2019).

1.2.4.3 BAG

Η οικογένεια των πρωτεϊνών BAG, στα θηλαστικά, αποτελείται από 6 ομόλογα μέλη (Bag1-6) και δρουν φυσιολογικά ως πρωτεΐνες NEF. Το μέλος της οικογένειας που έχει μελετηθεί περισσότερο είναι η Bag-1, για την οποία έχουν βρεθεί τέσσερις ισομορφές: Bag-1L (50 kDa), Bag-1M (46 kDa), Bag-1p33 (33 kDa) και Bag-1S (29 kDa) (Mayer et al, 2005). Η δράση τους ως NEF εξηγείται λόγω της ύπαρξης μιας περιοχής Bag, η οποία βρίσκεται συνήθως στο C-τελικό άκρο και τις καθιστά ικανές να αλληλοεπιδρούν με τις Hsp70 και να επάγουν την ανταλλαγή νουκλεοτιδίων. Κάθε περιοχή Bag αποτελείται από τρεις αντιπαράλληλες α-έλικες, μήκους περίπου 30–40 αμινοξέων η καθεμία, με την δεύτερη και την τρίτη έλικα (α2 και α3) να αποτελούν τις θέσεις όπου γίνεται η αλληλεπίδραση του τομέα BAG με τον τομέα ATPάσης των Hsp70 (Mayer et al, 2005). Η περιοχή Bag των πρωτεϊνών Bag3/4/5 είναι μικρότερη σε μήκος από εκείνη της Bag1, σχηματίζοντας έτσι μια μικρότερη δεσμίδα από τρεις α-έλικες που αλληλοεπιδρά με την Hsp70. Από την άλλη, στην πρωτεΐνη Bag2, ο τομέας Bag αποτελείται από μια δέσμη τεσσάρων α-ελικών, γεγονός που της δίνει τη δυνατότητα να συνδέεται ταυτόχρονα με δύο Hsp70. Αυτό μπορεί να βοηθήσει σε περιπτώσεις όπου ένα σύστημα πολλαπλών Hsp70 στοχεύει από κοινού ένα πεπτιδικό υπόστρωμα (Bracher et al, 2015). Όλες οι πρωτεΐνες BAG εξ ορισμού διαθέτουν μια περιοχή Bag, εκτός από την Bag-5, η οποία διαθέτει πέντε.

Για να αλληλοεπιδράσουν οι Bag με τις Hsp70, διαθέτουν και μια μεγάλη ποικιλία τομέων για εξειδικευμένες λειτουργίες. Η BAG1 διαθέτει μια περιοχή που μοιάζει με ουβικιτίνη (UBL), οδηγώντας τα υποστρώματα των Hsp70 σε αποικοδόμηση μέσω του πρωτεάσωματος. Η BAG2 έχει συνδεθεί με την αποικοδόμηση μεγάλων συσσωματωμάτων, ενώ η BAG3 έχει πολλαπλά μοτίβα αλληλεπίδρασης πρωτεΐνης-πρωτεΐνης, τα οποία συνδέουν το σύμπλεγμα Hsp70–BAG3 με τις μικρές πρωτεΐνες θερμικού σοκ Hsp20 (Rauch et al, 2014). Λόγο της ποικιλομορφίας στους τομείς, οι Bag μπορούν να εντοπιστούν σε συγκεκριμένες η κάθε μια

υποκυτταρικές δομές, επιτρέποντας έτσι τη χρονική μεταφορά υποστρωμάτων από την Hsp70 σε άλλα συστήματα ελέγχου ποιότητας πρωτεϊνών.



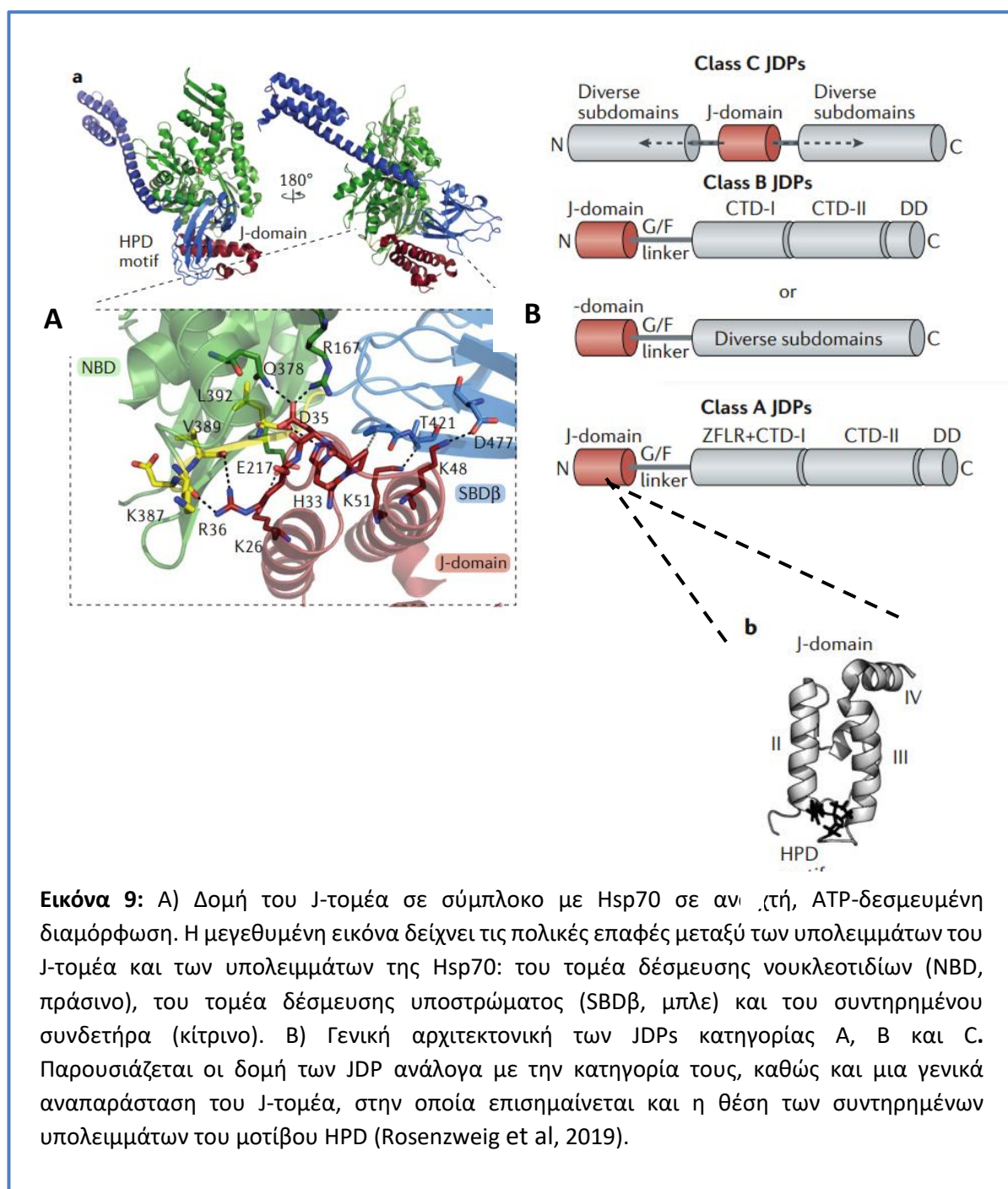
Οι NEF τύπου Bag, μέσω του εξελικτικά διατηρημένου C-τελικού άκρου που περιλαμβάνει τη δέσμη τριών α-ελίκων, συνδέονται κυρίως με την υπομονάδα NBD, και ειδικότερα με τους τομείς IB και IIB της Hsp70. Αυτή η σύνδεση, ομοίως και με αυτή της Hsp110, αλλάζει την διαμόρφωση της NBD, μετατοπίζοντας προς τα έξω τον τομέα IIB, οδηγώντας έτσι στο «άνοιγμα» της σχισμής σύνδεσης νουκλεοτιδίων και την απελευθέρωση του ADP (Doong et al, 2002). Τα μέλη της οικογένειας Bag είναι ικανά να αυξήσουν τον ρυθμό απελευθέρωσης ADP έως και 100 φορές απουσία ανόργανου φωσφορικού και ως 600 φορές παρουσία του, καθιστώντας τα πιο αποτελεσματικές NEF σε σύγκριση με τις HspBP1. Βελτιώνουν, λοιπόν τον χρόνο που απαιτεί η Hsp70 να διαχειριστεί ένα πεπτιδικό υπόστρωμα (Rosenzweig et al, 2019) (Mayer et al, 2005). Στην περίπτωση της Bag2 η περιοχή NEF σχηματίζει ένα συμμετρικό ομοδιμερές και συνδέεται με την NBD σε διαφορετική γωνία από την Bag1, επιτυγχάνοντας ωστόσο το ίδιο αποτέλεσμα (Εικόνα 8).

Οι διεργασίες στις οποίες εμπλέκονται οι πρωτεΐνες BAG φαίνεται να είναι εξαιρετικά ποικίλες, μιας και τα ομόλογα μόρια μπορούν και εμπλέκονται σε διεργασίες μεταγωγής σήματος που συσχετίζονται το κυτταρικό στρες, την απόπτωση, τον πολλαπλασιασμό και της ανάπτυξη, στη μεταγραφική ρύθμιση καθώς και την αποικοδόμηση πεπτιδίων (Mayer et al, 2005).

1.2.4.4 JDP

Όλες οι Hsp70 χρειάζονται την υποστήριξη συν-συνοδών πρωτεϊνών όπως οι JDP, ώστε να μπορεί να ρυθμιστεί η δραστηριότητά τους και η στόχευση του κατάλληλου υποστρώματος. Οι JDP αποτελούν μια ετερογενή ομάδα πρωτεϊνών με μεγάλη ποικιλομορφία στους πιθανούς τομείς τους. Γενικά αποτελούνται από τον J-τομέα και μια α-έλικα με την μορφή φουρκέτας περίπου 70 αμινοξέων με την οποία αλληλοεπιδρά με τις Hsp70. (Εικόνα 9B).

Η σύνδεση μεταξύ των JDPs με τις Hsp70, γίνεται με τις α-έλικες II και III του J-τομέα και με ένα σταθερά συντηρημένο μοτίβο ιστιδίνης-προλίνης-ασπαρτικού (HPD) που βρίσκεται στον συνδετικό βρόγχο τους (Εικόνα 9A). Αυτές οι περιοχές, συνδέονται μεταξύ των υπομονάδων



Εικόνα 9: Α) Δομή του J-τομέα σε σύμπλοκο με Hsp70 σε ανάλυση, ATP-δεσμευμένη διαμόρφωση. Η μεγεθυμένη εικόνα δείχνει τις πολικές επαφές μεταξύ των υπολειμμάτων του J-τομέα και των υπολειμμάτων της Hsp70: του τομέα δέσμευσης νουκλεοτιδίων (NBD, πράσινο), του τομέα δέσμευσης υποστρώματος (SBDβ, μπλε) και του συντηρημένου συνδετήρα (κίτρινο). Β) Γενική αρχιτεκτονική των JDPs κατηγορίας Α, Β και C. Παρουσιάζεται οι δομές των JDP ανάλογα με την κατηγορία τους, καθώς και μια γενικά αναπαράσταση του J-τομέα, στην οποία επισημαίνεται και η θέση των συντηρημένων υπολειμμάτων του μοτίβου HPD (Rosenzweig et al, 2019).

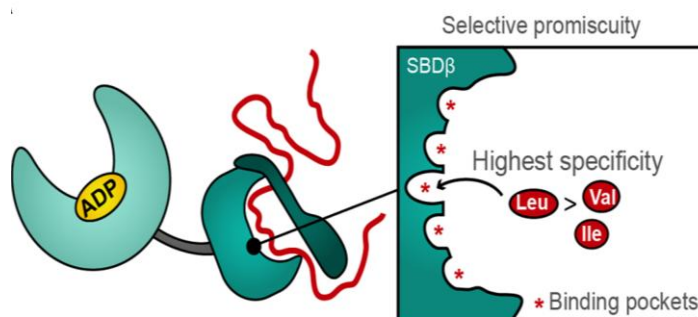
NBD και SBDβ στην περιοχή του συνδετήρα. Οι επαφές αυτές μπορούν και διατηρούνται σε πολύ μεγάλο βαθμό εξελικτικά, κάτι που εξηγείται και με την ύπαρξη ασθενειών, αν υπάρξουν μεταβολές στην αλληλουχία τους. Το μοτίβο HPD μπορεί και αλληλοεπιδρά με αλλοστερικό τρόπο ρύθμισης των Hsp70, επάγοντας και την υδρόλυση του ATP. Η σύνδεσή του με την υπομονάδα SBDβ, της δίνει την δυνατότητα να επικοινωνεί με την υπομονάδα NBD, όταν συνδέεται το πεπτιδικό υπόστρωμα και έτσι να μπορεί να γίνει αποτελεσματικά η παγίδευσή του με την υδρόλυση του ATP αυξάνοντας τη δραστικότητα της ATPάσης έως και 15.000 φορές πάνω από τη βασική (Roman Kityk, 2018). Εκτός από τον J-τομέα οι JDP μπορούν να αλληλοεπιδράσουν και με άλλες δομές με τις Hsp70. Οι περιοχές CTD και CTDII μπορούν να συνδεθούν στα C-τελικά άκρα πολλών Hsp70s. (Rosenzweig et al, 2019).

Η ύπαρξη των JDP έχει αποδειχθεί ότι πολλαπλασιάζει των αριθμών θέσεων δέσμευσης των Hsp70 με το υπόστρωμα τους, αυξάνοντας τη συγγένεια των δυο, μέσω αλλαγών στη διαμόρφωσή των πεπτιδίων. Τα πεπτίδια βρίσκονται συνεχώς κάτω από αλληλοεπιδράσεις που παράγουν ένα μεγάλο σύνολο διαμορφώσεων, οι οποίες αλληλομετατρέπονται τακτικά και βρίσκονται σε ισορροπία μεταξύ τους. Προεπιλέγουν επομένως την διαμόρφωση των πεπτιδικών υποστρωμάτων, καθιστώντας 'τα πιο διαθέσιμα στις Hsp70. Μπορούν και συνδέονται με πρωτεΐνες μέσω αλληλεπίδρασης πολλαπλών θέσεων χαμηλής συγγένειας (Suzuki, et al., 2012).

Για να ενισχυθεί και άλλο η αλληλοεπίδραση με το υπόστρωμα, στα ευκαρυωτικά κύτταρα, οι JDP κατηγορίας A και B συνεργάζονται. Δημιουργούν παροδικά σύμπλοκα, ετεροδιμερή, μέσω δια μοριακών επαφών στους J- τομείς και CTD-I. Η περιοχή του J-τομέα που συνδέεται με το CTD-I είναι ξεχωριστή και διακριτή από αυτή για τις Hsp70. Έτσι το ετεροδιμερές μπορεί και έχει τέσσερεις J-τομείς, Έχοντας τη δυνατότητα να στρατολογούν ταυτόχρονα πολλές Hsp70.

1.2.5 Αλληλεπίδραση πεπτιδίων με Hsp70

Η δραστικότητα των πρωτεϊνών Hsp70 βασίζεται στην ιδιότητα που έχουν να συνδέονται με σύντομα πεπτιδικά μοτίβα, τα οποία βρίσκονται σε όλες τις πρωτεΐνες κάθε 30 με 40 αμινοξέα. Η περιοχή δέσμευσης υποστρώματος SBD παρουσιάζει μεγάλη εξελικτική διατήρηση σε όλες τις πρωτεΐνες της οικογένειας (Clerico et al, 2015). Η σύνδεση πραγματοποιείται χωρίς απόλυτη εξειδίκευση στην αλληλουχία, αλλά με την βοήθεια



Εικόνα 10: Σύνδεση πρωτεϊνικού υποστρώματος με την Hsp70. Η SBDβ διαθέτει πέντε θέσεις δέσμευσης, με την κεντρική κοιλότητα να παρουσιάζει την υψηλότερη ειδικότητα. Δέχεται κατά σειρά προτίμησης Λευκίνη (Leu), Βαλίνη (Val) και η Ισολευκίνη (Ile). (Kohler V, 2020)

υδρόφοβων και πολικών αλληλοεπιδράσεων, σε συγκεκριμένα αλειφατικών αμινοξέων (Kohler et al, 2020). Η υπομονάδα SBD, όπως αναφέραμε αποτελείται από τον τομέα SBDα που είναι το «καπάκι» και τον τομέα SBDβ που είναι η περιοχή δέσμευσης του πεπτιδίου.

Πιο συγκεκριμένα, στον τομέα SBDβ εντοπίζεται μια περιοχή πέντε αμινοξικών θέσεων κρίσιμη για τη δέσμευση του υποστρώματος, στην οποία η σύνδεση πραγματοποιείται κυρίως μέσω υδροφοβικών αλληλεπιδράσεων του πεπτιδίου και δεσμών van der Waals. Η κεντρική πτυχή του τομέα, θέση 0, είναι αυτή που ευθύνεται για την υψηλότερη εξειδίκευση στη σύνδεση του υποστρώματος και συγκεκριμένα για το αμινοξύ Λευκίνη (λιγότερο για τα Βαλίνη και Ισολευκίνη). Οι λοιπές θέσεις γύρω από την κοιλότητα-αψίδα δημιουργούν ένα περιβάλλον υδρόφοβο και με αρνητικό φορτίο (Kohler V, 2020)(Εικόνα10). Η περιοχή δέσμευσης του πεπτιδίου θέτει από μόνη της κανόνες για το ποια τμήματα θα συνδεθούν. Αρχικά λόγω της δομής της μπορεί να αναγνωρίσει μόνο τα πεπτίδια με την κανονική στερεοχημεία των L-αμινοξέων και όχι αυτά που αποτελούνται από D-αμινοξέα. Επιπλέον μπορεί να ξεχωρίσει πεπτίδια με ίδια αμινοξική αλληλουχία αλλά με αντίθετη φορά, έτσι ώστε να μην μπορεί να συνδεθεί το πεπτίδιο απλά γυρνώντας ανάποδα από την πλευρά με το N-τελικό άκρο αντί για το C-τελικό.

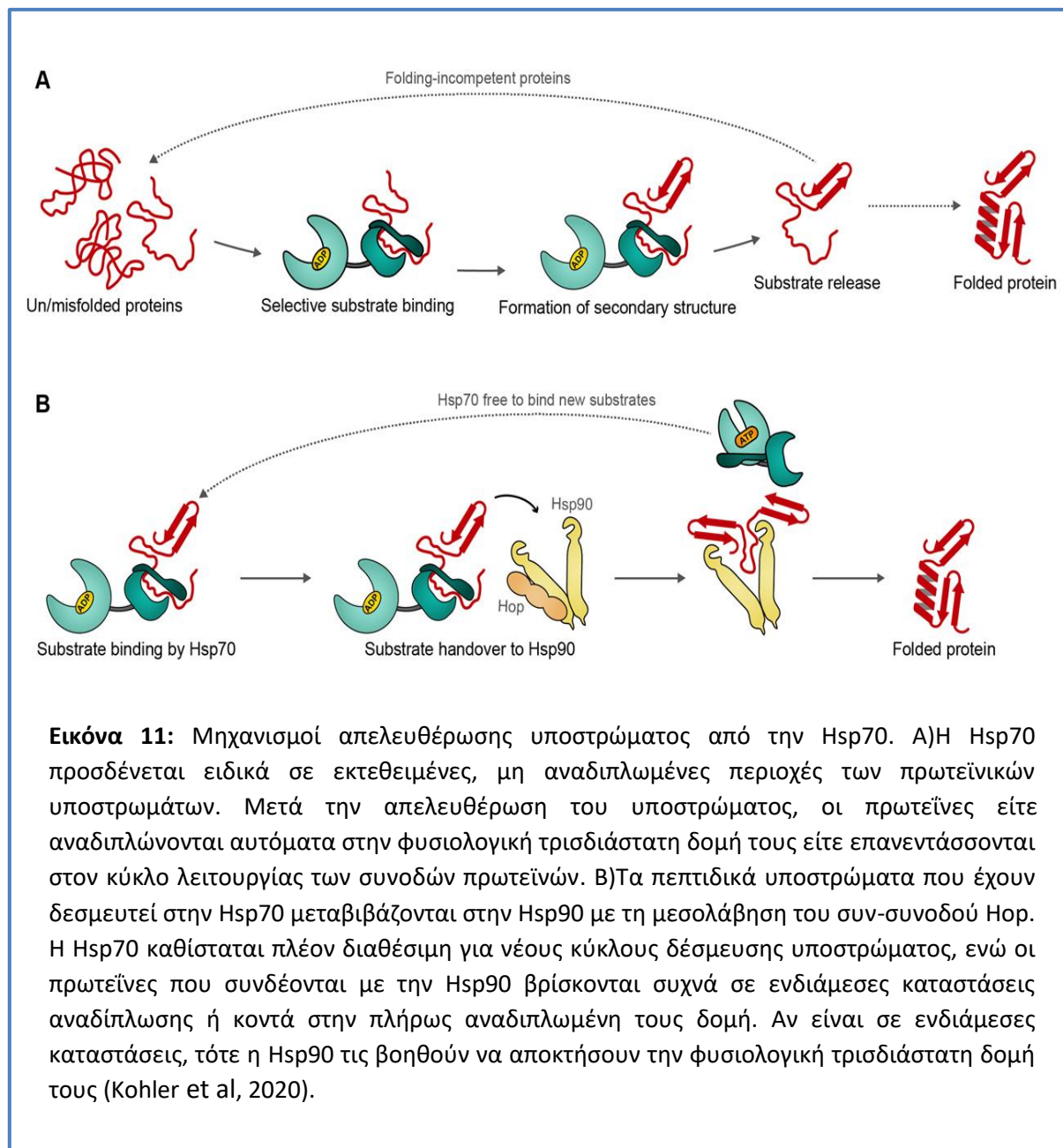
1.2.5.1 Αναδίπλωση πρωτεϊνών

Μια από τις σημαντικότερες λειτουργίες των Hsp70 είναι να διατηρούν τις πρωτεΐνες σε μη αναδιπλωμένη κατάσταση, όταν μια νεοσυντηθέμενη πεπτιδική αλυσίδα φύγει από το ριβόσωμα, όταν μια πρωτεΐνη πρέπει να μεταφερθεί κατά μήκος μιας μεμβράνης, καθώς και όταν το στρες οδηγεί σε συσσώρευση ημι-αναδιπλωμένων πρωτεϊνών δημιουργώντας συσσωματώματα. Για να επιτευχθούν αυτές οι λειτουργίες οι Hsp70, μπορούν είτε να ξεδιπλώνουν τα πεπτιδικά τους υποστρώματα, είτε απλά να συνδέονται με το πεπτίδιο ώστε να το περιορίζουν, για να μην αναδιπλωθεί λανθασμένα (Clerico et al, 2015).

Στις νεοσυντηθέμενες πρωτεΐνες που μόλις έχουν βγει από το ριβόσωμα, οι Hsp70 ενώνονται μέσω υδρόφοβων περιοχών που διαθέτουν, ώστε να μην αρχίσει η αναδίπλωση τους εφόσον δεν έχει παραχθεί όλο το πεπτίδιο και δημιουργηθούν μη φυσικές αλληλοεπιδράσεις, που μπορεί να οδηγήσουν το πεπτίδιο από την συσσωμάτωση. Όταν τελειώσει η δράση τους απελευθερώνουν το υπόστρωμα τους με τρόπο κατάλληλο για να ξεκινήσει η σωστή και αυθόρμητη αναδίπλωση ή να μπορεί να έρθει σε επαφή με άλλες πρωτεΐνες συνοδούς (Clerico et al, 2015)(Εικόνα 11).

Κατά το θερμικό στρες οι πρωτεΐνες χάνουν την τριτοταγή δομή τους, βρίσκονται σε μερικώς αναδιπλωμένη κατάσταση και δημιουργούν μη φυσικές αλληλοεπιδράσεις. Σε αυτή την περίπτωση πολλές Hsp70 ταυτόχρονα, αναγνωρίζουν υδρόφοβα μοτίβα πάνω στα πεπτίδια και συνδέονται μαζί τους προκαλώντας τοπικό ξεδίπλωμα. Αυτή η ταυτόχρονη και πολλαπλή σύνδεση δημιουργεί μια στερεοχημική άπωση, επιτρέποντας, αφενός το τοπικό ξεδίπλωμα του πεπτιδίου και αφετέρου να διακοπούν οι μακρινές αλληλοεπιδράσεις αμινοξέων. Οι Hsp70 αποσυνδέονται με μεγαλύτερη ευκολία σε περιοχές όπου η διαμόρφωση είναι σωστή και επιμένουν σε περιοχές που είναι λάθος. Μετά την απελευθέρωση το πεπτίδιο έχει την ικανότητα να αναδιπλωθεί σωστά αυθόρμητα. Έτσι δημιουργείτε ένα κύκλος δράσεων, όπου οι Hsp70 συνδέονται με τα πεπτίδια προκαλούν τοπικό ξεδίπλωμα, αυτό οδηγεί σε αυθόρμητη επαναδίπλωση, αν η νέα δομή είναι σωστή τότε οι Hsp70 φεύγουν, αν όχι τότε επανασυνδέονται μέχρις ότου να επιτευχθεί η φυσική τους μορφή (Kohler et al, 2020)(Εικόνα 11).

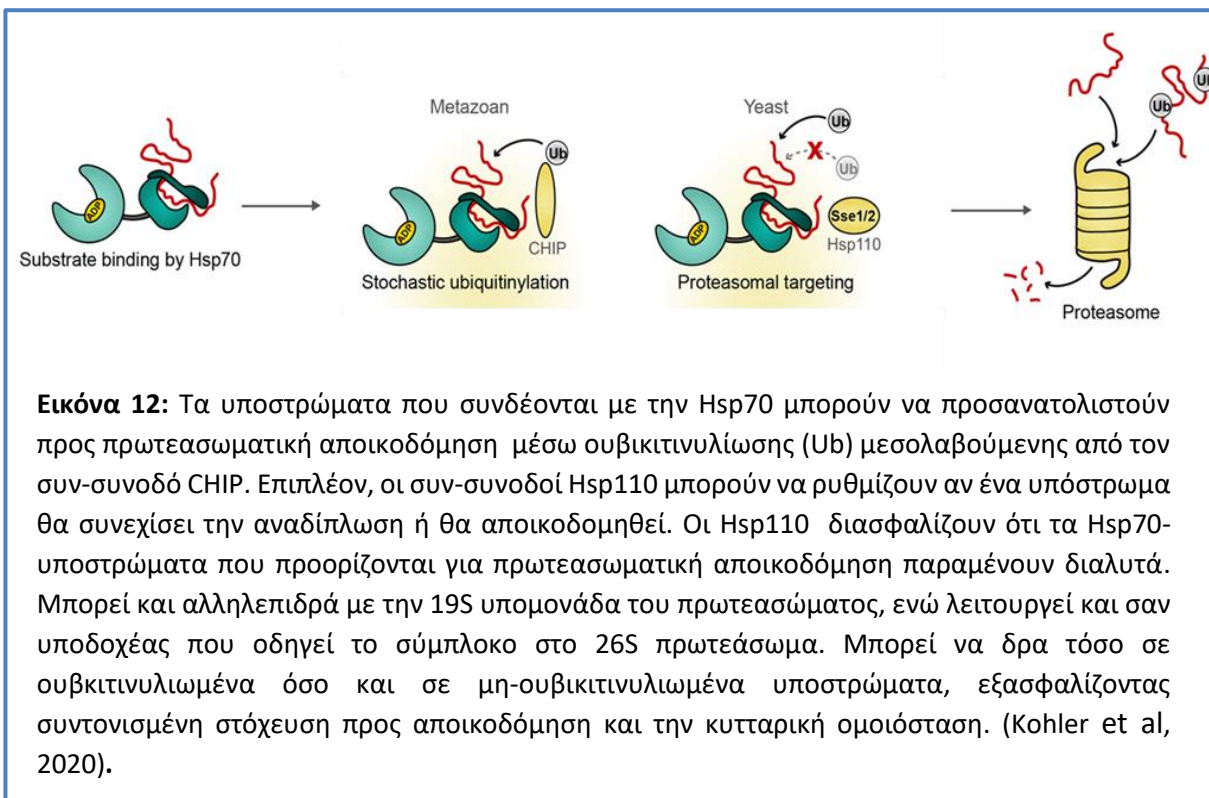
Μερικές φορές η Hsp70 δεν αρκεί από μόνη της για να πετύχει την σωστή αναδίπλωση, διότι συνδέεται μόνο στα υδρόφοβα τμήματα παγιδεύοντας τις πρωτεΐνες σε στάσιμες καταστάσεις. Για να ξεπεραστεί το εμπόδιο αυτό δρουν οι Hsp90, όπου συνδέονται σε δεύτερο χρόνο στην ημι-αναδιπλωμένη πρωτεΐνη τόσο σε υδρόφοβες όσο και σε υδρόφιλες επιφάνειες. Μέσω της αλληλοεπίδρασης αυτή βοήθα το πεπτίδιο στο να σχηματίσει τον υδρόφοβο πυρήνα του και να πάρει τελικά την σωστή αναδίπλωση (Rosenzweig et al, 2019).



1.2.5.2 Πρωτεϊνική αποικοδόμηση

Αν δεν πετύχει ούτε με την βοήθεια των Hsp90 η σωστή αναδίπλωση των υποστρωμάτων, τότε είτε επανασυνδέονται με την Hsp70 για να ξανακινήσει νέος κύκλος δέσμευσης, είτε οδηγούνται για αποικοδόμηση στο πρωτεάσωμα, με την βοήθεια της πρωτεΐνης CHIP (Rosenzweig et al, 2019). Ο συν-συνοδός CHIP είναι μια διμερή, E3 λιγάση ουβικιτίνης, που

ανταγωνίζεται την Hsp για την σύνδεση στο C-τελικό άκρο των Hsp70 και Hsp90 μέσω του μοτίβου TPR που διαθέτουν (Clerico et al, 2015). Ουβικιτινώνουν τα πεπτιδικά υποστρώματα με βάση προτεραιότητας, αυτών που βρίσκονται συνδεδεμένα για μεγάλα χρονικά διαστήματα στις Hsp70, τα οποία προφανώς δεν μπορούν να πάρουν σωστή διαμόρφωση και να μεταφερθούν στις Hsp90 (Rosenzweig et al, 2019)(Εικόνα 12).



1.2.5.3 Διάσπαση συσσωματωμάτων

Οι Hsp70 εκτός από την αναδίπλωση πρωτεϊνών, μπορούν με βάση τον μηχανισμό τους να συμμετάσχουν και στην από- συσσωμάτωσή τους. Μπορούν και συνδέονται επιφανειακά με το συσσωμάτωμα σε περιοχές υπάρχουν τα τυπικά μοτίβα πρόσδεσης, που φυσιολογικά τα χρησιμοποιούν για να αλληλοεπιδρούν με συν-συνοδούς πρωτεΐνες. Για να ξεκολλήσει το πεπτιδικό υπόστρωμα, οι Hsp70 μέσω της υδρόλυσης του ATP κλείνουν την υπομονάδα SBDα, το καπάκι, προκαλώντας τοπικό ξεδίπλωμα. Στην συνέχεια το πεπτίδιο θα τραβηχτεί μακριά από το συσσωμάτωμα και έτσι θα αποκοπεί. Εάν ένα πεπτίδιο δεν μπορεί να απελευθερωθεί με την βοήθεια μιας Hsp70, τότε μπορούν να δράσουν συνεργατικά περισσότερες. Στα ευκαρυωτικά κύτταρα συν-συνοδός σε αυτή την διαδικασία είναι η πρωτεΐνη Hsp110, η οποία ενεργοποιεί μηχανισμούς υδρόλυσης ATP, μέσω της δράσης της ως πρωτεΐνη ανταλλαγής νουκλεοτιδίων.

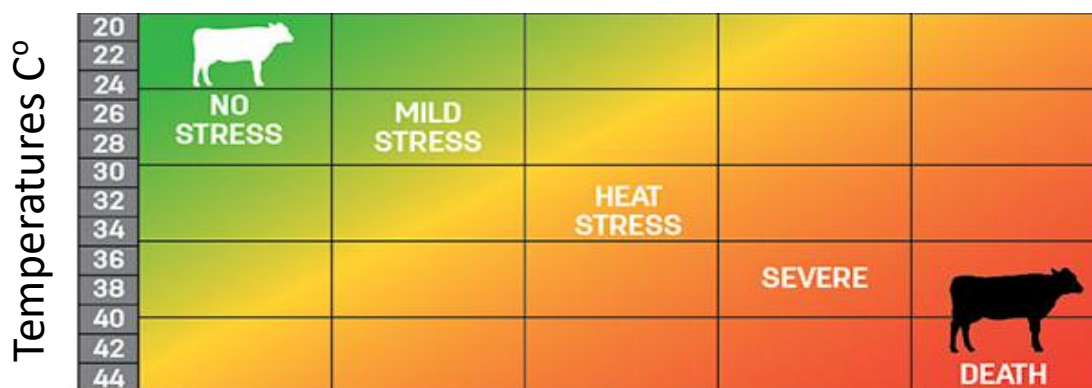
Η λειτουργία αυτού του μηχανισμού δεν περιορίζεται μόνο στην αντιμετώπιση της πρωτεϊνικής συσσωμάτωσης που προκαλείται από έντονο στρες, αλλά επεμβαίνει επίσης στη συνεχή λανθασμένη αναδίπλωση πρωτεϊνών ή στη δημιουργία συσσωματωμάτων που εμφανίζονται όταν οι μηχανισμοί ποιοτικού ελέγχου των πρωτεϊνών εξασθενούν ή καταρρέουν με την πάροδο της ηλικίας και την εμφάνιση ασθενειών (Rosenzweig et al, 2019).

1.2.5.4 Μετατόπιση πρωτεϊνών

Οι Hsp70 μπορούν να συμμετάσχουν και στην διαμερισματοποίηση των πρωτεϊνών. Οι νεοσυντιθέμενες πρωτεΐνες που έχουν ως κέντρα δράσης τους το ενδοπλασματικό δίκτυο, τα μιτοχόνδρια και τους χλωροπλάστες χρησιμοποιούν ειδικά μεταφορικά συστήματα ώστε να περάσουν τις μεμβράνες των οργανιδίων για να ασκήσουν την δράση τους. Οι Hsp70 δεσμεύονται σε κυτταροπλασματικά πρόδρομα πεπτίδια ώστε να μπορέσουν να μείνουν σε μη αναδιπλωμένη κατάσταση ως ότου συλληφθούν από τα συστήματα αυτά, που με την σειρά τους θα τα οδηγήσουν στα ειδικά κανάλια μεταφορείς που βρίσκονται στις μεμβράνες των οργανιδίων. Στο ενδοπλασματικό δίκτυο, και μόνο, όταν περάσουν από την εσωτερική πλευρά θα έρθουν πάλι σε επαφή με ένα δεύτερο κύμα ειδικών Hsp70, που βοηθούν την πρωτεΐνη να χάσει περαιτέρω το ξεδίπλωμά της ώστε να περάσει με ευκολία στο εσωτερικό (Rosenzweig et al, 2019).

1.3 Επίδραση οικολογικών παραγόντων σε γαλακτοπαραγωγικά ζώα

Το θερμικό στρες (HS) επηρεάζει σε σημαντικό βαθμό την παραγωγική ικανότητα των γαλακτοπαραγωγών ζώων, προκαλώντας επιπτώσεις τόσο στην υγεία όσο και στις βιολογικές τους λειτουργίες. Κατά τη διάρκεια περιόδων υψηλών θερμοκρασιών, οι γαλακτοπαραγωγικές αγελάδες εμφανίζουν μείωση στην πρόσληψη τροφής, στην παραγωγή γάλακτος και στην αναπαραγωγική τους απόδοση, ενώ παράλληλα παρατηρείται αύξηση του κινδύνου εμφάνισης παθογόνων ασθενειών και θνησιμότητας (Εικόνα 13). Η μείωση της γαλακτοπαραγωγής κυμαίνεται μεταξύ 0 και 35%, με τη μέση απώλεια να εκτιμάται στο 17,9% (Chen et al, 2025). Σχετικά με τις κυτταρικές βλάβες που προκύπτουν από το θερμικό στρες, στις αγελάδες διαπιστώθηκε πως οδηγεί σε μειωμένη δραστηριότητα των μαστικών επιθηλιακών κυττάρων και άρα μειωμένη παραγωγή της πρωτεΐνης γάλακτος. Ακόμα



Εικόνα 13: Οι γαλακτοπαραγωγικές αγελάδες, και ιδιαίτερα εκείνες που προέρχονται από εύκρατα ή ήπια κλίματα, επηρεάζονται σημαντικά από μεταβολές στη θερμοκρασία του περιβάλλοντός τους. Σε θερμοκρασίες 30–34 °C, αρχίζουν να ενεργοποιούνται οι μηχανισμοί απόκρισης στο θερμικό στρες, με αποκορύφωση στους 40 °C. Σε υψηλότερες θερμοκρασίες, οι μηχανισμοί αυτοί δεν επαρκούν για να αντισταθμίσουν τις βιολογικές βλάβες, οδηγώντας τις αγελάδες σε σοβαρές επιπτώσεις και πιθανόν σε θάνατο (Silvio et al, 2017).

επηρεάζει αρνητικά τη λειτουργία, αλλά και την γονιδιακή έκφραση της A-S1 καζεΐνης (Yue et al, 2020). Για να καταπολεμηθούν οι πρωτεϊνικές βλάβες του θερμικού στρες, τα κύτταρα αρχίζουν την υπερέκφραση των πρωτεϊνών Hsp. Μεταξύ της οικογένειας Hsp, οι πρωτεΐνες που αποκρίνονται γρηγορότερα στις περιβαλλοντικές αλλαγές είναι οι Hsp70. Η έκφραση των Hsp70 σε γαλακτοπαραγωγικά ζώα που υπέστησαν θερμικό στρες αποδείχθηκε πως είναι πιο ευαίσθητη συγκριτικά με άλλες οικογένειες Hsp και, άρα, μπορεί να αποτελέσει έναν ωφέλιμο και αποτελεσματικό βιοδείκτη για τον προσδιορισμό και την ποσοτικοποίηση του θερμικού στρες στα ζώα (Hariyono et al, 2022).

Σε χώρες που επικρατούν τροπικές κλιματικές συνθήκες, με υψηλές θερμοκρασίες το HS αποτελεί παράγοντα που μπορεί να απειλήσει την ευζωία των ζώων. Υπό αυτές τις συνθήκες, η επάρκεια αποθεμάτων γάλακτος αντιμετωπίζει μια ουσιαστική πρόκληση, δεδομένου ότι τα ζώα που έχουν επιλεγεί διαχρονικά, μέσω γενετικής βελτίωσης για υψηλή απόδοση σε γάλα, προέρχονται κυρίως από ευρωπαϊκές φυλές, με χαρακτηριστικό παράδειγμα τις αγελάδες Holstein. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα οι αγελάδες Holstein, οι οποίες έχουν εξελιχθεί σε εύκρατα περιβάλλοντα, παρουσιάζουν μειωμένη αποδοτικότητα όταν εκτίθενται σε περιοχές με ιδιαίτερα υψηλές θερμοκρασίες (Oliveira et al, 2025).

2. Σκοπός

Τα αποτελέσματα της κλιματικής αλλαγής έχουν ήδη γίνει αντιληπτά, με συνέπειες που κυμαίνονται από την άνοδο της μέσης θερμοκρασίας έως την αύξηση της θαλάσσιας στάθμης. Οι εξελίξεις αυτές αναμένεται να επιφέρουν σημαντικές επιπτώσεις στην ισορροπία των οικοσυστημάτων, στην επάρκεια τροφικών πόρων, στην κτηνοτροφία, στη βιομηχανική παραγωγή, αλλά και στις αγροτικές καλλιέργειες. Σημαντικές είναι οι επιπτώσεις και στα ζώα παραγωγής προϊόντων, όπου οι υψηλές θερμοκρασίες επηρεάζουν την απόδοσή τους, όπως για παράδειγμα στις γαλακτοπαραγωγικές αγελάδες. Σε υποκυτταρικό επίπεδο, η αύξηση της θερμοκρασίας επηρεάζει ουσιαστικά την πρωτεϊνική δομή και ομοιόσταση των κυττάρων, και κατ' επέκταση την επιβίωσή τους. Για να την αποκαταστήσουν, τα κύτταρα αρχίζουν να υπερεκφράζουν γονίδια που παράγουν τις πρωτεΐνες θερμικού στρες (Hsp), οι οποίες συμβάλλουν στην επαναφορά των πρωτεϊνών στην αρχική τους δομή. Ιδιαίτερα στα γαλακτοπαραγωγικά ζώα, τα γονίδια που υπερεκφράζονται σε καταστάσεις θερμικού στρες ανήκουν κυρίως στην οικογένεια των Hsp70. Οι Hsp70, ωστόσο, εκφράζονται σε πληθώρα ζώων που ζουν σε ενδιαίτηματα με εύρος θερμοκρασιών, από πολύ ψυχρά έως ιδιαίτερα θερμά. Σκοπός της παρούσας πτυχιακής εργασίας είναι η συγκριτική ανάλυση των γονιδίων της οικογένειας Hsp70 σε ζώα που κατοικούν και αναπτύσσονται σε οικοσυστήματα με διαφορετικές θερμοκρασιακές συνθήκες. Μέσω της ανάλυσης αυτής επιδιώκεται να διερευνηθεί εάν και σε ποιο βαθμό, οι θερμοκρασιακές διαφοροποιήσεις έχουν ασκήσει εξελικτικές πιέσεις στη γονιδιακή τους δομή, συμβάλλοντας ενδεχομένως στη διαμόρφωση μηχανισμών προσαρμογής

3. Υλικά και Μέθοδοι

3.1 Αναζήτηση γονιδίων και ανάκτηση αλληλουχιών

Πραγματοποιήθηκε βιβλιογραφική αναζήτηση σε επιστημονικά άρθρα σχετικά με το ποια οικογένεια πρωτεϊνών Hsp συνδέεται άμεσα με τα γαλακτοπαραγωγικά ζώα, και συγκεκριμένα τις αγελάδες, όταν βρίσκονται σε καταστάσεις θερμικού στρες. Αποδείχθηκε ότι η έκφραση των Hsp70 είναι πιο έντονη σε σύγκριση με άλλες πρωτεΐνες-συνοδούς HSP και, επομένως, το προφίλ έκφρασής τους θα μπορούσε να αποτελέσει χρήσιμο βιοδείκτη για τον προσδιορισμό της επίδρασης του θερμικού στρες στα ζώα (Harigono et al, 2022). Στη συνέχεια, εκπονήθηκε έρευνα στη βάση δεδομένων NCBI (Release 268.0) και συγκεκριμένα στο γονιδίωμα του *Bos taurus* (ARS-UCD2.0 GCF_002263795.3), ώστε να αναγνωριστούν ονομαστικά τα γονίδια της οικογένειας Hsp70 που υπάρχουν στα γαλακτοπαραγωγικά ζώα. Σε συνδυασμό με περαιτέρω βιβλιογραφική έρευνα (Ajayi et al, 2018), τα γονίδια στα οποία καταλήξαμε ήταν: *HSPA1A*, *HSPA1L*, *HSPA2*, *HSPA4*, *HSPA4L*, *HSPA5*, *HSPA6*, *HSPA8*, *HSPA9*, *HSPA12A*, *HSPA12B*, *HSPA13* και *HSPA14*.

Έπειτα, χρησιμοποιήθηκε η βάση δεδομένων Ensembl (Release 115) προκειμένου να συλλεχθούν τα ζώα-ταχα με τα οποία θα πραγματοποιηθεί η γονιδιωματική ανάλυση. Στόχος ήταν να εντοπιστούν ζώα που είναι πλακουντοφόρα θηλαστικά μεγάλου μεγέθους και τα οποία διαμένουν σε ενδιαιτήματα όπου επικρατούν ακραίες θερμοκρασίες. Χρησιμοποιώντας το ανθρώπινο γονιδίωμα ως γονιδίωμα επερώτησης, εντοπίστηκαν για κάθε ένα από τα παραπάνω γονίδια, τα ορθόλογα τους σε οργανισμούς της κατηγορίας «Placental Mammals». Με βάση τα παραπάνω κριτήρια δημιουργήθηκε μια λίστα 29 ζώων, τα περισσότερα εκ των οποίων διαθέτουν και τα 13 γονίδια της οικογένειας Hsp70 (Πίνακας 1).

Κοινή Ονομασία	Επιστημονική Ονομασία
Κόκκινη Αλεπού	<i>Vulpes vulpes</i>
Ντίνγκο	<i>Canis lupus dingo</i>
Γιγάντιο Πάντα	<i>Ailuropoda melanoleuca</i>
Πολική Αρκούδα	<i>Ursus maritimus</i>
Αμερικανική Μαύρη Αρκούδα	<i>Ursus americanus</i>
Λιοντάρι	<i>Panthera leo</i>
Λεοπάρδαλη	<i>Panthera pardus</i>
Φυσητήρας	<i>Physeter catodon</i>
Πυγμαία Φώκια	<i>Phocoena sinus</i>
Φάλαινα Μονόκερος	<i>Monodon monoceros</i>
Φάλαινα Μπελούγκα	<i>Delphinapterus leucas</i>
Δελφίνι	<i>Delphinus delphis</i>
Γαλάζια Φάλαινα	<i>Balaenoptera musculus</i>
Κόκκινο Ελάφι	<i>Cervus elaphus yarkandensis</i>
Μόσχος	<i>Moschus moschiferus</i>
Νεροβούβαλος	<i>Bubalus bubalis</i>

Ζέβου	Bos indicus
Αγελάδα	Bos taurus
Άγριο Γιάκ	Bos mutus
Βίσονας	Bison bison
Αραβική Καμήλα	Camelus dromedarius
Άλπακα	Vicugna pacos
Τίγρη	Panthera tigris
Μαρμότα	Marmota marmota
Αφρικανικός Ελέφαντας	Loxodonta africana
Σκίουρος-πίθηκος Βολιβίας	Saimiri boliviensis
Πίθηκος με ασπρόμαυρη μύτη	Rhinopithecus bieti
Άνθρωπος	Homo sapiens
Μπονόμπο	Pan paniscus

Πίνακας 1: Είδη ζώων που χρησιμοποιήθηκαν στη συγκριτική ανάλυση των γονιδίων της οικογένειας Hsp70.

Όλα τα γονίδια των οικογενειών Hsp έχουν βαθιά συντηρημένες πρωτεϊνικές αλληλουχίες, λόγω του ότι σχετίζονται με ζωτικές κυτταρικές λειτουργίες. Επομένως, η ανάκτηση πρωτεϊνικών αλληλουχιών δεν θα μας παρείχε κάποιο αξιόλογο συμπέρασμα· γι' αυτό χρησιμοποιήθηκαν οι cDNA αλληλουχίες.

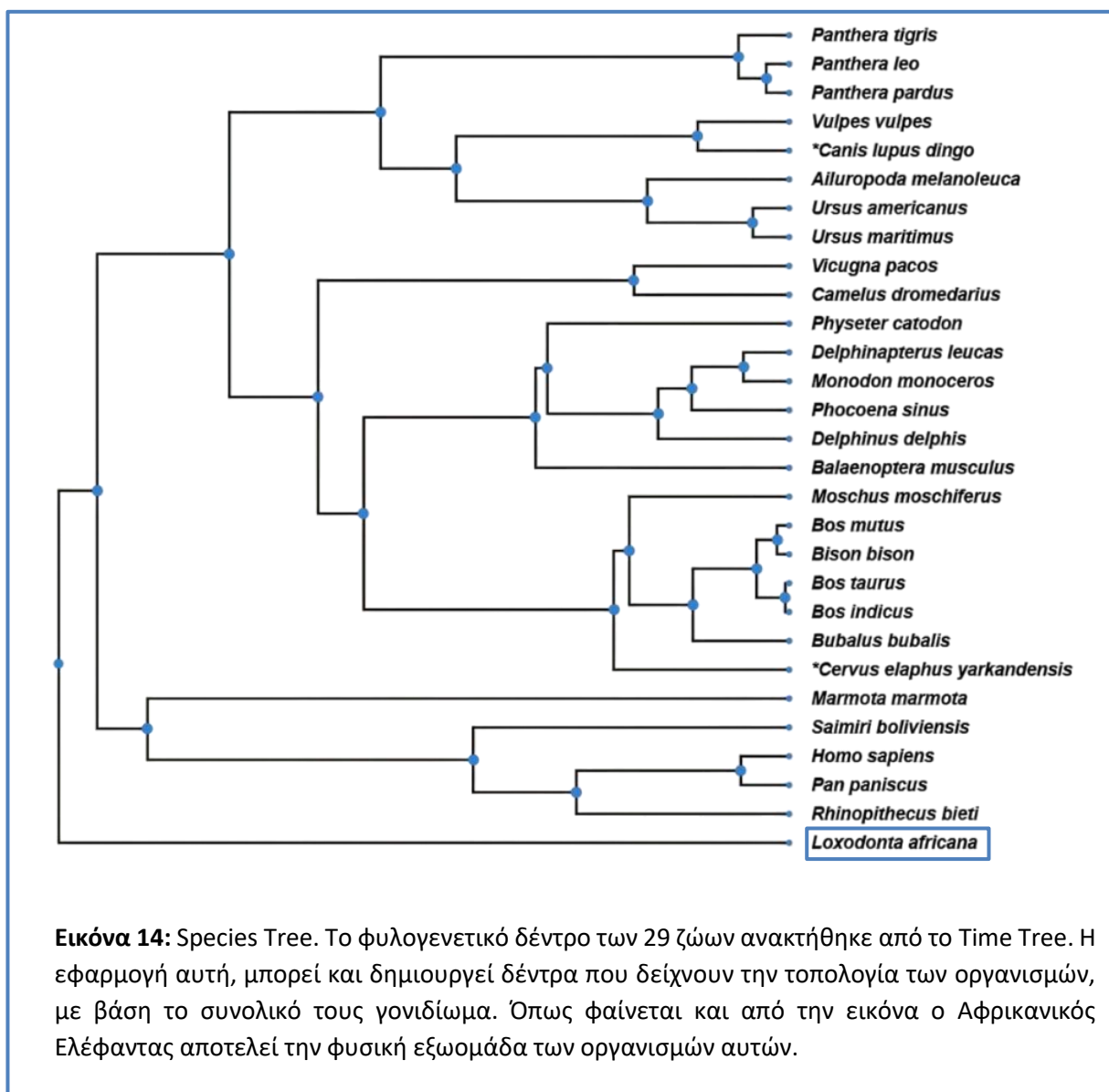
Ακολούθως, έπρεπε να συλλεχθούν οι αλληλουχίες των γονιδίων για κάθε ένα από τα ζώα. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε η βάση δεδομένων g:Profiler (version: e113_eg59_p19_f6a03c19) στην επιλογή g:Orth, η οποία παρέχει τους κωδικούς των γονιδίων που αντιστοιχούν στην Ensembl. Με οργανισμό αναφοράς τον Bos taurus, έγινε αναζήτηση και για τα υπόλοιπα ζώα. Σε ορισμένες περιπτώσεις, οι κωδικοί ήταν περισσότεροι από έναν, γεγονός που υποδηλώνει την ύπαρξη πολλαπλών παράλογων στον ίδιο οργανισμό, ενώ σε άλλες περιπτώσεις δεν υπήρχαν καθόλου στη βάση δεδομένων, εμφανίζοντας την ένδειξη N/A.

Στις περιπτώσεις όπου δεν υπήρχε η αλληλουχία στην Ensembl, χρησιμοποιήθηκε ο αλγόριθμος Nucleotide BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), που βρίσκεται ενσωματωμένος στην βάση δεδομένων NCBI, Transcripts (GCF_048564905.1-RS_2025_04). Ως αλληλουχίες επερώτησης χρησιμοποιήθηκαν cDNA αλληλουχίες για κάθε γονίδιο, σε αντιστοιχία με το ομόλογό του στο ανθρώπινο γονιδίωμα. Οι αλληλουχίες αυτές του ανθρώπινου γονιδιώματος, συλλέχθηκαν από τη βάση δεδομένων Ensembl, ενώ οι αντίστοιχοι κωδικοί τους προήλθαν από τη βάση δεδομένων GeneCards. Έτσι εντοπίστηκαν ομόλογες νουκλεοτιδικές αλληλουχίες, με βάση την ομοιότητα τους με την αλληλουχία επερώτησης, για τα γονίδια που δεν βρέθηκαν προηγουμένως, για κάθε οργανισμό.

Οι αλληλουχίες των γονιδίων Hsp, σε όλες τις οικογένειες, χαρακτηρίζονται από υψηλή συντήρηση και σημαντικές ομοιότητες μεταξύ τους. Για τον λόγο αυτό, οι αλληλουχίες που συλλέχθηκαν συνολικά, είτε από τη βάση δεδομένων Ensembl είτε μέσω BLAST στο NCBI, έπρεπε να επιβεβαιωθούν ως προς την αντιστοιχία τους με τα γονίδια ενδιαφέροντος. Για το σκοπό αυτό, εφαρμόστηκε η μέθοδος «Ανάστροφου BLAST» (Reverse BLAST). Ως αλληλουχίες επερώτησης χρησιμοποιήθηκαν εκείνες που είχαν συγκεντρωθεί προηγουμένως, έναντι του ανθρώπινου γονιδιώματος στη βάση δεδομένων RefSeq NCBI. Με

βάση τα ποσοστά ομοιότητας, επιβεβαιώθηκε ότι οι επιλεγμένες αλληλουχίες αντιστοιχούν όντως σε κάθε γονίδιο ενδιαφέροντος.

Στη βιοπληροφορική ανάλυση, είναι απαραίτητη η χρήση μιας εξωομάδας. Πρόκειται για έναν στενά συγγενικό, αλλά διακριτό οργανισμό, που λειτουργεί ως σημείο αναφοράς για την ενδοομάδα, διευκολύνοντας την ανάδειξη των εξελικτικών σχέσεων και στον εντοπισμό προγονικών χαρακτηριστικών. Ο πιο εξελικτικά απομακρυσμένος πρόγονος των πλακουντοφόρων θηλαστικών που συμπεριλήφθηκε στην ανάλυση, και χρησιμοποιήθηκε ως εξωομάδα, ήταν ο ελέφαντας (*Loxodonta africana*). Αυτό επιβεβαιώνεται και από από τα Species Tree (Δέντρο των ειδών) που ανακτήθηκε από την βάση δεδομένων Time Tree (Εικόνα 14). Species Tree δημιουργήθηκε και με την χρήση μιτοχονδριακών αλληλουχιών από κάθε ζώο, που συγκεντρώθηκαν από την βάση δεδομένων NCBI.



3.2 Στοιχίση αλληλουχιών

Για να πραγματοποιηθεί η στοιχίση των αλληλουχιών έγινε χρήση του αλγορίθμου MAFFT (Katoh et al, 2019), που έχει την δυνατότητα να κάνει πολλαπλή στοιχίση αλληλουχιών. Στην συνέχεια για κάθε ένα γονίδιο, οι στοιχίσεις επεξεργάστηκαν χειροκίνητα μέσω του προγράμματος AliView (Larsson et al, 2014), όπου έγινε χειροκίνητη αφαίρεση των κενών ή/και ασαφών τμημάτων που μπορεί να δημιουργήθηκαν μετά την στοιχίση τους (trimming). Έτσι τελικά προκύπτουν αλληλουχίες ίδιο μεγέθους για κάθε ζώο, οι οποίες διαθέτουν την γενετική πληροφορία για να μπορέσει να γίνει η κατασκευή των φυλογενετικών δέντρων. Για τις μιτοχονδιακές αλληλουχίες, η στοιχίση τους έγινε και αυτή με τον αλγόριθμο MAFFT. Λόγω, όμως του τεράστιου μεγέθους τους, το trimming δεν έγινε χειροκίνητα αλλά με την βοήθεια του προγράμματος Phylogeny Gblocks (version 0.91b).

3.3 Φυλογενετική ανάλυση

Με σκοπό τον προσδιορισμό των εξελικτικών σχέσεων που έχουν μεταξύ τους τα γονίδια των διαφορετικών ζώων, πραγματοποιήθηκε φυλογενετική ανάλυση. Χρησιμοποιήθηκε το MEGA12 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 12) για τον σχηματισμό των φυλογενετικών δέντρων με προκαθορισμένη ρίζα την εξωμάδα του Ελέφαντα.

Για την δημιουργία των φυλογενετικών δέντρων έγινε χρήση της μεθόδου Μέγιστης Πιθανοφάνειας (Maximum Likelihood). Η συγκεκριμένη μέθοδος λαμβάνει υπόψη όλες τις πιθανές θέσεις μιας πολλαπλής στοιχίσης αλληλουχιών, υπολογίζοντας την πιθανότητα για κάθε ένα πιθανό εξελικτικό μονοπάτι, με σκοπό να προσεγγίσει όσο είναι εφικτό καλύτερα την πραγματικότητα. Η διαδικασία ξεκινά με την επιλογή ενός μοντέλου υποκατάστασης, δηλαδή ενός μαθηματικού μοντέλου που περιγράφει με ποιες πιθανότητες ένα γράμμα DNA (A, G, C, T) να αλλάζει σε κάποιο άλλο, κατά την πάροδο του χρόνου. Στη συνέχεια εξετάζεται η τοπολογία του δέντρου (δηλαδή ποια είδη σχετίζονται πιο στενά και ποια αποσπάρθηκαν νωρίτερα) και τα μήκη των κλάδων, που εκφράζουν το πλήθος ή τον ρυθμό των μεταλλάξεων και άρα και την εξελικτική πορεία. Τα κλαδιά των δέντρων αξιολογήθηκαν από στατιστικής πλευράς με την μέθοδο Bootstrap. Στην πράξη, η μέθοδος bootstrap εφαρμόζεται πάνω στο αρχικό alignment των ακολουθιών, από το οποίο δημιουργούνται πολλαπλά νέα σύνολα δεδομένων μέσω τυχαίας επαναδειγματοληψίας με αντικατάσταση. Από κάθε νέο σύνολο προκύπτει μια νέα στοιχίση, με την οποία υπολογίζεται ένα φυλογενετικό δέντρο. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται, για παράδειγμα, εκατό φορές και στη συνέχεια καταγράφεται η συχνότητα με την οποία εμφανίζεται κάθε κλάδος σε όλα τα δέντρα. Στο τελικό δέντρο, πάνω από κάθε κόμβο αναγράφεται η τιμή bootstrap support, δηλαδή το ποσοστό των επαναλήψεων στις οποίες εμφανίστηκε ο συγκεκριμένος κόμβος (π.χ. 70%, 90%, 100%). Όσο υψηλότερη είναι η τιμή, τόσο μεγαλύτερη είναι η στατιστική υποστήριξη και η αξιοπιστία του συγκεκριμένου διαχωρισμού των ειδών. Σε φυλογενετικά δέντρα που οι κλάδοι με bootstrap είναι κάτω από 50, ιδίως σε αρχικούς κόμβους, θεωρούνται μη αξιόπιστα.

3.4 Δοκιμασία φυσικής επιλογής

Οι πρωτεΐνες συνοδοί Hsp70, λόγω των πολλών και σημαντικών λειτουργιών που επιτελούν στα κύτταρα, διαθέτουν εξαιρετικά συντηρημένη δομή. Τόσο οι αμινοξικές όσο και οι

νουκλεοτιδικές τους αλληλουχίες διατηρούνται σε πολύ μεγάλο βαθμό όμοιες σε πλήθος ζώων. Οι μεταλλάξεις που παρατηρούνται είναι ελάχιστες και πολύ συγκεκριμένες. Με βάση αυτά τα δεδομένα, κρίνεται σκόπιμο να μελετηθεί κατά πόσο τα γονίδια αυτά υπόκεινται σε φυσική επιλογή. Για να πραγματοποιηθεί αυτό, χρησιμοποιήθηκε η βάση δεδομένων Datamonkey (version 2.0, 2018) και συγκεκριμένα ο αλγόριθμος FEL.

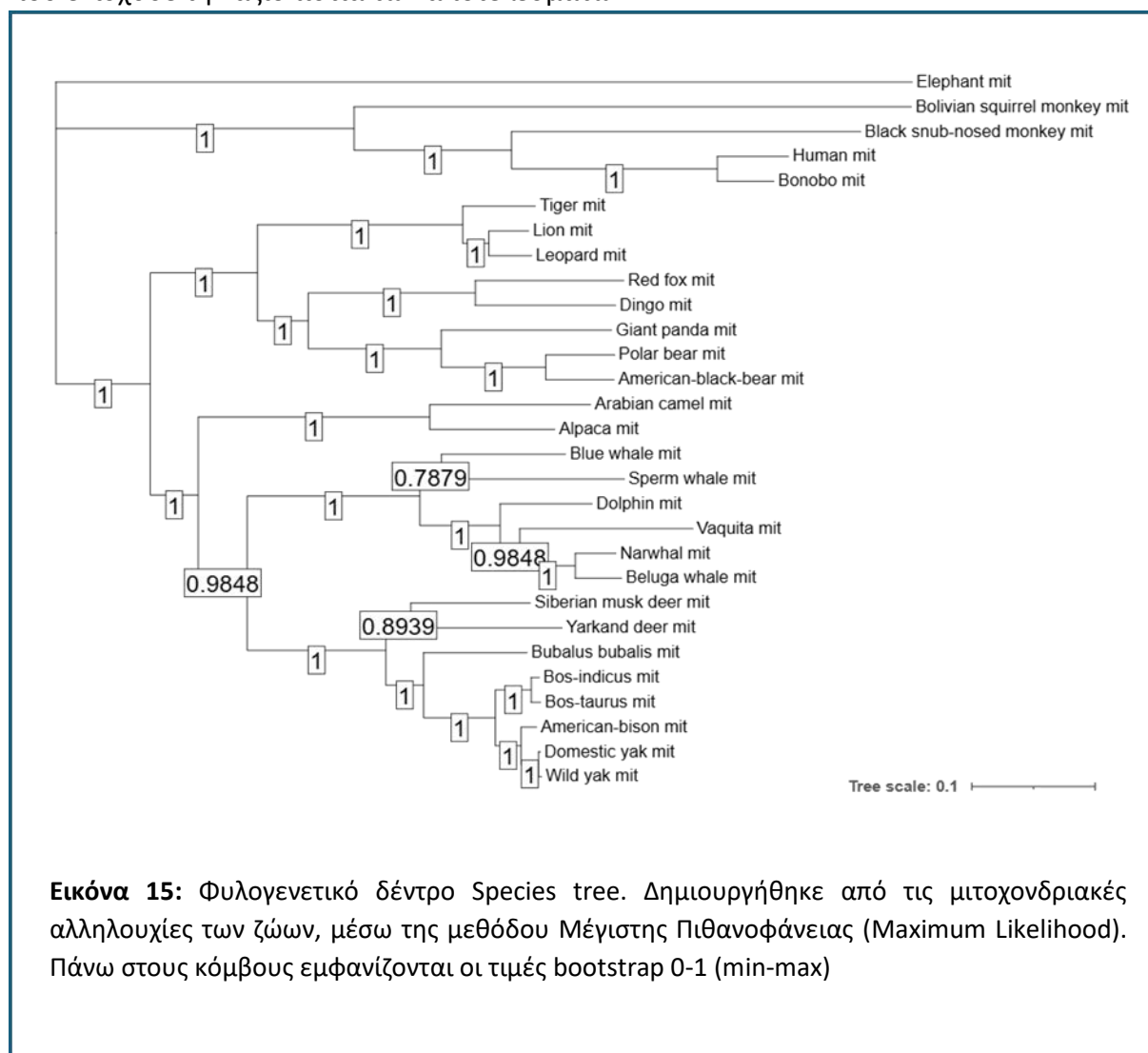
Το FEL (Fixed Effects Likelihood) είναι μια μέθοδος υπολογιστικής μοριακής εξέλιξης που χρησιμοποιείται για την εκτίμηση των μη-συνώνυμων (dN) και συνώνυμων (dS) ρυθμών αντικατάστασης σε επίπεδο μεμονωμένων θέσεων (sites) σε μια κωδική αλληλουχία DNA, λαμβάνοντας υπόψη ένα δεδομένο φυλογενετικό δέντρο. Η προσέγγιση αυτή βασίζεται στη μέγιστη πιθανοφάνεια (maximum likelihood) και θεωρεί ότι η επιλεκτική πίεση σε κάθε θέση παραμένει σταθερή σε όλο το δέντρο, δηλαδή σε όλα τα εξελικτικά κλαδιά. Το FEL χρησιμοποιείται κυρίως για την ανίχνευση θέσεων που βρίσκονται υπό θετική επιλογή ($dN/dS > 1$), αρνητική επιλογή ή ουδέτερη εξέλιξη. Η μέθοδος αυτή είναι ιδιαίτερα χρήσιμη σε συγκριτικές μελέτες γονιδίων μεταξύ διαφορετικών ειδών ή πληθυσμών, όπου ενδιαφέρει η κατανόηση των εξελικτικών πιέσεων που δρουν σε συγκεκριμένα νουκλεοτίδια. Δεν είναι αναγκαίο να χωριστούν τα είδη ή τα κλαδιά του φυλογενετικού δέντρου σε ομάδες (π.χ. ζώα που ζούν σε κρύο/ ζώα που ζούν σε ζεστό κλίμα) ή περιβαλλοντικές συνθήκες για να εκτιμήσει την επιλογή. Η μέθοδος υπολογίζει την επιλεκτική πίεση για κάθε θέση γενικά σε όλα τα κλαδιά του δέντρου (Pond et al, 2005).

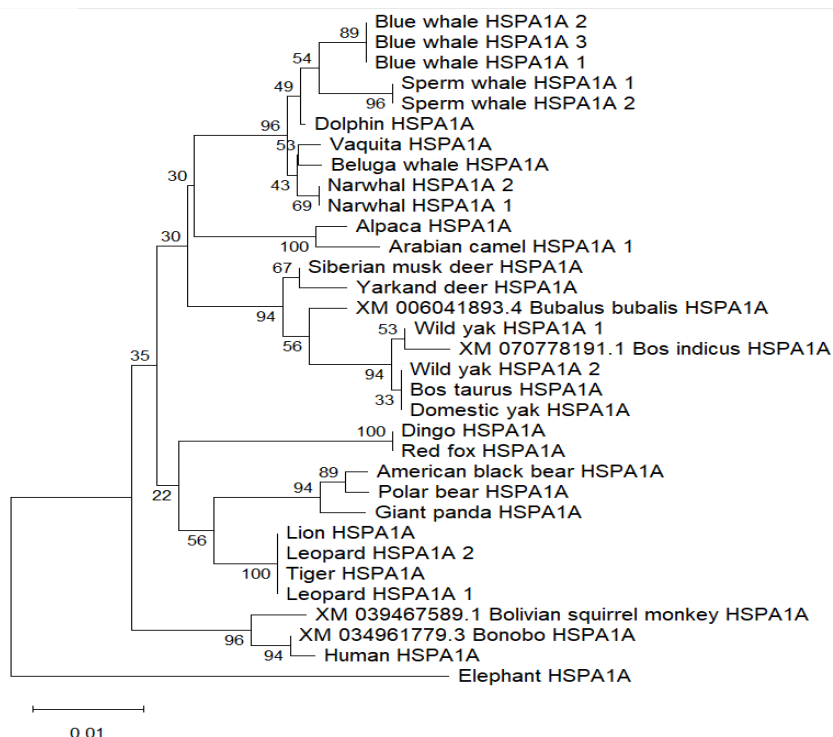
Οι αλληλουχίες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι ίδιες cDNA, από τις οποίες παράχθηκαν και τα φυλογενετικά δέντρα, μετά από τροποποίηση που έγινε στα άκρα τους με το πρόγραμμα AliView. Για την εκτίμηση της στατιστικής σημαντικότητας εφαρμόστηκε κατώφλι $p\text{-value} = 0.05$, το οποίο αποτελεί ευρέως αποδεκτό όριο. Η επιλογή αυτού του κατωφλίου έγινε με στόχο τη διατήρηση της αξιοπιστίας των αποτελεσμάτων και τον περιορισμό του κινδύνου εμφάνισης ψευδώς θετικών ενδείξεων φυσικής επιλογής.

4. Αποτελέσματα

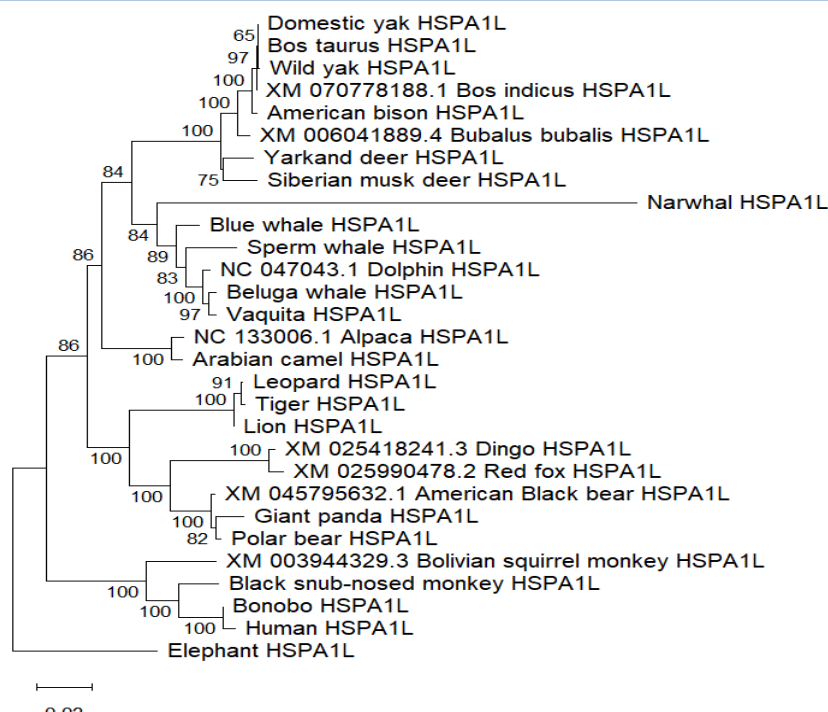
4.1 Φυλογενετική ανάλυση

Μετά την συλλογή των αλληλουχιών από τις βάσεις δεδομένων Ensembl και NCBI, και αφού ταυτοποιήθηκε η εγκυρότητα τους με την μέθοδο του «Ανάστροφου BLAST» και επεξεργάστηκαν καταλλήλως, χρησιμοποιήθηκαν για την δημιουργία φυλογενετικών δέντρων. Δημιουργήθηκαν στον σύνολο δεκαεπτά φυλογενετικά δέντρα, εκ των οποίων τα δεκατρία αντιστοιχούν σε κάθε ένα από τα δεκατρία γονίδια της οικογένειας Hsp70, το ένα είναι το Species Tree που δημιουργήθηκε από μιτοχονδριακά γονιδιώματα των οργανισμών και τα τέσσερα υπόλοιπα φυλογενετικά δέντρα που αποτελούνται το κάθε ένα, από αλληλουχίες δύο γονιδίων που είναι και αυτά μέλη της οικογένειας Hsp70, αλλά ταυτοχρόνως και παράλογα μεταξύ τους. Για την ανάπτυξη του φυλογενετικού δέντρου εφαρμόστηκε η μέθοδος Maximum Likelihood σε συνδυασμό με τη διαδικασία bootstrap (100 επαναλήψεων). Η συγκεκριμένη μέθοδος προτιμήθηκε έναντι άλλων, καθώς παρείχε υψηλότερες τιμές bootstrap σε σχέση με άλλες στα υπόλοιπα παραγόμενα δέντρα, γεγονός που ενίσχυσε την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων.

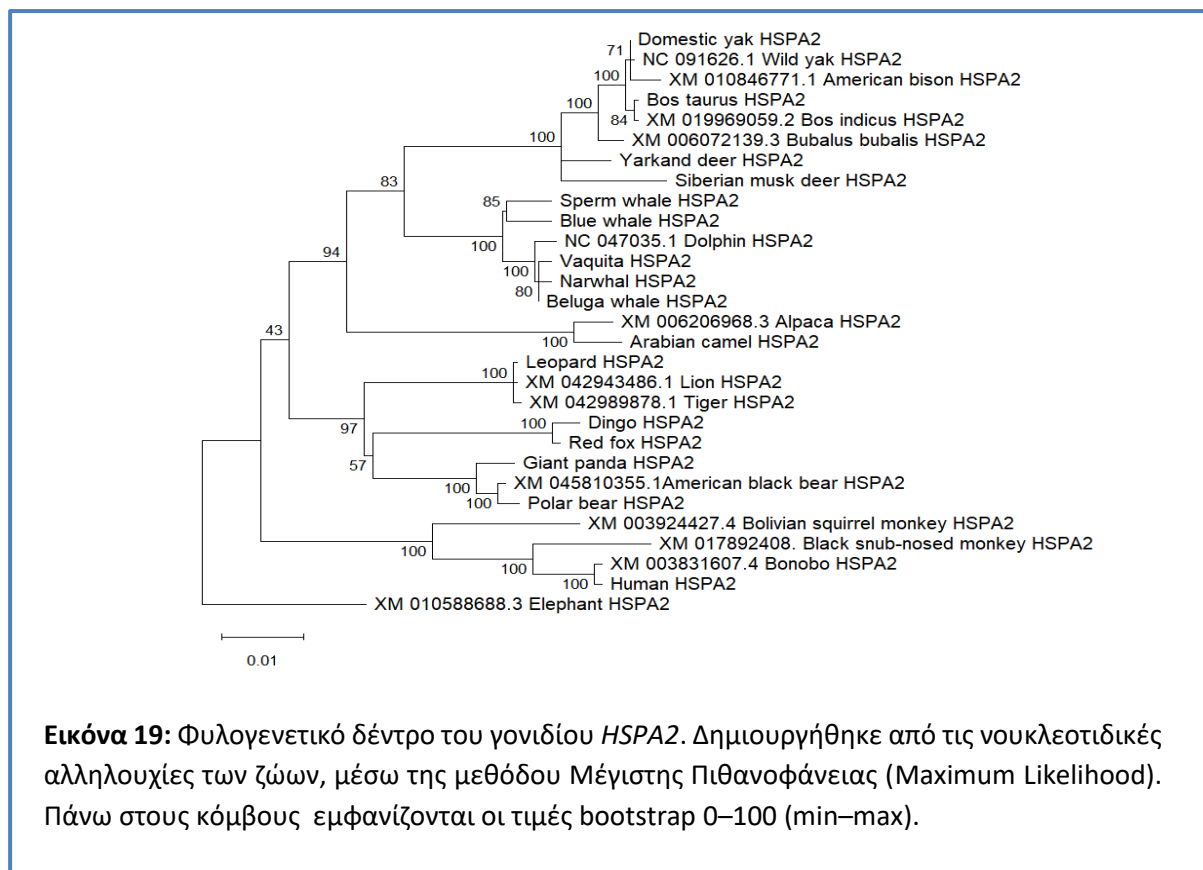
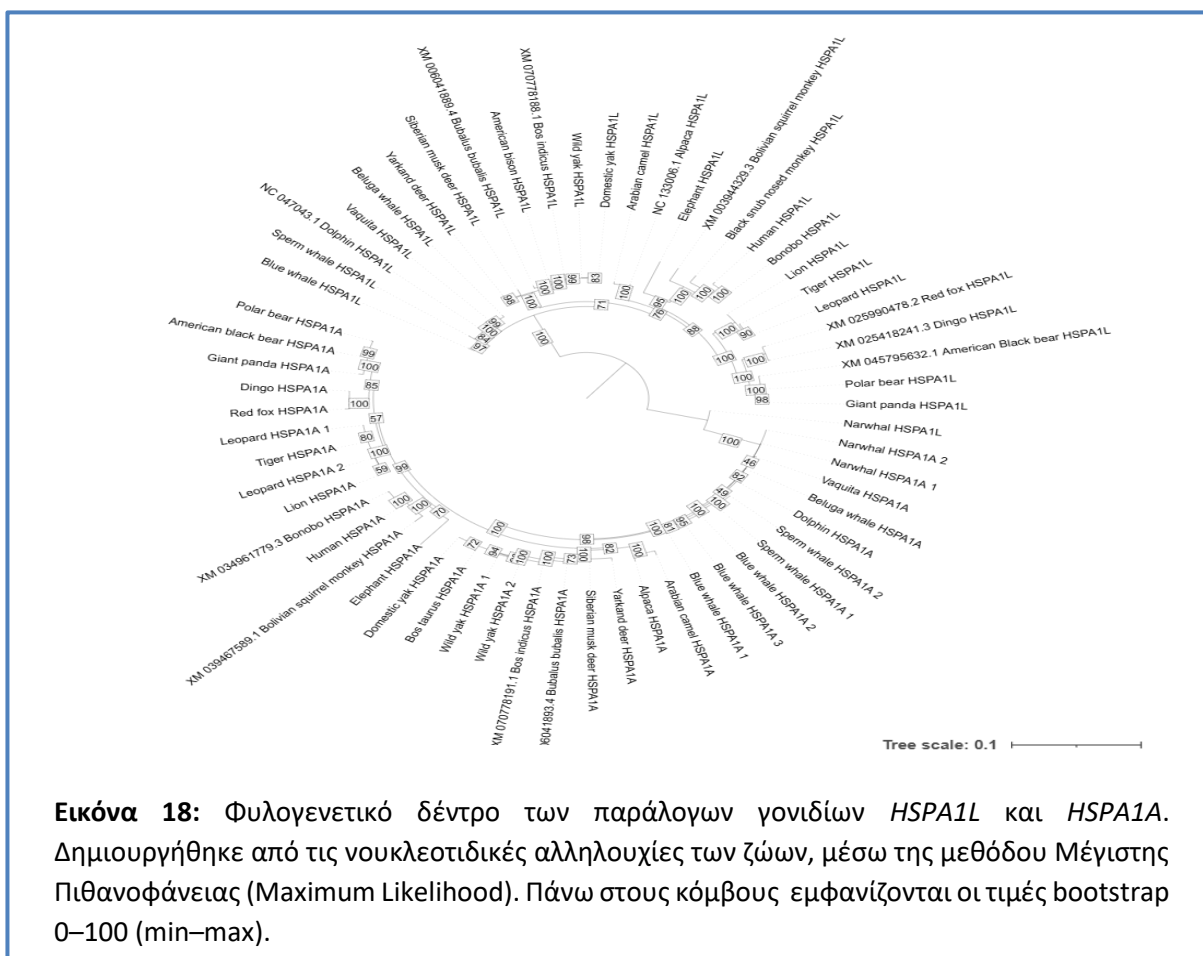


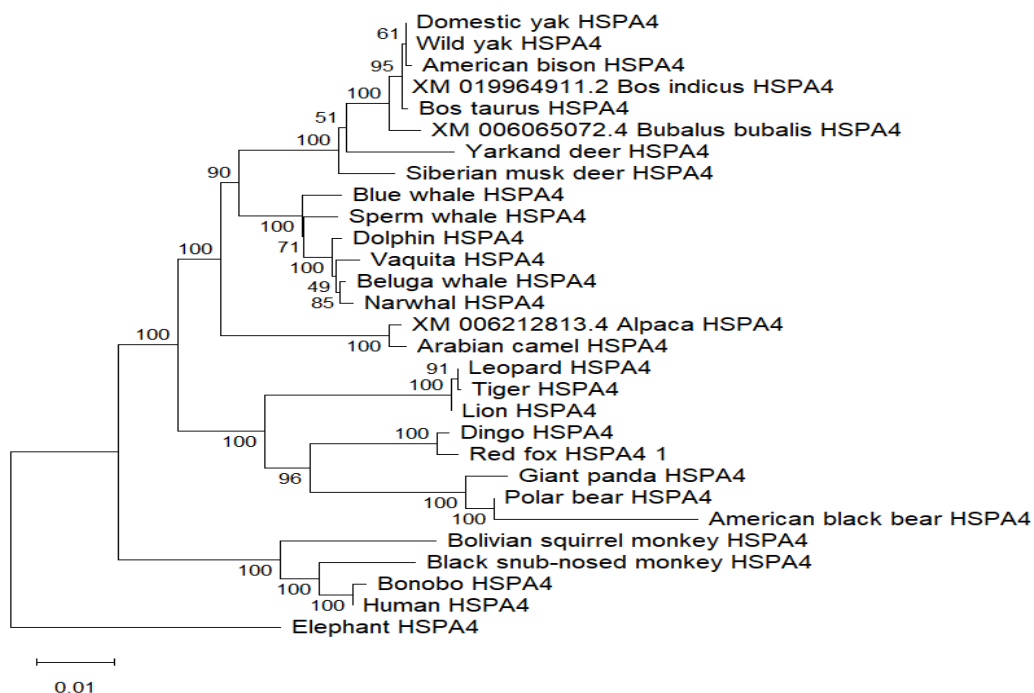


Εικόνα 16: Φυλογενετικό δέντρο του γονιδίου *HSPA1A*. Δημιουργήθηκε από τις νουκλεοτιδικές αλληλουχίες των ζώων, μέσω της μεθόδου Μέγιστης Πιθανοφάνειας (Maximum Likelihood). Πάνω στους κόμβους εμφανίζονται οι τιμές bootstrap 0–100 (min–max).

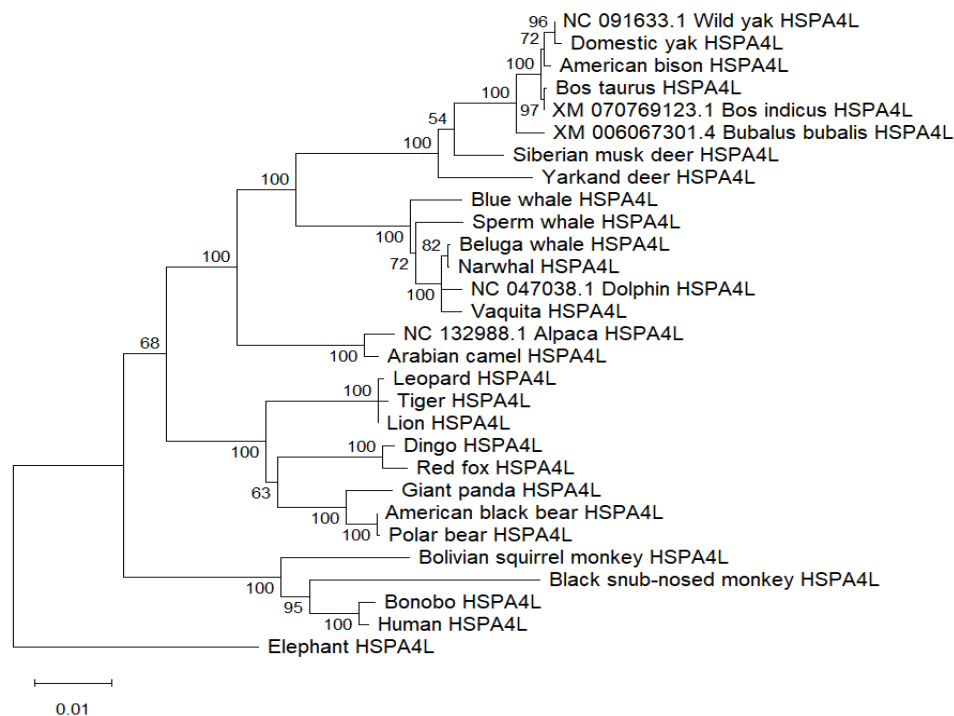


Εικόνα 17: Φυλογενετικό δέντρο του γονιδίου *HSPA1L*. Δημιουργήθηκε από τις νουκλεοτιδικές αλληλουχίες των ζώων, μέσω της μεθόδου Μέγιστης Πιθανοφάνειας (Maximum Likelihood). Πάνω στους κόμβους εμφανίζονται οι τιμές bootstrap 0–100 (min–max).

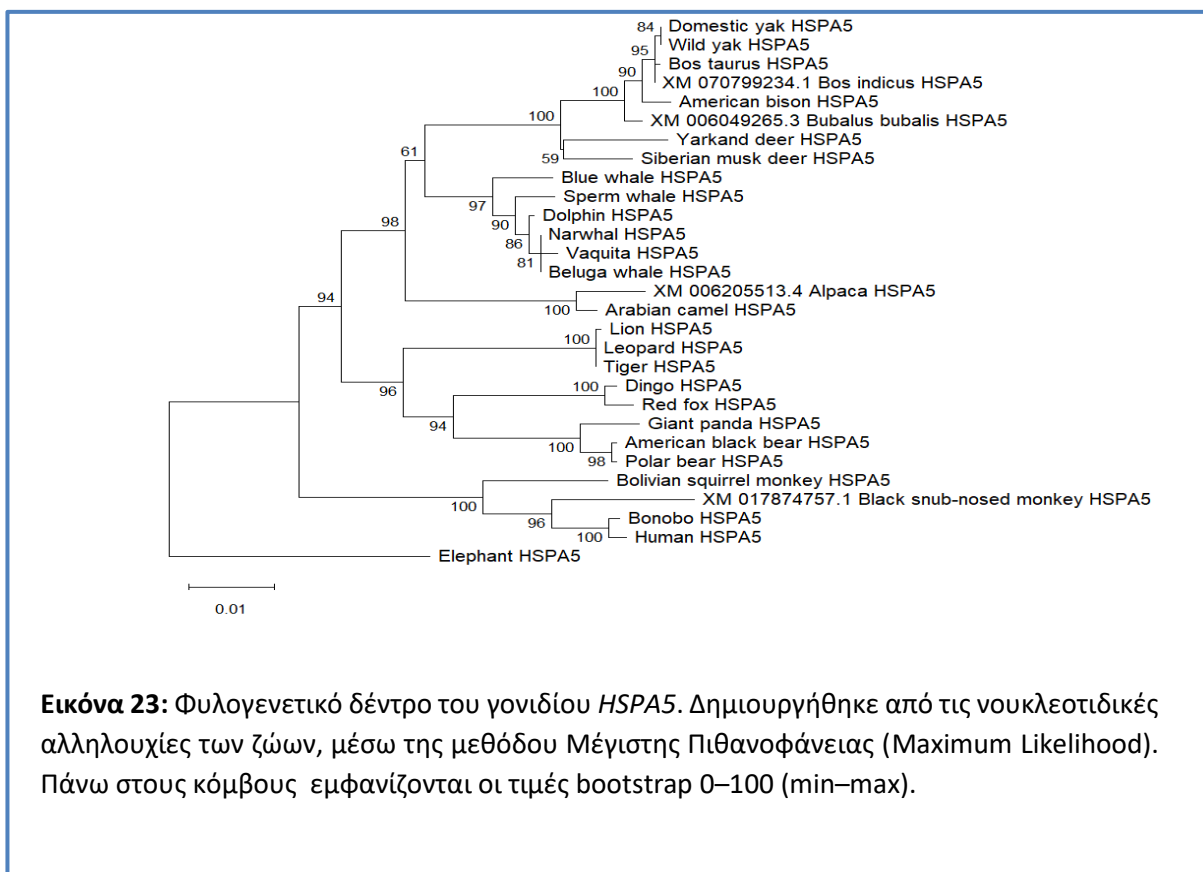
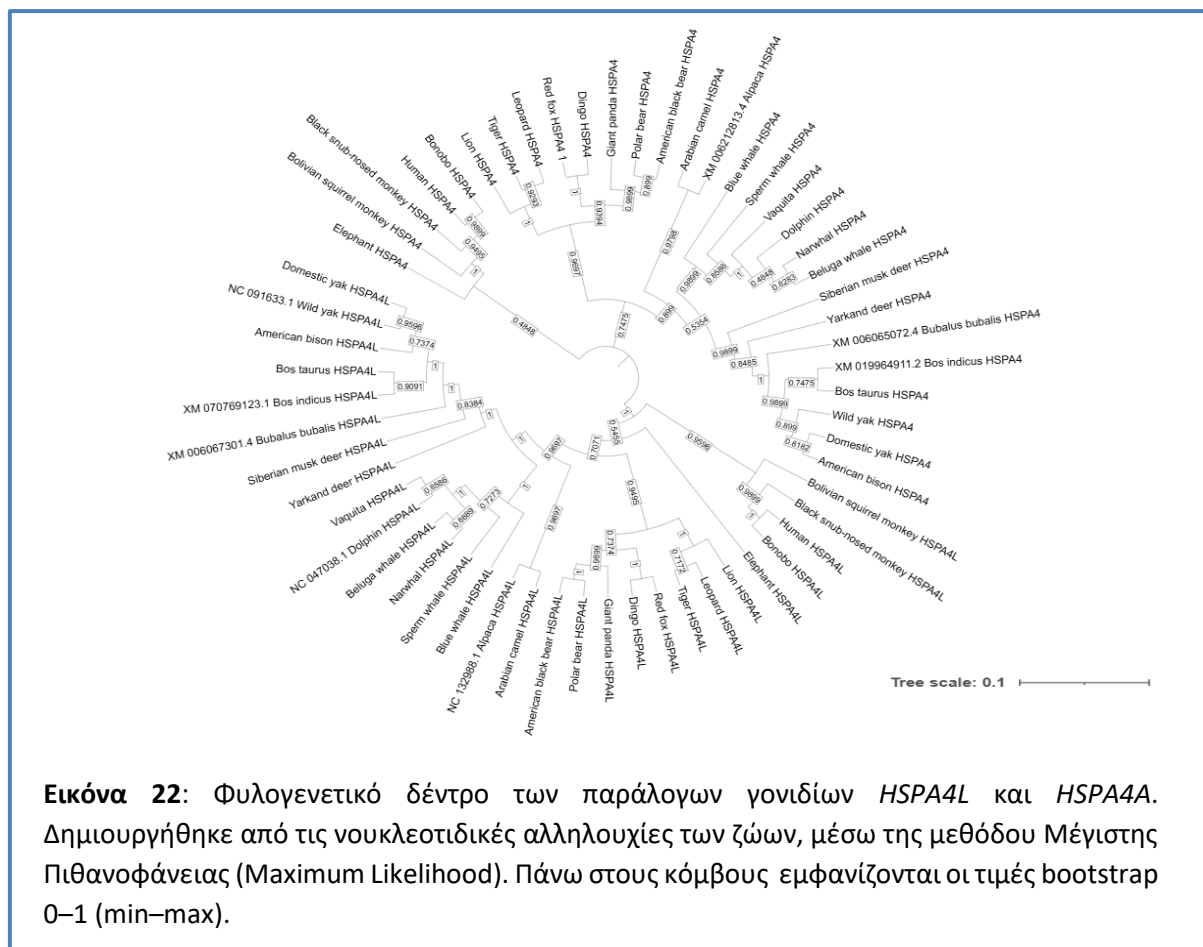


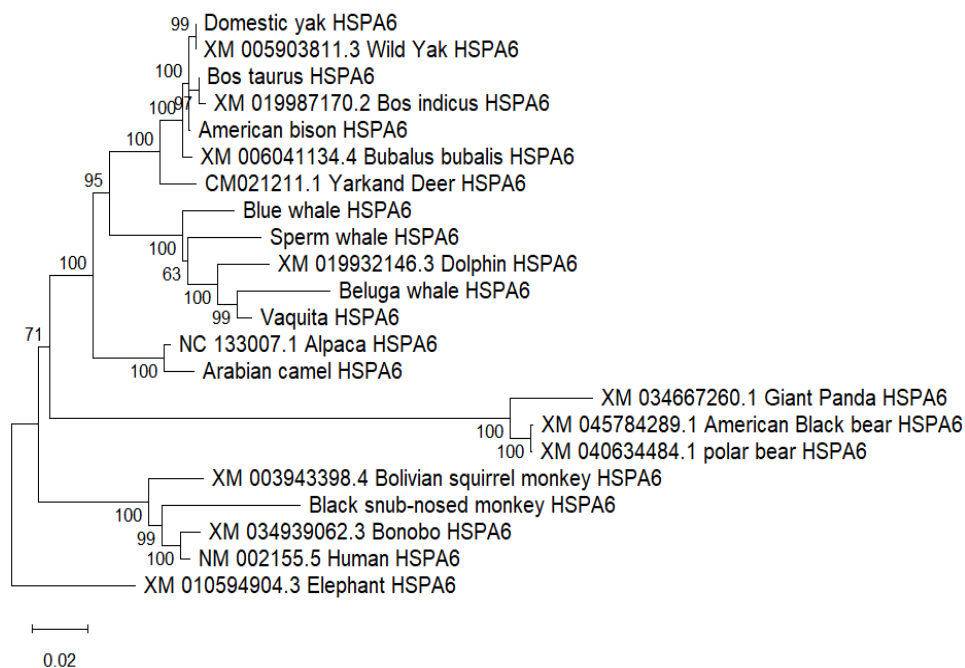


Εικόνα 20: Φυλογενετικό δέντρο του γονιδίου *HSPA4*. Δημιουργήθηκε από τις νουκλεοτιδικές αλληλουχίες των ζώων, μέσω της μεθόδου Μέγιστης Πιθανοφάνειας (Maximum Likelihood). Πάνω στους κόμβους εμφανίζονται οι τιμές bootstrap 0–100 (min–max).

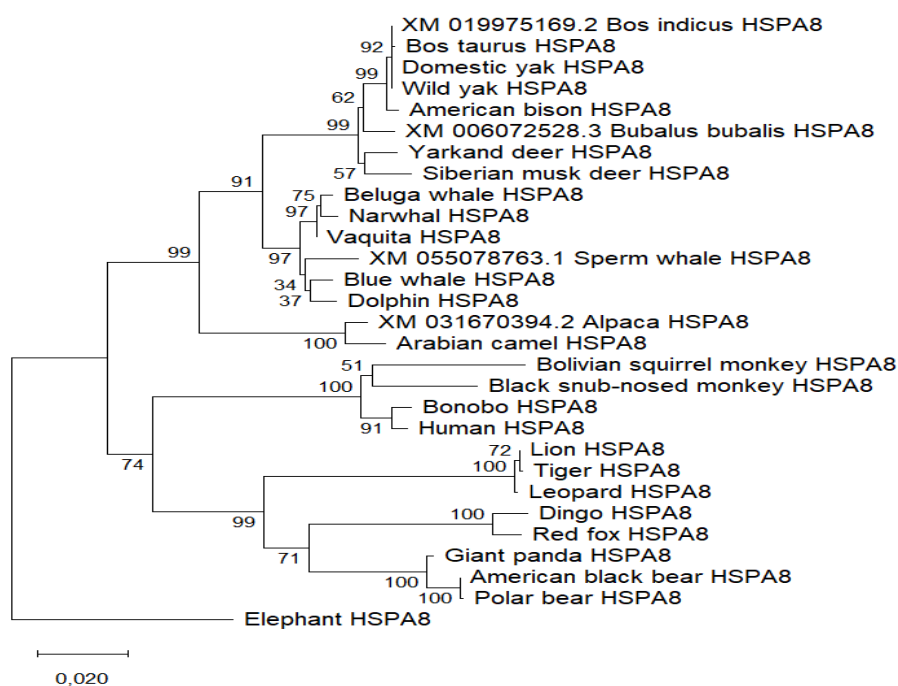


Εικόνα 21: Φυλογενετικό δέντρο του γονιδίου *HSPA4L*. Δημιουργήθηκε από τις νουκλεοτιδικές αλληλουχίες των ζώων, μέσω της μεθόδου Μέγιστης Πιθανοφάνειας (Maximum Likelihood). Πάνω στους κόμβους εμφανίζονται οι τιμές bootstrap 0–100 (min–max).

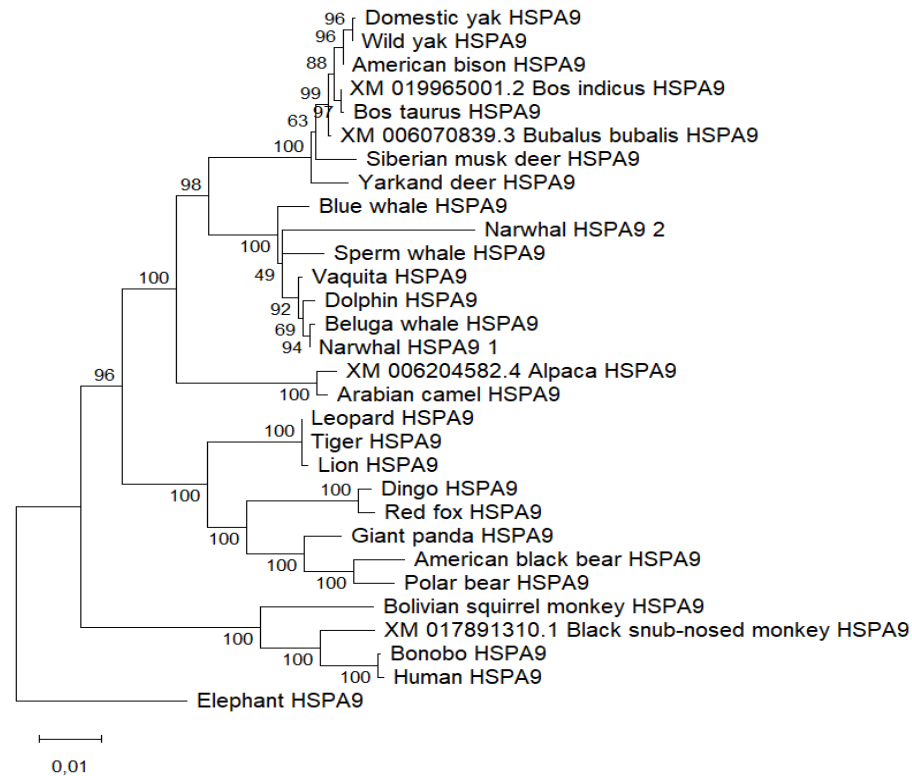




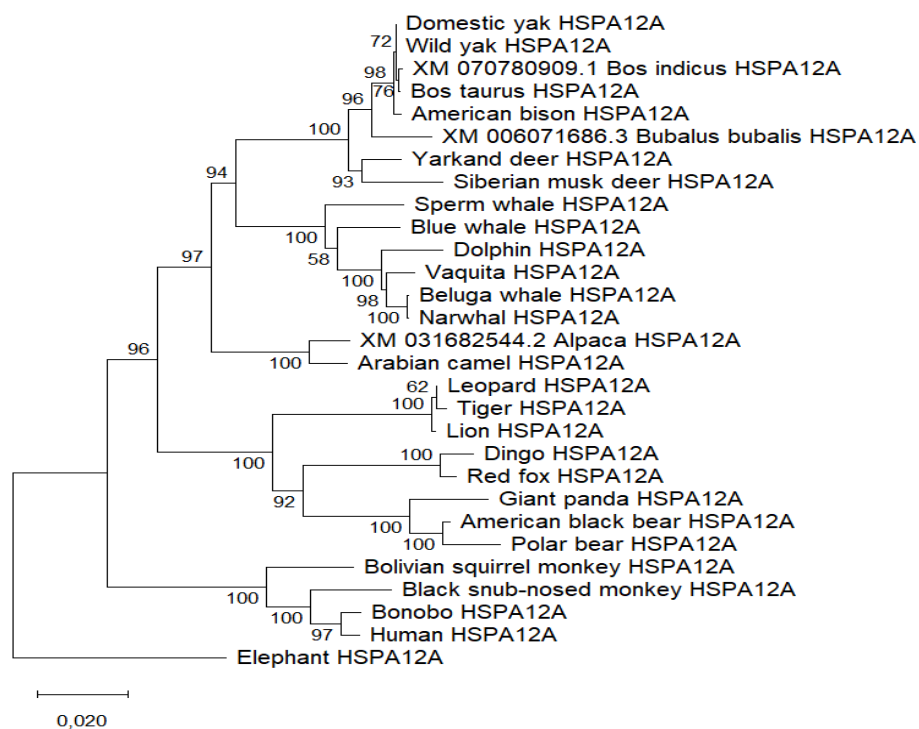
Εικόνα 24: Φυλογενετικό δέντρο του γονιδίου *HSPA6*. Δημιουργήθηκε από τις νουκλεοτιδικές αλληλουχίες των ζώων, μέσω της μεθόδου Μέγιστης Πιθανοφάνειας (Maximum Likelihood). Πάνω στους κόμβους εμφανίζονται οι τιμές bootstrap 0–100 (min–max).



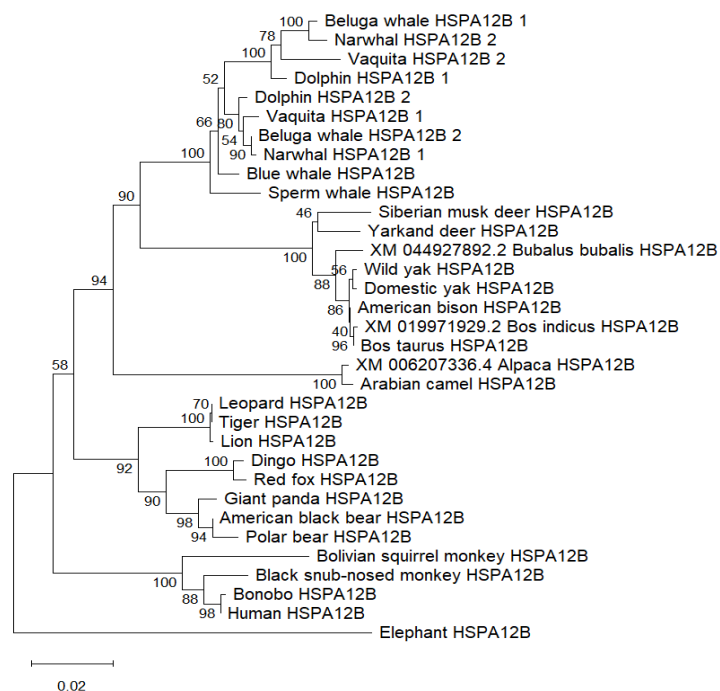
Εικόνα 25: Φυλογενετικό δέντρο του γονιδίου *HSPA8*. Δημιουργήθηκε από τις νουκλεοτιδικές αλληλουχίες των ζώων, μέσω της μεθόδου Μέγιστης Πιθανοφάνειας (Maximum Likelihood). Πάνω στους κόμβους εμφανίζονται οι τιμές bootstrap 0–100 (min–max).



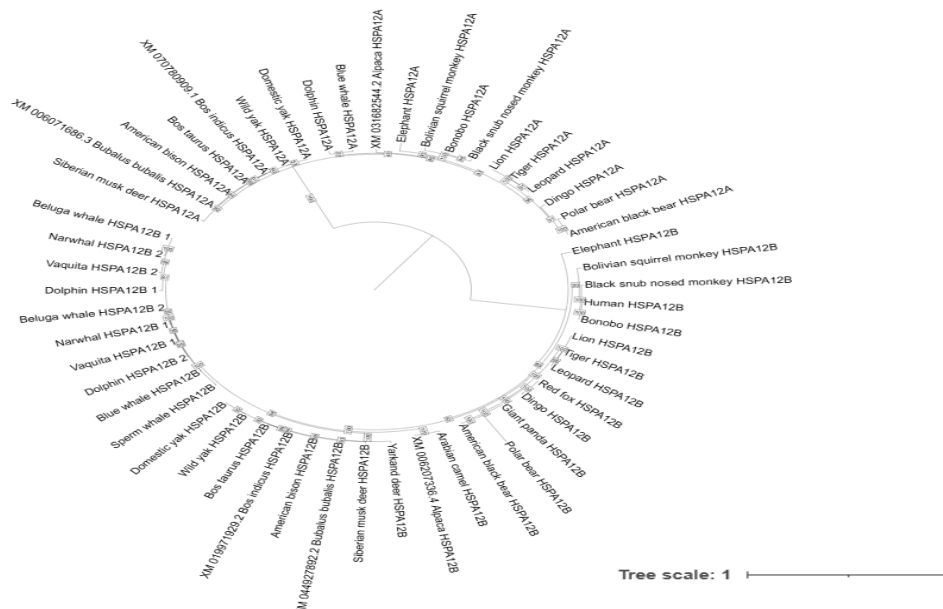
Εικόνα 26: Φυλογενετικό δέντρο του γονιδίου *HSPA9*. Δημιουργήθηκε από τις νουκλεοτιδικές αλληλουχίες των ζώων, μέσω της μεθόδου Μέγιστης Πιθανοφάνειας (Maximum Likelihood). Πάνω στους κόμβους εμφανίζονται οι τιμές bootstrap 0–100 (min–max).



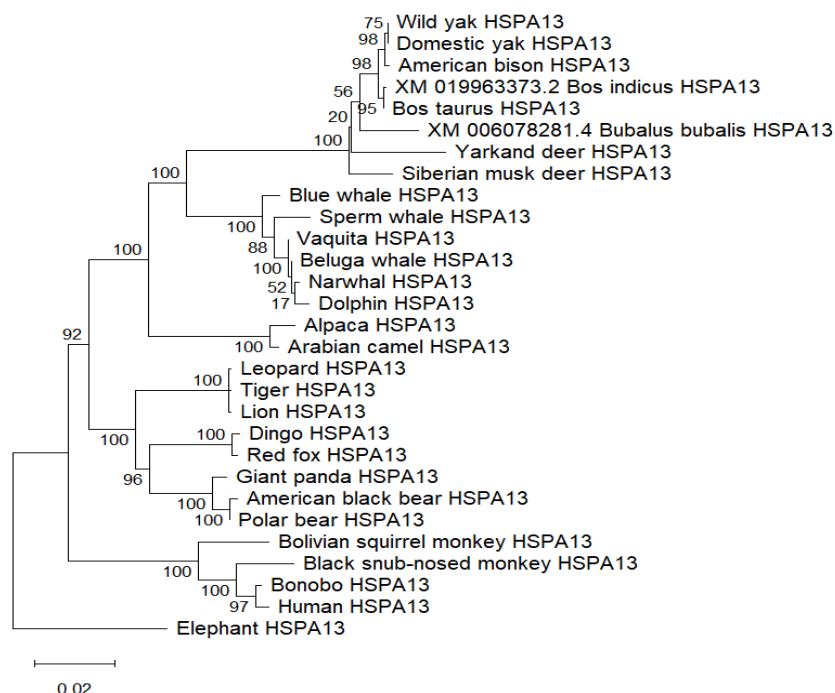
Εικόνα 27: Φυλογενετικό δέντρο του γονιδίου *HSPA12A*. Δημιουργήθηκε από τις νουκλεοτιδικές αλληλουχίες των ζώων, μέσω της μεθόδου Μέγιστης Πιθανοφάνειας (Maximum Likelihood). Πάνω στους κόμβους εμφανίζονται οι τιμές bootstrap 0–100 (min–



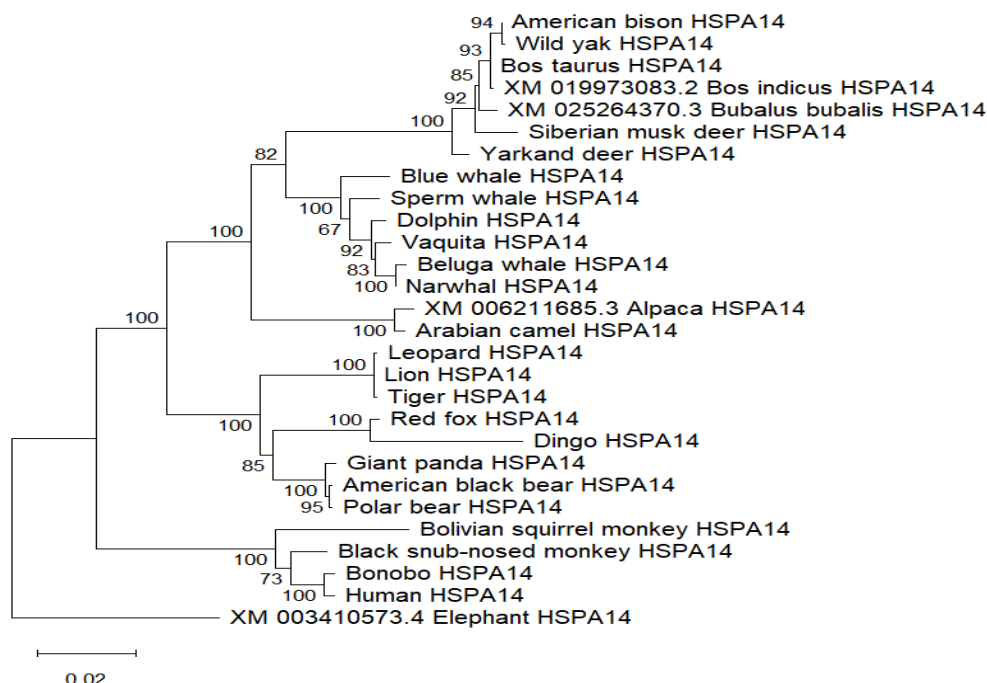
Εικόνα 28: Φυλογενετικό δέντρο του γονιδίου *HSPA12B*. Δημιουργήθηκε από τις νουκλεοτιδικές αλληλουχίες των ζώων, μέσω της μεθόδου Μέγιστης Πιθανοφάνειας (Maximum Likelihood). Πάνω στους κόμβους εμφανίζονται οι τιμές bootstrap 0–100 (min–max).



Εικόνα 29: Φυλογενετικό δέντρο των παράλογων γονιδίων *HSPA12B* και *HSPA12A*. Δημιουργήθηκε από τις νουκλεοτιδικές αλληλουχίες των ζώων, μέσω της μεθόδου Μέγιστης Πιθανοφάνειας (Maximum Likelihood). Πάνω στους κόμβους εμφανίζονται οι τιμές bootstrap 0–100 (min–max).



Εικόνα 30: Φυλογενετικό δέντρο του γονιδίου *HSPA13*. Δημιουργήθηκε από τις νουκλεοτιδικές αλληλουχίες των ζώων, μέσω της μεθόδου Μέγιστης Πιθανοφάνειας (Maximum Likelihood). Πάνω στους κόμβους εμφανίζονται οι τιμές bootstrap 0–100 (min–max).



Εικόνα 31: Φυλογενετικό δέντρο του γονιδίου *HSPA14*. Δημιουργήθηκε από τις νουκλεοτιδικές αλληλουχίες των ζώων, μέσω της μεθόδου Μέγιστης Πιθανοφάνειας (Maximum Likelihood). Πάνω στους κόμβους εμφανίζονται οι τιμές bootstrap 0–100 (min–max).

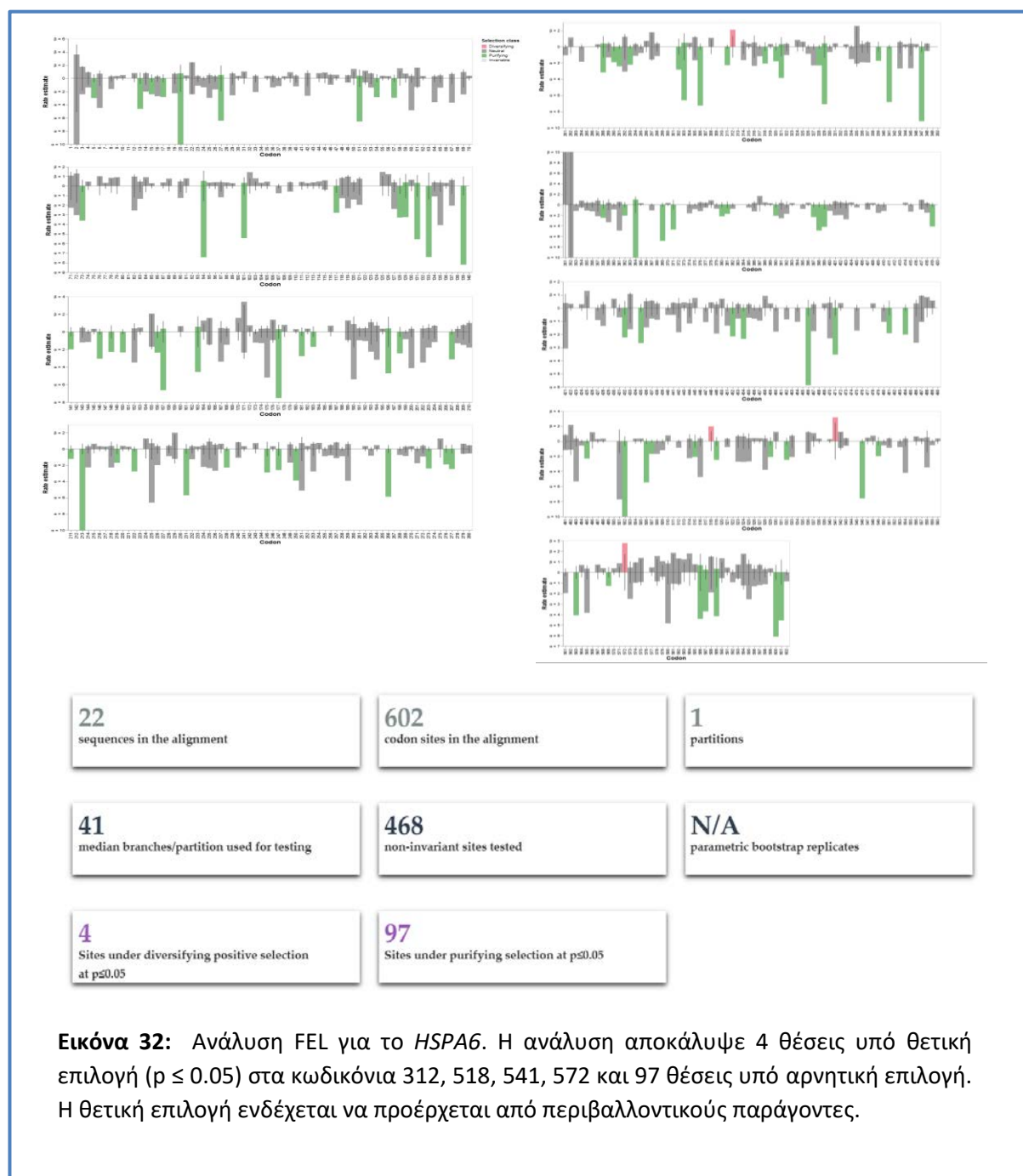
Τα ζώα που χρησιμοποιήθηκαν για τη δημιουργία των φυλογενετικών δέντρων ζουν, αναπτύσσονται και αναπαράγονται σε εντελώς διαφορετικά περιβάλλοντα. Διαφέρουν τόσο στη μορφολογία τους (έρημοι, ζούγκλες, σαβάνες, ωκεανοί), όσο και στο εύρος των θερμοκρασιών. Οι συνθήκες αυτές κυμαίνονται από πολύ υψηλές θερμοκρασίες, όπως στην έρημο όπου ζουν οι καμήλες και η θερμοκρασία φτάνει τους 45–48 °C, έως εξαιρετικά χαμηλές, όπως στον Αρκτικό Κύκλο, όπου ζουν οι πολικές αρκούδες και η θερμοκρασία μπορεί να φτάσει τους –37 °C. Η φυσική επιλογή, δηλαδή στην συγκεκριμένη περίπτωση οι θερμοκρασιακές διαφορές που χαρακτηρίζουν τα ενδιαιτήματα διαβίωσης των οργανισμών, δεν άσκησαν καμία μετρήσιμη επίδραση στον τρόπο με τον οποίο εξελίχθηκαν και κληρονομήθηκαν τα γονίδια της οικογένειας *Hsp70*. Η ανάλυση κατέδειξε ότι όλα τα φυλογενετικά δέντρα ακολουθούν πιστά την τοπολογία του species tree, χωρίς να διαφαίνεται κάποια σημαντική εξελικτική πίεση ή διαφοροποιητική τάση. Το εύρημα αυτό υποδηλώνει ότι τα γονίδια της οικογένειας *Hsp70* παραμένουν εξαιρετικά συντηρημένα σε ευρύ φάσμα οργανισμών, ανεξαρτήτως περιβαλλοντικών ή κλιματικών συνθηκών, γεγονός που ενισχύει την άποψη ότι η λειτουργία τους είναι ύψιστης σημασίας.

4.2 Ανάλυση φυσικής επιλογής

Για να εκτιμηθεί, επιπλέον, η ύπαρξη φυσικής επιλογής στα υπό μελέτη γονίδια εφαρμόστηκε η μέθοδος Fixed Effects Likelihood (FEL), μέσω τις διαδικτυακής πλατφόρμας Datamonkey. Η μέθοδος FEL βασίζεται στην μέγιστη πιθανοφάνεια και καθιστά δυνατή την ανάλυση σε επίπεδο μεμονωμένων κωδικονίων το κάθε ένα από τα δεκατρία γονίδια, εκτιμώντας για κάθε θέση τον λόγο μη-συνώνυμων προς συνώνυμες αντικαταστάσεις (dN/dS). Έτσι δύναται η ικανότητα να μπορούν να εντοπισθούν οι θέσεις που βρίσκονται υπό θετική επιλογή ($dN/dS > 1$), δηλαδή εκεί όπου ευνοούνται οι αμινοξικές αλλαγές και δρα η εξελικτική πίεση, θέσεις που υπόκεινται αρνητική ή εξαγνιστική επιλογή ($dN/dS < 1$), όπου ακολουθία διατηρείται σταθερή, καθώς και θέσεις που εξελίσσονται ουδέτερα ($dN/dS \approx 1$). Ένα από τα βασικά πλεονεκτήματα της συγκεκριμένης μεθόδου είναι ότι δεν απαιτείται ο εκ των προτέρων καθορισμός ομάδων κλάδων με διαφορετικά επιλεκτικά καθεστώτα, καθώς η εκτίμηση πραγματοποιείται σε όλο το φυλογενετικό δέντρο. Συνεπώς, η FEL αποτελεί ιδιαίτερα χρήσιμο εργαλείο για τη μελέτη εξελικτικών πιέσεων σε γονίδια που εμφανίζουν υψηλό βαθμό διατήρησης μεταξύ διαφορετικών ειδών, προσφέροντας μια αξιόπιστη εικόνα της εξελικτικής τους ιστορίας.

Η ανάλυση FEL έδειξε παρουσία αρνητικής επιλογής μόνο σε δύο από τα δεκατρία υπό μελέτη γονίδια, τα *HSPA6* και *HSPA9*. Στο γονίδιο *HSPA6*, χρησιμοποιήθηκαν 22 αλληλουχίες συνολικού μήκους 602 κωδικονίων, από τα οποία τα 468 ήταν μεταβλητά. Η ανάλυση αποκάλυψε 4 θέσεις υπό θετική επιλογή ($p \leq 0.05$) και 97 θέσεις υπό αρνητική επιλογή, γεγονός που δείχνει ότι το γονίδιο υπόκειται κυρίως σε εξαγνιστική πίεση, με περιορισμένα αλλά υπαρκτά σήματα θετικής επιλογής (Εικόνα 32). Στο γονίδιο *HSPA9*, χρησιμοποιήθηκαν 30 αλληλουχίες με συνολικά 682 κωδικόνια, εκ των οποίων τα 406 ήταν μεταβλητά. Η ανάλυση ανέδειξε μόνο 1 θέση υπό θετική επιλογή ($p \leq 0.05$) και 121 θέσεις υπό αρνητική επιλογή, επιβεβαιώνοντας ότι και το συγκεκριμένο γονίδιο διατηρείται εξελικτικά μέσω έντονης αρνητικής επιλογής, με περιορισμένα σήματα προσαρμοστικής διαφοροποίησης (Εικόνα 33). Τα κωδικόνια που ανέδειξε η ανάλυση FEL για τα δυο γονίδια *HSPA6* και *HSPA9*

όταν μεταφραστούν σε αμινοξέα, διαφοροποιούνται ανάμεσα στα είδη της ανάλυσης (Πίνακας 2).





ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΣ	HSPA6				HSPA9
	CD: 312	CD: 518	CD: 541	CD:572	CD:17
Giant panda	CGT	AGT	CAC	AAT	CTC
American black bear	CAT	AGT	CAC	AAT	CTC
Polar bear	CAT	AGT	CAC	AAT	CGC
Sperm whale	CAT	TGT	TGC	CAT	CTC
Blue whale	CAT	TGT	CGC	TGT	CTC
Beluga whale	CGT	TAT	TAC	AAA	CTC
Dolphin	CCT	TAT	TGC	TAT	CTC
Vaquita	TGT	TAT	TAC	TAT	CTC
Alpaca	CAT	TAT	CGC	GAT	CTC
Arabian camel	CAT	TAT	CAC	GAT	CTC
Yarkand deer	CAT	TAT	CGC	GAT	CTC
Bubalus bubalis	CAT	TAT	CAC	GAT	CTC
American bison	CAT	TAT	CGC	GAT	CTC
Domestic yak	CAT	TAT	CGC	GAT	CTC
Wild yak	CAT	TAT	CGC	GAT	CTC
Bos taurus	CAT	TAT	CGC	GAT	CTC
Bos indicus	CAT	TAT	CGC	GAT	CTC
Elephant	CAG	TAT	TGC	AAT	CTC
Black snub-nosed monkey	CAT	CAT	CGC	-	CTC
Bonobo	CAT	CAT	CGC	AAT	CTC
Bolivian squirrel monkey	CAT	CAT	TGC	AAT	CAC
Human	CAT	CAT	CGC	AAT	CTC
Tiger	-	-	-	-	CTC
Leopard	-	-	-	-	CTC
Lion	-	-	-	-	CTC
Dingo	-	-	-	-	CTC
Red fox	-	-	-	-	CTC
Narwhal	-	-	-	-	CTC
Siberian musk deer	-	-	-	-	CTC

Πίνακας 2: Οι νουκλεοτιδικές αλληλουχίες των κωδικονίων, για τις θέσεις που εμφανίστηκε φυσική επιλογή, σε κάθε έναν οργανισμό. Με κατεύθυνση 5'→ 3'

5. Συζήτηση

5.1 Εξέλιξη των γονιδίων *Hsp70*

Οι μεταβολές στην παγκόσμια θερμοκρασία είναι πλέον αισθητές και επηρεάζουν σημαντικά μια πληθώρα οργανισμών, πολλοί εκ των οποίων αποτελούν και θεμέλιο λίθο για την οικονομία και τη διατροφική επάρκεια του πλανήτη μας (Zandalinas et al, 2021). Ενδεικτικό παράδειγμα αποτελούν τα γαλακτοπαραγωγικά ζώα, όπως οι αγελάδες, οι οποίες είναι ιδιαίτερα ευάλωτες στην αύξηση της θερμοκρασίας, κυρίως κατά τους θερινούς μήνες. Η θερμική καταπόνηση (heat stress) οδηγεί σε μείωση της παραγωγικότητας και της αναπαραγωγικής ικανότητας, προκαλώντας έτσι σοβαρές απώλειες στον πρωτογενή τομέα. Καίριας σημασίας για την προστασία των κυττάρων αυτών των ζώων είναι οι συνοδοί πρωτεΐνες της οικογένειας *Hsp70*, οι οποίες λειτουργούν ως μοριακά «συστήματα άμυνας». Οι πρωτεΐνες αυτές περιορίζουν ή και εξαλείφουν τις βλάβες που προκαλούνται από τις υψηλές θερμοκρασίες στις κυτταρικές πρωτεΐνες, διατηρώντας την πρωτεϊνική ομοιόσταση και, κατά συνέπεια, τη βιωσιμότητα του κυττάρου (Harigono et al, 2022).

Στο πλαίσιο της παρούσας μελέτης, εξετάστηκαν οι εξελικτικές σχέσεις δεκατριών γονιδίων της οικογένειας *Hsp70* και των αντίστοιχων ορθόλογων τους σε είκοσι εννέα οργανισμούς, οι οποίοι αναπτύσσονται και αναπαράγονται σε περιβάλλοντα με εντελώς διαφορετικές θερμοκρασιακές συνθήκες. Για τη διερεύνηση της εξελικτικής πορείας τους δημιουργήθηκαν φυλογενετικά δέντρα, τα οποία συγκρίθηκαν με το Species tree, το οποίο προήλθε από μιτοχονδριακές αλληλουχίες των ίδιων οργανισμών. Στόχος ήταν να ελεγχθεί εάν οι συνθήκες διαβίωσης σε ακραία θερμοκρασιακά περιβάλλοντα, είτε πολύ θερμά, είτε πολύ ψυχρά, έχουν επηρεάσει τον τρόπο που έχουν εξελιχθεί. Τα αποτελέσματα κατέδειξαν ότι, σε όλα τα γονίδια που μελετήθηκαν, τα είδη διατήρησαν το ίδιο μοτίβο τοπολογίας, χωρίς καμία απόκλιση από το Species tree. Το εύρημα αυτό καταδεικνύει ότι οι περιβαλλοντικές διαφορές στα οικοσυστήματα δεν άσκησαν καμία εμφανή εξελικτική πίεση στις αλληλουχίες και στον τρόπο κληρονομής των γονιδίων *Hsp70*. Η παρατήρηση αυτή ενισχύει την υπόθεση ότι οι συνοδοί πρωτεΐνες της οικογένειας *Hsp70* διαδραματίζουν απολύτως θεμελιώδεις και μη υποκαταστάσιμους ρόλους στην κυτταρική λειτουργία. Άρα είναι αναμενόμενο οι νουκλεοτιδικές τους αλληλουχίες να παρουσιάζουν εξαιρετικά υψηλό βαθμό συντήρησης, με ελάχιστες ή μηδενικές μεταβολές, ώστε να προστατεύεται η λειτουργικότητά τους και να αποτρέπεται οποιαδήποτε διαταραχή στον τρόπο δράσεώς τους.

5.2 Φυλογενετικά δέντρα

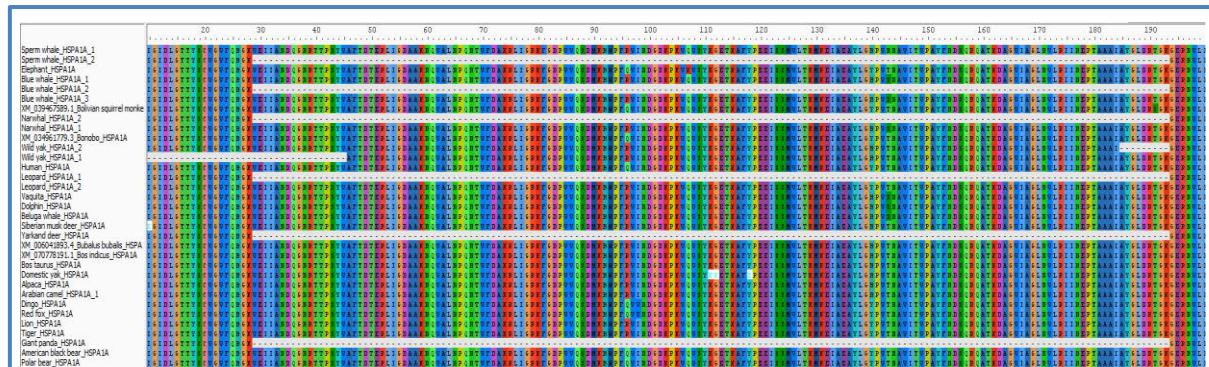
Τα περισσότερα φυλογενετικά δέντρα που δημιουργήθηκαν ακολουθούν με μεγάλη ακρίβεια, ως προς τη δομή και την τοπολογία, το Species tree. Ωστόσο, σε ορισμένες περιπτώσεις εντοπίστηκαν αποκλίσεις ή λεπτομέρειες που αξίζουν ιδιαίτερης προσοχής και περαιτέρω σχολιασμού. Τέτοιες διαφοροποιήσεις, αν και περιορισμένες, μπορούν να προσφέρουν πολύτιμες ενδείξεις για πιθανές εξελικτικές ιδιαιτερότητες των οργανισμών. Οι βασικές ομάδες ειδών που προκύπτουν από το φυλογενετικό δέντρο είναι: Τα μηρυκαστικά, τα κητώδη, οι καμήλες, τα σαρκοφάγα, οι κυνίδες, οι αρκούδες και τα πρωτεύοντα. Ως

εξωομάδα έχει χρησιμοποιηθεί ο ελέφαντας, που επιλέχθηκε επειδή είναι ο πιο μακρινός εξελικτικά πρόγονος από τα ζώα που χρησιμοποιήθηκαν με βάση τα δυο Species trees (Εικόνα 14 & 15).

5.2.1 HSPA1A & HSPA1L

Τα γονίδια *HSPA1A* και *HSPA1L*, από εξελικτική σκοπιά, θεωρούνται παράλογα, καθώς προέκυψαν από έναν ολικού τύπου γονιδιακό διπλασιασμό (Hess et al, 2018). Ο γονιδιακός διπλασιασμός δημιουργεί ένα γενετικό πλεόνασμα, παρέχοντας “ανταλλακτικά” αντίγραφα, στα οποία μπορούν να συσσωρευτούν μεταλλάξεις χωρίς να τίθεται σε κίνδυνο η λειτουργία του αρχικού γονιδίου. Το φαινόμενο αυτό έχει ιδιαίτερη σημασία στην παρούσα περίπτωση, δεδομένου ότι τα *HSPA1A* και *HSPA1L* επιτελούν καθοριστικούς ρόλους στη διατήρηση της κυτταρικής ομοιόστασης και στην αντιμετώπιση του θερμικού στρες (Crow et al, 2006). Τα διπλασιασμένα γονίδια, πέραν της σημασίας τους ως “αποθήκες” μεταλλάξεων, δύνανται επίσης να αποκτήσουν νέες λειτουργικές ιδιότητες ή να ενισχύσουν την ήδη υπάρχουσα λειτουργικότητα. Σε πολλές περιπτώσεις, η διατήρηση περισσότερων αντιγράφων σχετίζεται με τη ισχύ της αρχικής τους λειτουργίας, καθώς τα επιπλέον αντίγραφα εξασφαλίζουν την ενίσχυση ή ακόμη και την εξειδίκευση της γονιδιακής δραστηριότητας, συμβάλλοντας στην αποτελεσματικότερη εκτέλεση θεμελιωδών κυτταρικών διεργασιών. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι, εκτός από το παράλογο γονίδιο *HSPA1L*, σε ορισμένα ζώα ανιχνεύθηκαν και επιπλέον παράλογα γονίδια για το *HSPA1A*. Συγκεκριμένα, η μπλε φάλαινα διαθέτει τρία γονίδια *HSPA1A*, η φάλαινα φυσητήρας δύο, η φάλαινα μονόκερος δύο, η λεοπάρδαλη δύο και το άγριο γιόκ δύο. Τα πολλαπλά αυτά ορθόλογα πιθανότατα προέκυψαν είτε μέσω τοπικών γονιδιακών διπλασιασμών στο ίδιο το γονίδιο, είτε μέσω ευρύτερων γεγονότων γονιδιωματικού διπλασιασμού που συνέβησαν χρονικά πιο πρόσφατα σε κοινούς προγόνους, και περιορίστηκαν σε συγκεκριμένες εξελικτικές γραμμές. Η υπόθεση αυτή ενισχύεται από το γεγονός ότι τα γονίδια ομαδοποιούνται σε κλάδους ανάλογα με το είδος στο οποίο ανήκουν.

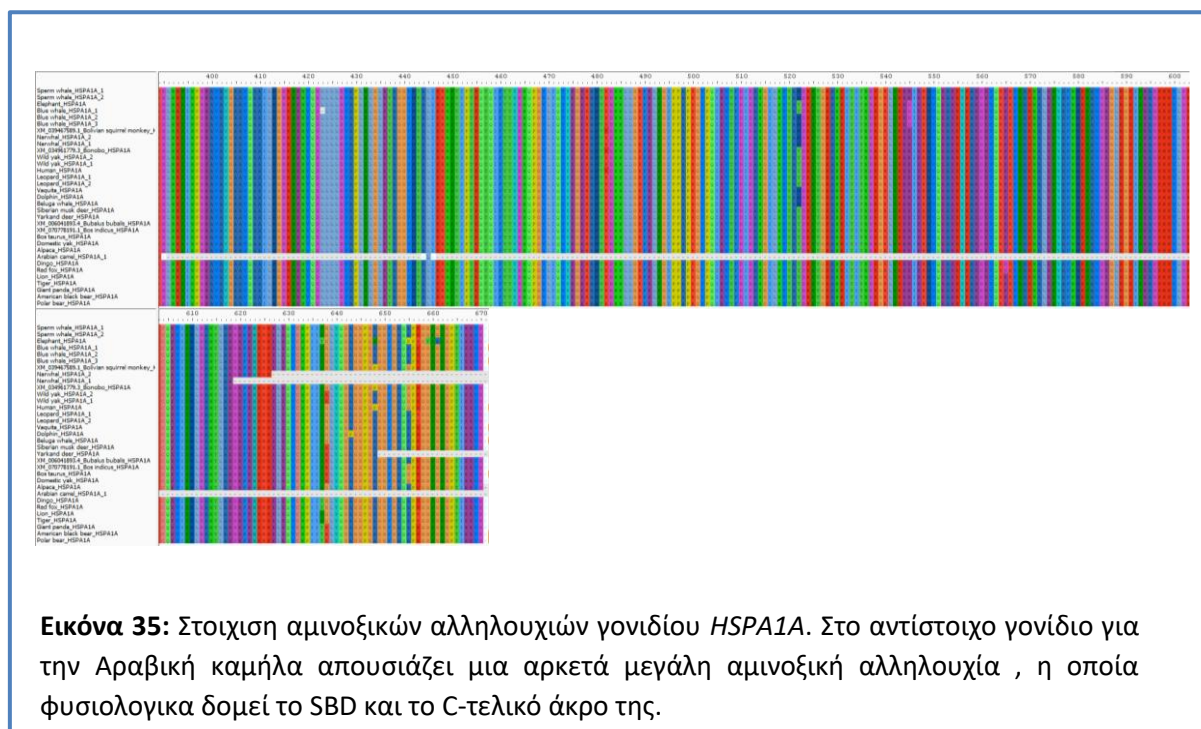
Μετά την στοίχιση των αλληλουχιών για το γονίδιο *HSPA1A*, παρατηρήθηκε η απουσία



Εικόνα 34: Στοίχιση αμινοξικών αλληλουχιών γονιδίου *HSPA1A*. Σε μερικές αλληλουχίες απουσιάζει ένα αμινοξικό τμήμα, το οποίο παίζει ρόλο στην δόμηση του Λοβού Ι, της υπομονάδας NBD.

εκτεταμένων νουκλεοτιδικών τμημάτων, τα οποία υπό φυσιολογικές συνθήκες θα μεταφράζονταν σε αμινοξέα απαραίτητα για τη δόμηση των λειτουργικών υπομονάδων της πρωτεΐνης. Συγκεκριμένα, τα ελλείποντα νουκλεοτίδια αντιστοιχούν σε 164 αμινοξέα

(VEIIAN....AYGLD), τα οποία σχηματίζουν το πεπτίδιο που συμμετέχει στη διαμόρφωση των δύο υποτομέων IA και IB του Λοβού I της υπομονάδας NBD (Εικόνα 34). Η απουσία του Λοβού I έχει ως συνέπεια οι πρωτεΐνες που παράγονται να στερούνται ουσιαστικά μίας ολόκληρης επικράτειας ΑΤΡάσης, γεγονός που περιορίζει ή και αναστέλλει την πλήρη λειτουργική τους αλληλεπίδραση με το μόριο ΑΤΡ. Κάτι τέτοιο δεν παρουσιάστηκε όταν έγινε στοίχιση του, παράλογου σε αυτό, γονιδίου *HSPA1L*, όπου δεν βρέθηκε καμία απουσία νουκλεοτιδικών τμημάτων.

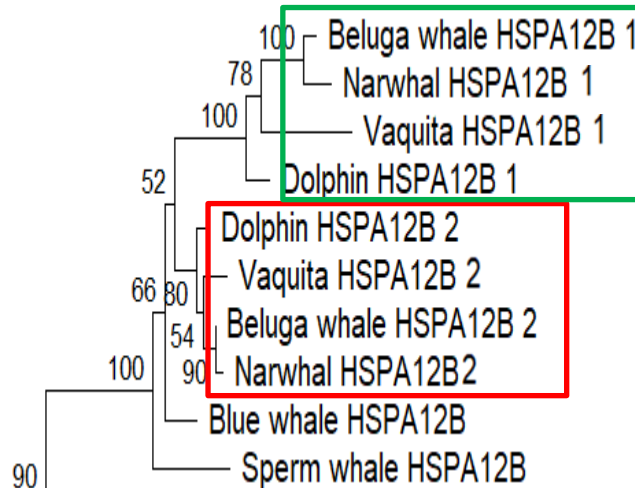


Οι αλληλουχίες με τις νουκλεοτιδικές απουσίες μπορούν να ταξινομηθούν σε δύο κύριες κατηγορίες. Η πρώτη κατηγορία περιλαμβάνει εκείνα που διαθέτουν πολλαπλά παράλογα του *HSPA1A*, όπως είχε ήδη αναφερθεί παραπάνω, και είναι τα γονίδια Leopard_HSPA1A_1, Narwhale_HSPA1A_2, Bleu Whale_HSPA1A_2, Sperm whale_HSPA1A_2. Ενώ στην δεύτερη κατηγορία ανήκουν οι οργανισμοί με ένα γονίδιο *HSPA1A* που είναι οι Giant panda_HSPA1A και Yakanda deer_HSPA1A. Όλοι οι οργανισμοί που εντάσσονται και στις δύο κατηγορίες διαθέτουν τουλάχιστον ένα παράλογο γονίδιο, το οποίο περιέχει ακέραιη τη νουκλεοτιδική πληροφορία και μπορεί να κωδικοποιήσει μια πλήρως λειτουργική πρωτεΐνη. Στα είδη της πρώτης κατηγορίας, το γονίδιο αυτό αντιστοιχεί στο επιπλέον παράλογο του *HSPA1A*, καθώς και στο αντίστοιχο παράλογο της οικογένειας *HSPA1L*. Αντίθετα, τα είδη της δεύτερης κατηγορίας διαθέτουν ως μοναδικό παράλογο γονίδιο της ομάδας *HSPA1L*.

Κάτι αντίστοιχο συμβαίνει και με την αλληλουχία της Αραβικής καμήλας Arabian camel_HSPA1A. Σε αυτή την περίπτωση απουσιάζει ένα ακόμα μεγαλύτερο τμήμα 280 αμινοξέων (DLNKS....EEVD) το οποίο υπό φυσιολογικές συνθήκες θα συνεισφέρει στην δόμηση του SBD και του C-τελικού άκρου της πρωτεΐνης (Εικόνα 35). Όμοια, όπως και στα προηγούμενα, υπάρχει και εδώ ένα παράλογο γονίδιο που ανήκει στην ομάδα *HSPA1L*, το οποίο είναι ολόκληρο και μπορεί και εκφράζεται σε μια πλήρως λειτουργική πρωτεΐνη.

5.2.2 HSPA12A & HSPA12B

Τα δυο γονίδια *HSPA12A* και *HSPA12B* είναι μεταξύ τους παράλογα και έχουν προέλθει από έναν γονιδιωματικό πολλαπλασιασμό (Lu et al, 2024). Παρατηρήθηκε ότι σε ορισμένα θαλάσσια κητώδη έλαβε χώρα ένας επιπλέον γονιδιωματικός διπλασιασμός, με αποτέλεσμα ορισμένα είδη να διαθέτουν δεύτερο ορθόλογο του γονιδίου *HSPA12B*. Τα είδη αυτά είναι η φάλαινα Μπελούγκα, η φάλαινα Μονόκερος, η Βακίτα και το δελφίνι (Εικόνα 36). Στην περίπτωση αυτή δεν παρατηρήθηκε καμία έλλειψη ούτε στα γονίδια της ομάδας *HSPA12A*, ούτε σε εκείνα της *HSPA12B*. Μπορούμε, επομένως, να υποθέσουμε ότι οι διπλασιασμοί, τόσο σε επίπεδο γονιδιώματος, συντελέστηκαν ως εξελικτικός μηχανισμός προσαρμογής. Συγκεκριμένα, τα θαλάσσια αυτά θηλαστικά, που ζουν σε εξαιρετικά ψυχρά περιβάλλοντα με θερμοκρασίες έως και -30°C , φαίνεται να ωφελούνται από την ύπαρξη επιπλέον αντιγράφων. Οι τόσο ακραίες θερμοκρασίες διαταράσσουν σοβαρά την πρωτεϊνική ομοιοστάση των κυττάρων, γεγονός που μπορεί να οδηγήσει σε εκτεταμένες βλάβες και τελικά σε κυτταρικό θάνατο. Η ύπαρξη πολλαπλών γονιδιακών αντιγράφων ενισχύει την παραγωγή πρωτεϊνών Hsp70, προσφέροντας αυξημένη προστασία και πιο αποτελεσματική διατήρηση της κυτταρικής λειτουργίας σε ακραίες συνθήκες.



Εικόνα 36: Στο φυλογενετικό δέντρο για το γονίδιο *HSPA12B*, φαίνεται ότι υπάρχουν για ορισμένα κητώδη θαλάσσια θηλαστικά, συνέβη και ένα δεύτερος γονιδιωματικός διπλασιασμός κάτι που γίνεται αντιληπτό εξαιτίας της δομής που έχει το δέντρο. Το δέντρο χωρίζεται σε δυο κλάδους οι οποίοι περιέχουν διαφορετικά είδη ζώων, ένα στον κάθε ένα, τα διπλασιασμένα γονίδια για κάθε ζώο δεν βρίσκονται στον ίδιο κλάδο.

5.3 Ανάλυση φυσικής επιλογής

Η ανάλυση φυσικής επιλογής στο Datamonkey βασίζεται στον λόγο μη-συνώνυμων προς συνώνυμων αντικαταστάσεων (dN/dS) και επιτρέπει τον εντοπισμό θέσεων που εξελίσσονται υπό θετική ή αρνητική επιλογή. Με τον τρόπο αυτό παρέχεται σαφής εικόνα για τις εξελικτικές πιέσεις που διαμορφώνουν τη λειτουργικότητα ενός γονιδίου.

Η συγκριτική ανάλυση των νουκλεοτιδικών τριπλετών στα γονίδια *HSPA6* και *HSPA9* των θηλαστικών κατέδειξε σαφείς διαφοροποιήσεις, οι οποίες αντανακλούν διαφοροποιημένες εξελικτικές πιέσεις.

Στο γονίδιο *HSPA6*, και συγκεκριμένα στη θέση CD:312, ως επικρατούσα τριπλέτα είναι η CAT η οποία διαφοροποιείται σε αρκετά είδη όπως CGT στο Giant panda και την Beluga whale, CCT στο Dolphin, TGT στο Vaquita και CAG στον Elephant.

Στη θέση CD:518, η συνηθέστερη τριπλέτα είναι η TAT, η οποία και παρουσιάζει παραλλαγές, με την εμφάνιση της AGT στο Giant panda, στη American black bear και στη Polar bear, TGT στις Sperm whale και Blue whale, καθώς και CAT σε όλα τα πρωτεύοντα Black snub-nosed monkey, Bonobo, Bolivian squirrel monkey και Human. Αυτές οι διαφοροποιήσεις ακολουθούν πίστα το Species tree

Στη θέση CD:541, η επικρατούσα τριπλέτα είναι η CGC, ωστόσο καταγράφονται διαφοροποίηση, όπως είναι η CAC στα American black bear, Arabian camel, Bubalus bubalis, Giant panda, Polar bear, TGC στα Sperm whale, Dolphin, Elephant, Bolivian squirrel monkey και σε TAC στην Beluga whale και Vaquita.

Αντίστοιχα, στη θέση CD:572, η τριπλέτα GAT διαφοροποιείται σε AAT, σε πλήθος ζώων όπως είναι τα Giant panda, Polar bear, American black bear, Elephant, Bonobo, Human, Bolivian squirrel monkey, σε CAT στην Sperm whale, σε TGT στην Blue whale, σε AAA στην Beluga whale και σε TAT στα Dolphin και Vaquita. Οι επαναλαμβανόμενες αυτές διαφοροποιήσεις στις ίδιες θέσεις σε διαφορετικά είδη φανερώνουν ότι το γονίδιο *HSPA6* υπόκειται σε εντονότερη φυσική επιλογή, πιθανόν θετική ή προσαρμοστική, προκειμένου να ανταποκριθεί σε διαφορετικά περιβαλλοντικά πλαίσια ή φυσιολογικές απαιτήσεις.

Αντίθετα, το γονίδιο *HSPA9* εμφανίζει υψηλό βαθμό συντηρητικότητας. Στη θέση CD:17, η τριπλέτα CTC παραμένει απολύτως σταθερή στα περισσότερα είδη, με μόλις δύο εξαιρέσεις την παρουσία της CGC στην Polar bear και της CAC στον Bolivian squirrel monkey. Το πρότυπο αυτό φανερώνει ότι το *HSPA9* διατηρεί μια εξαιρετικά σταθερή αλληλουχία σε ευρύ φάσμα θηλαστικών, στοιχείο που πιθανότατα αντανακλά τον κρίσιμο λειτουργικό του ρόλο και την ισχυρή εξελικτική πίεση για διατήρηση της ακεραιότητάς του.

Συνολικά, η παρατηρούμενη μικρή ετερογένεια για τα τέσσερα νουκλεοτίδια στο *HSPA6* και η συντηρητικότητα στο *HSPA9* συνιστούν ενδείξεις διαφοροποιημένων εξελικτικών μοτίβων. Το πρώτο φαίνεται να έχει υποστεί πιο έντονες προσαρμοστικές αλλαγές σε διαφορετικά είδη, ενώ το δεύτερο παραμένει σταθερό. Ωστόσο κανένα από τα δύο γονίδια, όπως και από τα υπόλοιπα ένδεκα, δεν έδειξε σημάδια έντονης φυσικής επιλογής. Όλα τα γονίδια της οικογένειας *Hsp70*, είναι εξαιρετικά συντηρημένα ανάμεσα στους οργανισμούς, κάτι που μπορεί να αιτιολογηθεί εξαιτίας των κρίσιμων ρόλων που διαθέτουν στην διατήρηση της κυτταρικής ομοιόστασης.

6.Βιβλιογραφία

- Anat Peres Ben-Zvi, P. G. (2001). Review: mechanisms of disaggregation and refolding of stable protein aggregates by molecular chaperones. *ournal of Structural Biology*.
- Andreas Bracher, J. V. (2015). The nucleotide exchange factors of Hsp70 molecular chaperones. *Frontiers in Molecular Biosciences*.
- Chen Hu, J. Y.-y. (2022). Heat shock proteins: Biological functions, pathological roles, and therapeutic opportunities. *MedComm*.
- Claes Andréasson, J. F.-A. (2008). Insights into the structural dynamics of the Hsp110–Hsp70 interaction reveal the mechanism for nucleotide exchange activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS)*.
- Clerico Eugenia M, T. J. (2015). How Hsp70 molecular machines interact with their substrates to mediate diverse physiological functions. *Journal of Molecular Biology*.
- D. M. Toivola, P. A. (2010). Intermediate filaments take the heat as stress proteins. *Trends in Cell Biology*, σσ. 79–91.
- Dwi Nur Happy Hariyono, P. W. (2022). Association of selected gene polymorphisms with thermotolerance traits in cattle – A review. *Animal Bioscience*.
- Dwi Nur Happy Hariyono, P. W. (2022). Association of selected gene polymorphisms with thermotolerance traits in cattle – A review. *Animal Bioscience*.
- Dwi Nur Happy Hariyono, P. W. (2022). Association of selected gene polymorphisms with thermotolerance traits in cattle – A review. *Animal Bioscience*.
- Evans K. Cheruiyot, M. H.-M. (2021, 8 17). New loci and neuronal pathways for resilience to heat stress in cattle. *Nature*.
- Graham Chakafana, T. Z. (2019). The Link That Binds: The Linker of Hsp70 as a Helm of the Protein's Function. *Biomolecules*.
- Holger Sondermann, e. a. (2001). Structure of a Bag/Hsc70 Complex: Convergent Functional Evolution of Hsp70 Nucleotide Exchange Factors. *Science*.
- Hongbo Lu, C. L. (2024). Genome-wide identification of the HSP70 genes in Pacific oyster *Magallana gigas* and their response to heat stress. *Cell Stress and Chaperones*.
- Howard Doong, A. V. (2002). What's in the 'BAG'? – a functional domain analysis of the BAG-family proteins. *Cancer Letters*.
- Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC). (2023). *Climate Change 2023: Synthesis Report – Summary for Policymakers*. Geneva, Switzerland: Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC).
- J Kruuv, D. G.-Q. (1983, 5). Factors influencing survival and growth of mammalian cells exposed to hypothermia. I. Effects of temperature and membrane lipid perturbers. *Journal of Cellular Physiology*.

- Karen D. Crow, G. P. (2006). What Is the Role of Genome Duplication in the Evolution of Complexity and Diversity? *Molecular Biology and Evolution*.
- Katoh, R. Y. (2019). MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. *Briefing in Bioinformatics*.
- Klaus Richter, M. J. (2010). The heat shock response: life on the verge of death. *Molecular Cell*, σσ. 253–266.
- Kohler V, A. C. (2020). Hsp70-mediated quality control: should I stay or should I go? *Biological Chemistry*.
- Kyle Hess, R. O. (2018). Concurrent action of purifying selection and gene conversion results in extreme conservation of the major stress-inducible Hsp70 genes in mammals. *Scientific Reports*.
- L. Chen, V. T. (2025). Modeling the effects of heat stress on production and enteric methane emission in high-yielding dairy herds. *Journal of Dairy Science*.
- Larsson, A. (2014). AliView: a fast and lightweight alignment viewer and editor for large datasets. *Bioinformatics*.
- MP Mayer, B. B. (2005). Hsp70 chaperones: Cellular functions and molecular mechanism. *Cellular and Molecular Life Sciences*.
- NOAA National Centers for Environmental Information (NCEI). (2025). *Climate at a Glance: Global Time Series*.
- Oliveira C. P., S. F. (2025). Heat Stress in Dairy Cows: Impacts, Identification, and Mitigation Strategies—A Review. *Animlas*.
- Oyeyemi O. Ajayi, e. a. (2018). Computational genome-wide identification of heat shock protein genes in the bovine genome. *F1000Research*.
- Rauch J. N, G. J. (2014). Binding of human nucleotide exchange factors to heat shock protein 70 (Hsp70) generates functionally distinct complexes in vitro. *Journal of Biological Chemistry (J. Biol. Chem.)*.
- Rauch, J. N. (2015). *Regulation of Human Hsp70 by its Nucleotide Exchange Factors (NEFs)*. Deep Blue Documents, University of Michigan Library.
- Roman Kityk, J. K. (2018). Molecular Mechanism of J-Domain-Triggered ATP Hydrolysis by Hsp70 Chaperones. *Molecular Cell*.
- Rosenzweig, R., Nillegoda, N. B., Mayer, M. P., & Bukau, B. (2019). The Hsp70 chaperone network. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*.
- Sachin Kotak, J. L.-D.-D. (2007, 6 3). Complexity of the heat stress response in plants. *Current Opinion in Plant Biology*.
- Sara I. Zandalinas, F. B. (2021, 3 18). Global Warming, Climate Change, and Environmental Pollution: Recipe for a Multifactorial Stress Combination Disaster. *Trends in Plant Science*.
- Sergei L. Kosakovsky Pond, S. D. (2005). Not So Different After All: A Comparison of Methods for Detecting Amino Acid Sites Under Selection. *Molecular Biology and Evolution*.
- Shomura, Y. D.-C. (2005). Regulation of Hsp70 function by HspBP1: structural analysis reveals an alternate mechanism for Hsp70 nucleotide exchange. *Molecular Cell*.

- Shuangming Yue, Z. W. (2020). Transcriptome Functional Analysis of Mammary Gland of Cows in Heat Stress and Thermoneutral Condition. *Animals*.
- Sigrun Polier, Z. D. (2008). Structural basis for the cooperation of Hsp70 and Hsp110 chaperones in protein folding. *Cell*.
- Silvio Miranda, C. S. (2017). Heat stress: Feeding strategies to maintain productive dairy cows. *Progressive Dairy Canada*.
- Suzuki, H., Ikeda, A., Tsuchimoto, S., Adachi, K.-i., Noguchi, A., Fukumori, Y., & Kanemori, M. (2012). Synergistic binding of DnaJ and DnaK chaperones to heat shock transcription factor σ^{32} ensures its characteristic high metabolic instability: implications for heat shock protein 70 (Hsp70)–Hsp40 mode of function. *Journal of Biological Chemistry*.
- Suzuki, H., Noguchi, S., Arakawa, H., Tokida, A., Hashimoto, M., & Satow, Y. (2010). Peptide-binding sites as revealed by the crystal structures of the human Hsp40 Hdj1 C-terminal domain in complex with the octapeptide from human Hsp70. *Biochemistry*.
- Young, J. C. (2010). Mechanisms of the Hsp70 chaperone system. *Biochemistry and Cell Biology*.