ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

ΜΑΡΙΑ ΚΑΛΕΜΚΕΡΙΔΟΥ

ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΜΟΡΙΑΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ

ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ

ΛΑΡΙΣΑ 2019

Επιλέγοντας τις θερμο-άντοχες αγελάδες : Από τις πρωτεΐνες θερμικού στρες και πέρα.

Selecting thermo-tolerant cows: From Heat stress proteins and beyond.

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Επιβλέπων καθηγητής

ΖΗΣΗΣ ΜΑΜΟΥΡΗΣ

Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών - Πρύτανης Π.Θ.

Μέλος

ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ ΜΟΥΤΟΥ

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιολογίας Σπονδυλωτών

Μέλος

ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ ΣΤΑΜΑΤΗΣ

Εργαστηριακό Διδακτικό Προσωπικό

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον κ. Μαμούρη Ζήση, Καθηγητή Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών και Πρύτανη του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, για την εμπιστοσύνη του στο πρόσωπο μου και τη δυνατότητα που μου έδωσε για την εκπόνηση της μεταπτυχιακής μου διατριβής στο εργαστήριο Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας. Ευχαριστώ πολύ επίσης την κα. Μούτου Αικατερίνη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιολογίας Σπονδυλωτών καθώς και τον κ. Σταμάτη Κωνσταντίνο, μέλος του εργαστηριακού διδακτικού προσωπικού, για τη συμμετοχή τους στην τριμελή συμβουλευτική επιτροπή. Ακόμα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Διδάκτορα Γιαννούλη Θεμιστοκλή για όλες τις χρήσιμες συμβουλές και την συνεχή βοήθεια και καθοδήγηση του σε όλη τη διάρκεια υλοποίησης της παρούσας εργασίας. Ένα μεγάλο ευχαριστώ σε όλα τα μέλη του εργαστηρίου «Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας» για το κλίμα συνεργασία και τη φιλική τους διάθεση. Τέλος, το μεγαλύτερο ευχαριστώ το οφείλω στους γονείς μου, Νίκο και Ιορδάνα, και στον αδερφό μου Στέλιο, που με υποστηρίζουν και είναι στο πλευρό μου σε κάθε μου βήμα.

Περίληψη

Από τα μέσα του 20ου αιώνα παρατηρούνται κλιματικές αλλαγές, οι οποίες χαρακτηρίζονται από συνεχώς αυξανόμενη περιβαλλοντική θερμοκρασία και παράταση του θέρους. Αυτή είναι και η κύρια αιτία για την πρόκληση της θερμικής καταπόνησης για τα ζώα παραγωγής και κυρίως για τις αγελάδες, που εκδηλώνεται κυρίως με μειωμένη παραγωγή γάλακτος αλλά και με υποχώρηση της γονιμότητας τους. Ωστόσο υπάρχουν κάποια ζώα του υπό μελέτη πληθυσμού τα οποία χαρακτηρίζονται ως θερμο-άντοχα, καθώς δεν δείχνουν να εκδηλώνουν τα συμπτώματα της θερμικής καταπόνησης σε μεγάλο βαθμό. Για να μελετηθεί η ανθεκτικότητα των οργανισμών σε αυτές τις συνθήκες επιλέχθηκαν 2 γονίδια, το γονίδιο HSP70A1A, που κωδικοποιεί για μια πρωτεΐνη θερμικής καταπόνησης με μοριακό βάρος 70kDa, και το γονίδιο ATP1A1, το οποίο κωδικοποιεί την ισομορφή α1 της υπομονάδας α της αντλίας Na^{+}/K^{+}. Τα γονίδια αυτά έχουν συσχετιστεί με την εμφάνιση ανθεκτικότητας στη θερμική καταπόνηση και υπάρχουν στη βιβλιογραφία SNP για το κάθε γονίδιο. Συγκεκριμένα για το HSP70A1A αναζητήθηκε ο πολυμορφισμός G/A στη νουκλεοτιδική θέση 1524, ενώ για το γονίδιο ATP1A1 ο πολυμορφισμός C/A που εντοπίζεται στη θέση 2789, στο εξώνιο 17. Οι τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν είναι ο συνδυασμός PCR-SSCP και ακολούθησε αλληλούχηση των ενισχυμένων με PCR τμημάτων DNA. Στην παρούσα μελέτη τα υπό μελέτη άτομα χωρίστηκαν σε δύο κατηγορίες, ως ανθεκτικά και μη ανθεκτικά άτομα του πληθυσμού, ανάλογα με την ικανότητα τους για γονιμοποίηση υπό τις συνθήκες της θερμικής καταπόνησης. Για το γονίδιο HSP70A1A δεν ανιχνεύτηκε ο πολυμορφισμός, ενώ για το γονίδιο ATP1A1 οι αλληλομορφικές συχνότητες για το αλληλόμορφο C και A είναι 0,90 και 0,10, καθώς και 0,91 και 0,09 για τα ανθεκτικά και τα μη ανθεκτικά άτομα, αντίστοιχα. Επιπλέον από τα αποτελέσματα της αλληλούχησης προέκυψαν κάποια επιπλέον SNPs. Συγκεκριμένα, για το γονίδιο HSP70A1A, εντοπίστηκαν 6 επιπλέον SNPs, ενώ για το γονίδιο ATP1A1 3 επιπλέον SNPs.

Λέξεις-κλειδιά : θερμική καταπόνηση, υπογονιμότητα, θερμοάντοχα ζώα, γονίδιο HSP70A1A, γονίδιο ATP1A1, πολυμορφισμός

Abstract

Climatic changes have been observed since the mid-20th century, characterized by a constantly increasing environmental temperature and a prolongation of the summer. This is the main cause of heat stress for cattle, which is shows up mainly by reduced milk production but also by the decline in fertility. However, there are some animals in the population that are characterized as thermo-tolerant, as they do not seem to present any symptom of heat stress. To study the resistance of organisms under these conditions, 2 genes were selected, the HSP70A1A gene coding for a 70kDa heat stress protein, and the ATP1A1 gene encoding the α1 isoform of the α subunit of the Na^{+}/K^{+}ATPase . These genes have been associated with the resistance to heat stress. There are some gene polymorphisms that are associated with thermo-tolerance. There is a G/A polymorphism at nucleotide position 1524 of HSP70A1A gene, and a C/A polymorphism localized at position 2789 in exon 17 of the ATP1A1 gene. The techniques that were applied was PCR-SSCP followed by sequencing of the amplified by PCR fragments of DNA. In the present study the population of cows was divided into two categories, as resistant and non-resistant individuals, depending on their ability to fertilize under the conditions of heat stress. The polymorphism of HSP70A1A gene was not detected, whereas the allele frequencies for the allele C and A are 0.90 and 0.10, and 0.91 and 0.09 for the resistant and non-resistant individuals, respectively for the polymorphism of the ATP1A1 gene. In addition, the results that came out from sequencing present extra SNPs in the genes that was examined. Specifically, for the HSP70A1A gene, 6 SNPs were identified, when were identified just 3 SNPs for the ATP1A1 gene.

Key-words : climatic changes, heat stress, thermo-tolerance, HSP70A1A gene, ATP1A1 gene, polymorphism

Περιεχόμενα

Πίνακας περιεχομένων εικόνων

Πίνακας περιεχομένων πινάκων

1. Εισαγωγή

Κτηνοτροφία ονομάζεται ο κλάδος της οικονομίας που αφορά τόσο την εκτροφή όσο και την εκμετάλλευση των παραγωγικών ζώων. Ο κλάδος αυτός αποτελεί μία από τις πιο παλιές δραστηριότητες του ανθρώπου η οποία εξελίχθηκε ραγδαία στο πέρασμα των χρόνων στην προσπάθειά του να εξασφαλίσει την απαραίτητη ποσότητα τροφής. Καθώς η σημασία των παραγόμενων προϊόντων εμφάνισε την τάση για συνεχόμενη αύξηση, δημιουργήθηκαν όλο και περισσότερες κτηνοτροφικές εκμεταλλεύσεις. Η βιωσιμότητα των κτηνοτροφικών εκμεταλλεύσεων δημιουργεί ανάπτυξη στον πρωτογενή τομέα, νέες θέσεις εργασίας και κατά συνέπεια περαιτέρω ανάπτυξη στους τομείς του εμπορίου και των εξαγωγών, που ενδιαφέρουν τον κλάδο της οικονομίας. Ωστόσο η βιωσιμότητα των κτηνοτροφικών εκμεταλλεύσεων είναι αποτέλεσμα και άλλων παραγόντων που πρέπει να λαμβάνονται υπόψη όπως η διατροφή, η επιλογή του κατάλληλου συστήματος εκτροφής και της φυλής καθώς και οι συνθήκες περιβάλλοντος. Είναι σημαντικό λοιπόν να εξασφαλίζονται οι κατάλληλες συνθήκες, όσο εκτροφής τόσο και περιβάλλοντος, έτσι ώστε να υπάρχει μια ισορροπία στην παραγωγική δραστηριότητα, αλλά και βελτίωση της στην πάροδο του χρόνου.

Τα βοοειδή αποτελούν ένα πολύ σημαντικό πληθυσμό στο σύνολο των παραγωγικών ζώων που εκτρέφονται σε παγκόσμιο επίπεδο, και αποτελούν σημαντική πηγή εσόδων και στην χώρα μας. Εκτρέφονται κυρίως για την παραγωγή γάλακτος αλλά και κρέατος, και γίνονται συνεχώς προσπάθειες βελτίωσης των παραμέτρων εκτροφής τους για να εξασφαλιστεί αύξηση στην παραγωγική δραστηριότητα τους.

1.1. Bos taurus (domesticated cattle)

Η αγελάδα (Bos taurus), όπως και τα περισσότερα οικόσιτα ζώα βρίσκεται γεωγραφικά κατανεμημένη σε ολόκληρο τον κόσμο. Οι άγριοι πρόγονοι των αγελάδων βρίσκονταν στη βόρεια Αφρική, την Ευρώπη και τη νότια Ασία (Nowak, 1997).

Τα βοοειδή γεννιούνται και εκτρέφονται σε χερσαίες περιοχές, οι οποίες είναι άγονες, δεν καλλιεργούνται και επίσης δεν ποτίζονται. Οι περιοχές αυτές θα πρέπει να έχουν επαρκείς χώρους για τη βόσκηση των ζώων.

Ανήκουν στην κατηγορία με τα μεγάλα και πολύ ανθεκτικά ζώα. Το βάρος τους κυμαίνεται από 147 κιλά έως 1363 κιλά και το ύψος τους από 124 έως 132 εκατοστά (49-52 ίντσες). Το σώμα τους καλύπτεται από κοντές τρίχες, με χρώμα που ποικίλλει από μαύρο έως λευκό, κοκκινωπό καφέ και καφέ.

Τα ζώα αυτά είναι κοινωνικά και ζουν σε ομάδες που ονομάζονται αγέλες. Κάθε κοπάδι οδηγείται από ένα και μοναδικό κυρίαρχο αρσενικό. (Hinshaw, 1993). Η αναπαραγωγή μπορεί να συμβεί όλο το χρόνο, αν και περισσότεροι απόγονοι γεννιούνται τους μήνες της άνοιξης. Ένα μοσχάρι γεννιέται μετά από περίπου εννέα μήνες κύησης. Τα θηλυκά άτομα φθάνουν σε σεξουαλική ωριμότητα σε περίπου ένα έτος ζωής και η ικανότητα ζευγαρώματος μπορεί να συνεχιστεί για περίπου δώδεκα χρόνια.

Τα βοοειδή χρησιμοποιούνται ευρέως από τον άνθρωπο για διάφορους σκοπούς, για αυτό και έχουν ιδιαίτερη οικονομική σημασία για αυτόν. Οι αγελάδες χρησιμοποιούνται κυρίως για την παραγωγή γαλακτοκομικών προϊόντων όπως είναι το γάλα και το τυρί και επίσης για το κρέας τους.

Όσον αφορά τις φυλές των βοοειδών, έχουν αναγνωριστεί παγκοσμίως πάνω από 1000 φυλές, από τις οποίες ορισμένες έχουν την ικανότητα να προσαρμόζονται στο τοπικό κλίμα, και άλλες που έχουν εκτραφεί από ανθρώπους για εξειδικευμένες χρήσεις. Οι φυλές των βοοειδών εμπίπτουν σε δύο βασικές κατηγορίες, οι οποίες θεωρούνται είτε δύο στενά συγγενικά είδη, είτε δύο υποείδη ενός είδους. Τα βοοειδή Bos indicus (ή Bos taurus indicus), συνήθως αποκαλούμενα zebu, είναι προσαρμοσμένα σε θερμά κλίματα και προέρχονται από τα τροπικά μέρη του κόσμου, όπως η υποσαχάρια Αφρική, η Ινδία, η Κίνα και η Νοτιοανατολική Ασία. Τα βοοειδή Bos taurus (ή Bos taurus taurus) είναι γενικά προσαρμοσμένα σε ψυχρότερα κλίματα και περιλαμβάνουν σχεδόν όλες τις φυλές βοοειδών που προέρχονται από την Ευρώπη, την περιοχή της Μεσογείου καθώς και τη βόρεια Ασία.

1.1.1. Συστηματική κατάταξη της αγελάδας

Η επιστημονική ταξινόμηση της αγελάδας παρουσιάζεται στον παρακάτω πίνακα (πίνακας 1) :

Πίνακας 1 : Η επιστημονική ταξινόμηση της αγελάδας

Βασίλειο	Animalia
Φύλο (ή Συνομοταξία)	Chordata
Κλάση (ή Ομοταξία)	Mammalia
Τάξη	Artiodactyla
Οικογένεια	Bovidae
Υποοικογένεια	Bovinae
Γένος	Bos
Είδος	B.taurus

1.1.2. Η εκτροφή των βοοειδών και η σημασία της για τον άνθρωπο

Η κτηνοτροφία είναι μία από τις πιο παλιές δραστηριότητες του ανθρώπου, στην προσπάθειά του να εξασφαλίζει την απαραίτητη ποσότητα τροφής, έτσι ώστε να καλύπτει τις ανάγκες του. Συγκεκριμένα, βοοτροφία ορίζεται ο κλάδος της κτηνοτροφίας ο οποίος έχει ως αντικείμενο την εκτροφή κυρίως των βοοειδών και βουβαλιών για την παραγωγή γάλακτος, κρέατος και δέρματος. Στην Ελλάδα εκτρέφονται περίπου 730.000 βοοειδή, εκ των οποίων τα 200.000 περίπου είναι γαλακτοπαραγωγής, τα 430.000 είναι κρεατο-παραγωγής και υπόλοιπα 100.000 είναι μικτής παραγωγής. Είναι ένας κλάδος με ιδιαίτερη σημασία για την εθνική μας οικονομία, για αυτό και γίνονται συνεχείς προσπάθειες για ενίσχυση των κοπαδιών και εξασφάλιση συνθηκών επιβίωσης για τα ζώα τέτοιων ώστε να αυξάνεται η αποδοτικότητα τους.

1.2. Heat Stress (HS)

Οι καιρικές συνθήκες που επικρατούν σε μια περιοχή γενικά ή για μεγάλο χρονικό διάστημα ονομάζεται κλίμα, το οποίο αποτελεί συνδυασμό διαφόρων στοιχείων που περιλαμβάνουν τη θερμοκρασία, την υγρασία, τις βροχοπτώσεις, την κίνηση του αέρα, την ακτινοβολία, τη βαρομετρική πίεση και τον ιονισμό (Ramendra Das et al, 2015). Η υπερθέρμανση του πλανήτη έχει οδηγήσει σε αύξηση της θερμοκρασίας της επιφάνειας περίπου 0,7°C από τις αρχές του 20ού αιώνα, και αναμένεται ότι η αύξηση της θερμοκρασίας θα είναι συνολικά 1,8 έως 4°C μέχρι το 2100. Το φαινόμενο αυτό και η αλλαγή του κλίματος έχουν γίνει η κύρια απειλή για τη βιωσιμότητα των συστημάτων κτηνοτροφίας σε παγκόσμιο επίπεδο. Σε τροπικές και υποτροπικές περιοχές η υψηλή θερμοκρασία περιβάλλοντος είναι ο κύριος περιορισμός για τα ζώα παραγωγής. Οι περιβαλλοντικές αλλαγές , ως συνέπεια της αλλαγής του κλίματος, επηρεάζουν σε μεγάλο βαθμό την παραγωγικότητά, την αναπαραγωγική αποτελεσματικότητα καθώς και την υγεία των ζωικών οργανισμών, που τελικά οδηγεί σοβαρές οικονομικές απώλειες.

1.2.1. Τι ορίζεται ως θερμική καταπόνηση

Η θερμική καταπόνηση (heat stress - HS) ορίζεται ως το άθροισμα των εξωγενών δυνάμεων που δρουν σε ένα ζώο και προκαλεί αύξηση της θερμοκρασίας του σώματος που έχει ως αποτέλεσμα μια άμεση φυσιολογική αντίδραση. Η υπερβολική ροή ενέργειας στο σώμα, πέρα από την εξάντληση της ενέργειας που απαιτείται για την παραγωγή γάλακτος και την ανάπτυξη, μπορεί να οδηγήσει σε επιδείνωση των συνθηκών διαβίωσης, μειωμένη ποιότητα ζωής και σε κάποιες ακραίες περιπτώσεις , ακόμα και θάνατο, εκτός αν το ζώο μπορεί να ενεργοποιήσει διάφορους προσαρμοστικούς μηχανισμούς για την αύξηση της εξωτερικής καθαρής ροής ενέργειας . Ο βαθμός της θερμικής καταπόνησης επηρεάζεται από τις συνδυασμένες επιδράσεις της αυξημένης περιβαλλοντικής θερμοκρασίας, της υγρασίας, της ηλιακής ακτινοβολίας καθώς και της ταχύτητας του αέρα.

1.2.2. Αίτια εκδήλωσης θερμικής καταπόνησης (HS)

- Η θερμική καταπόνηση εμφανίζεται όταν το θερμικό φορτίο ενός ζώου είναι μεγαλύτερο από την ικανότητά του να χάνει θερμότητα. Οι αγελάδες βιώνουν το αίσθημα της ζέστης 10°C έως 15°C χαμηλότερα συγκριτικά με τον άνθρωπο.
- Η υψηλή θερμοκρασία του αέρα (>21^{o}C), η υγρασία (>70%), η ηλιακή ακτινοβολία και η χαμηλή κίνηση αέρα συμβάλλουν σε αυξημένο κίνδυνο για τα ζώα.
- Η υψηλή σχετική υγρασία μειώνει την εξάτμιση και μειώνει την ικανότητα της αγελάδας να χάνει θερμότητα με εφίδρωση και αναπνοή.
- Οι αγελάδες ακτινοβολούν θερμότητα κατά τη διάρκεια της νύχτας στο πιο δροσερό περιβάλλον. Σε ζεστές νεφελώδεις νύχτες μειώνεται η ψύξη των ζώων, αυξάνοντας έτσι τον κίνδυνο εκδήλωσης θερμικής καταπόνησης.

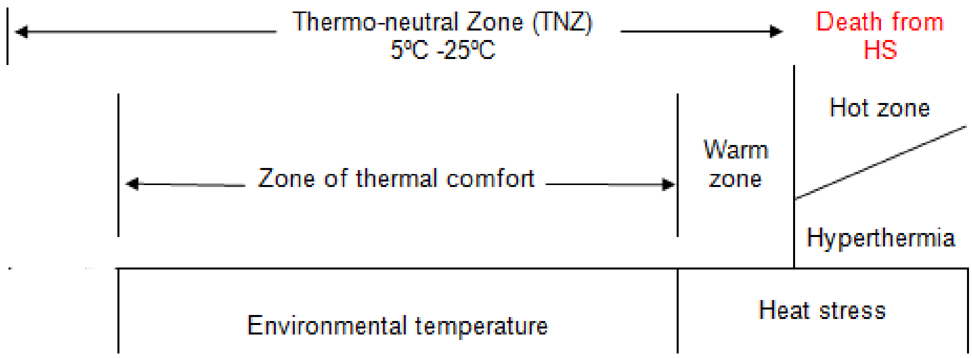
1.2.3. Συμπτώματα εκδήλωσης θερμικής καταπόνησης (HS)

Όπως και οι άνθρωποι, έτσι και οι αγελάδες πιθανόν εμφανίζουν πονοκεφάλους, ευερεθιστότητα και λήθαργο σε υψηλή σωματική θερμοκρασία και σε ανεπαρκή κάλυψη των αναγκών τους σε νερό. Για να αντιμετωπιστεί η θερμότητα, οι αγελάδες χρησιμοποιούν μια ποικιλία στρατηγικών όπως είναι οι εξής :

- αυξημένο ρυθμό αναπνοής και εφίδρωση
- αυξημένη πρόσληψη νερού
- μείωση της πρόσληψης τροφής
- μείωση της παραγωγής γάλακτος
- μεταβολή της σύνθεσης γάλακτος
- αλλαγή συμπεριφοράς:
    - αναζήτηση σκιάς
    - οργάνωση σε πλήθος για να σκιάζει ο ένας τον άλλον
    - αλλαγή προσανατολισμού στον ήλιο
    - στάση στο νερό ή δίπλα από τις δεξαμενές νερού

1.2.4. Θερμο-ουδέτερη ζώνη (ThermoNeutral Zone - TNZ)

Η θερμο-ουδέτερη ζώνη (TNZ) ορίζεται ως την περίπτωση που το ζώο δεν έχει την ανάγκη να καταναλώνει ενέργεια έτσι ώστε να διατηρεί τη φυσιολογική θερμοκρασία του σώματος για την ομοιόσταση και αντιπροσωπεύει την απάντηση του οργανισμού στα κατάλληλα ερεθίσματα που τείνουν να διαταράξουν την ομοιόσταση. Σε θερμοκρασίες μεταξύ των 5°C και 25°C για τα περισσότερα ζώα δεν παρατηρείται καμία αλλαγή, ωστόσο σε θερμοκρασίες που υπερβαίνουν τους 25°C θα έχει ως αποτέλεσμα την εκδήλωση των συμπτωμάτων της θερμικής καταπόνησης. Η θερμορρύθμιση είναι η διαδικασία με την οποία οι ζωικοί οργανισμοί διατηρούν μια ισορροπία μεταξύ των μηχανισμών παραγωγής θερμότητας και αυτών της απώλειας θερμότητας από το σώμα τους, ώστε να διατηρούν μια σχετικά σταθερή θερμοκρασία σώματος, ανεξάρτητα της θερμοκρασίας του εξωτερικού περιβάλλοντος.



Πηγή εικόνας : Προσαρμοσμένη εικόνα από Soumya Dash et al, 2016

Εικόνα 1 : Οι διαφορετικές θερμοκρασιακές ζώνες που εμφανίζονται στην θερμική καταπόνηση.

1.2.5. Δείκτες εκτίμησης βαθμού θερμικής καταπόνησης

Για την εκτίμηση του βαθμού της θερμικής καταπόνησης γίνεται μέτρηση κυρίως 2 δεικτών, οι οποίοι είναι οι εξής :

- THI (Temperature Humidity Index - Δείκτης Θερμοκρασίας/Υγρασίας)
  Ο δείκτης αυτός χρησιμοποιείται ευρέως στα βοοειδή, καθώς αποτελεί την πιο αξιόπιστη μέτρηση για την εκτίμηση της θερμικής καταπόνησης και σε αρκετές περιπτώσεις και για την πρόληψη εκδήλωσης της.
- Twb (Wet Bulb Temperature)
  Ο δείκτης αυτός ορίζεται ως η θερμοκρασία ενός τμήματος του αέρα που ψύχεται μέχρι κορεσμό (100% σχετική υγρασία) με την εξάτμιση νερού σε αυτό με τη λανθάνουσα θερμότητα που παρέχεται στο τμήμα αυτό.

Όσον αφορά τον δείκτη THI, ο Armstrong ταξινόμησε τις τιμές του σε πέντε διαφορετικές κατηγορίες (Soumya Dash et al, 2016) οι οποίες είναι :

- THI < 72, καμία επίδραση στον οργανισμό
- THI = 72-78, ήπιο άγχος
- THI = 79-88, μέτριο άγχος
- THI = 89-98, έντονο στρες
- THI > 98, θάνατος ζώου

Όπως φαίνεται και στον παρακάτω πίνακα (πίνακας 2), κάθε κατηγορία από αυτές που όρισε ο Armstrong εκδηλώνει και διαφορετικά συμπτώματα στη συμπεριφορά και τη φυσιολογία του οργανισμού.

Πίνακας 2 : Τιμές THI και συμπτώματα στα βοοειδή

THI	Επίπεδο στρες	Συμπτώματα
<72	Καμία επίδραση	- βέλτιστη παραγωγική και αναπαραγωγική δραστηριότητα
72-78	Ήπιο στρες	- αναζήτηση σκιερού μέρους και αύξηση ρυθμού αναπνοής
79-88	Μέτριο στρες	- αύξηση ρυθμού αναπνοής και έκκρισης σάλιου - μείωση πρόσληψης τροφής και κατανάλωσης νερού - αύξηση θερμοκρασίας σώματος - μείωση των αναπαραγωγικών επιδόσεων των βοοειδών
89-98	Έντονο στρες	- ταχεία αύξηση ρυθμού αναπνοής και σιέλωσης - σημαντικά μειωμένες αναπαραγωγικές επιδόσεις στα βοοειδή
>99	Κίνδυνος	- ακραίο στρες - υψηλή πιθανότητα θανάτου του ζώου

THI = Temperature humidity index

Πηγή πίνακα : Μεταφρασμένος πίνακας από Soumya Dash et al, 2016

1.2.6. Προβλήματα από αλλαγή της θερμοκρασίας

Το θερμικό στρες έχει αρνητικές επιπτώσεις στην παραγωγή γάλακτος καθώς και στην αναπαραγωγή. Ο Hansen (2007) αναφέρει το πρόβλημα της θερμικής καταπόνησης ως αυξανόμενο καθώς οι αυξανόμενες αποδόσεις γάλακτος έχουν ως αποτέλεσμα την μεγαλύτερη μεταβολική παραγωγή θερμότητας αλλά επίσης και λόγω των αναμενόμενων αλλαγών στο κλίμα, σε παγκόσμιο επίπεδο. Η ανθεκτικότητα των αγελάδων γαλακτοπαραγωγής σε υψηλές θερμοκρασίες μειώνονται κατά τη διάρκεια γαλουχίας λόγω της αύξησης παραγωγής της εσωτερικής μεταβολικής θερμότητας που συνδέεται με την υψηλή πρόσληψη τροφής, καθώς επίσης και τη σύνθεση του γάλακτος. Η αναπαραγωγική απόδοση των αγελάδων υπό την επίδραση της υψηλής περιβαλλοντικής θερμοκρασίας επηρεάζεται λόγω της επιβλαβούς δράσης της θερμικής καταπόνησης στη γονιμοποίηση και την επιβίωση του εμβρύου (Ricardo C Chebel et al, 2003).

Με βάση τα προβλήματα που προκύπτουν σε καταστάσεις υψηλής θερμοκρασίας, υπάρχει μεγάλη ανάγκη για την επιλογή θερμο-ανθεκτικών ζώων από το συνολικό πληθυσμό, καθώς αυτό αποτελεί τον πιο αποτελεσματικό τρόπο για τη βελτίωση της παραγωγικότητας των βοοειδών. Για να είναι εφικτό αυτό, είναι απαραίτητο να εντοπιστούν τα κατάλληλα γονίδια που σχετίζονται με την θερμική καταπόνηση.

1.2.7. Θερμο-ανθεκτικότητα (Θερμο-αντοχή)

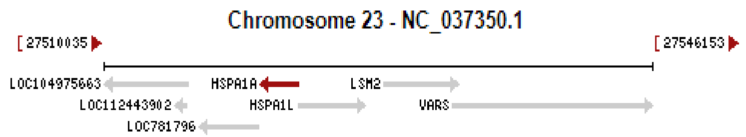
Ως θερμο-ανθεκτικότητα ορίζεται η ικανότητα των ζωικών οργανισμών να αναπτύσσουν μηχανισμούς άμυνας απέναντι στις επιπτώσεις της υψηλής περιβαλλοντικής θερμοκρασίας. Σε περιπτώσεις όπου η θερμοκρασία του αέρα είναι αυξημένη, το ζώο παρουσιάζει χαμηλούς ρυθμούς μεταβολισμού, οι οποίοι προκύπτουν από τους μειωμένους ρυθμούς ανάπτυξης και απόδοσης γάλακτος, και αποτελεί έναν σημαντικό παράγοντα που συμβάλλει στην θερμο-ανθεκτικότητα (Hansen, 2007). Οι ιδιότητες του δέρματος εξηγούν ένα μεγάλο μέρος της θερμο-ανθεκτικότητας των βοοειδών. Έχει διαπιστωθεί ότι η αντίσταση που ασκούν οι ιστοί στη ροή της θερμότητας από τον πυρήνα μέχρι το δέρμα επηρεάζεται από την υψηλή περιβαλλοντική θερμοκρασία (Hansen, 2007). Στα βοοειδή έχει αναφερθεί ως ένας επιπλέον παράγοντας που επηρεάζει την θερμο-ανθεκτικότητα του οργανισμού η πυκνότητα, το μέγεθος και επιπλέον η σχετική θέση των ιδρωτοποιών αδένων με την επιφάνεια του δέρματος. Η μεγάλη πυκνότητα, το μεγάλο μέγεθος και η πιο κοντινή θέση των ιδρωτοποιών αδένων στο δέρμα εξασφαλίζει μεγαλύτερη θερμο-ανθεκτικότητα στον οργανισμό. Ωστόσο δεν υπάρχει ξεκάθαρη εξήγηση του μηχανισμού που αφορά τους ιδρωτοποιούς αδένες (Hansen, 2004). Έχουν βρεθεί μεταλλάξεις στα γονίδια που σχετίζονται με την θερμική καταπόνηση, όπως είναι το γονίδιο που κωδικοποιεί για την HSP70, με αναφορές για καλύτερη προσαρμογή των ζώων σε υψηλή περιβαλλοντική θερμοκρασία, καθώς και θερμο-ανθεκτικότητα.

1.2.8. Γονίδια που συσχετίστηκαν με την θερμική καταπόνηση

Όταν τα ζώα εκτροφής εκτίθενται σε περιβαλλοντική καταπόνηση υπάρχουν πρωτεΐνες που κατά προτίμηση εκφράζονται κάτω από αυτές τις συνθήκες, όπως είναι οι πρωτεΐνες θερμικής καταπόνησης (HSP). Οι πρωτεΐνες θερμικής καταπόνησης (HSP) είναι τα καλύτερα προσαρμοσμένα παραδείγματα γονιδίων των οποίων η έκφραση επάγεται από τη θερμική καταπόνηση. Είναι φανερό τα τελευταία χρόνια ότι η θερμική καταπόνηση οδηγεί επίσης στην επαγωγή ενός σημαντικού αριθμού γονιδίων που δεν ανήκουν παραδοσιακά στα γονίδια που κωδικοποιούν για τις πρωτεΐνες αυτές (HSP). Περίπου 50 γονίδια που ανήκουν σε αυτή την κατηγορία γονιδίων, στα οποία συμπεριλαμβάνονται τα γονίδια ATP1A1, ATP1B2, έχουν βρεθεί ότι υφίστανται μεταβολές στην έκφραση τους σε απόκριση θερμικής καταπόνησης (Sonna et al., 2002).

1.2.8.1. Το γονίδιο HSP70A1A ή HSPA1A

Το γονίδιο αυτό, με GeneID 282254 και μέγεθος 2474bp, χαρτογραφείται στο χρωμόσωμα 23 (23q22) των βοοειδών και κωδικοποιεί για μια πρωτεΐνη θερμικής καταπόνησης (HSP) με μέγεθος 70kDa.Στο γονίδιο αυτό υπάρχει 1 εξώνιο.

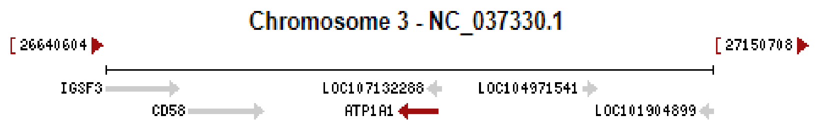


Πηγή εικόνας : ncbi (gene) για γονίδιο με GeneID 282254

Εικόνα 2 : Η θέση του γονιδίου HSPA1A στο χρωμόσωμα 23 των βοοειδών

1.2.8.2. Το γονίδιο ATP1A1

Το γονίδιο ATP1A1, με GeneID 282144 και μέγεθος 3746bp, χαρτογραφείται στο χρωμόσωμα 3 των βοοειδών και κωδικοποιεί για την ισομορφή α1, την κύρια ισομορφή της υπομονάδας α του ενζύμου Na+/K+-ATPase. Συνολικά, το γονίδιο αποτελείται από 23 εξώνια.



Πηγή εικόνας : ncbi (gene) για γονίδιο με GeneID 282144

Εικόνα 3 : Η θέση του γονιδίου ATP1A1 στο χρωμόσωμα 3 των βοοειδών

1.2.9. Πρωτεΐνες θερμικής καταπόνησης (HSP) και η λειτουργία τους

Οι πρωτεΐνες θερμικής καταπόνησης (HSP) είναι ένας σημαντικός βιο-δείκτης ο οποίος παράγεται ως μηχανισμός άμυνας των κυττάρων και των ιστών, η έκφραση των οποίων αυξάνεται σημαντικά κατά τη διάρκεια της θερμικής καταπόνησης (HS).

Η έκφραση των γονιδίων που σχετίζονται με την θερμο-ανθεκτικότητα, όπως επίσης και τα αυξημένα επίπεδα των HSP, είναι η κύρια απόκριση μέσω της οποίας το κύτταρο δύναται να αντισταθεί στις επιπτώσεις της θερμικής καταπόνησης. Οι HSP είναι από τις κυτταρικές πρωτεΐνες που βρέθηκαν σε αφθονία ακόμα και σε συνθήκες μη θερμικής καταπόνησης. Η υπερέκφραση των HSP προσδίδει προστασία στους οργανισμούς σε καταστάσεις στρες, όπως είναι και η υπερθερμία. Οι HSP έχουν επίσης ρόλο πρωτεϊνών-συνοδών (chaperones).

Οι πρωτεΐνες θερμικής καταπόνησης είναι πρωτεΐνες που εμφανίζουν υψηλή συντήρηση και ενεργοποιούνται από παράγοντες άγχους, όπως είναι και η υψηλή περιβαλλοντική θερμοκρασία, και λειτουργούν ως μοριακοί συνοδοί που προσδίδουν την ικανότητα στα κύτταρα να επιβιώσουν την θερμική καταπόνηση.

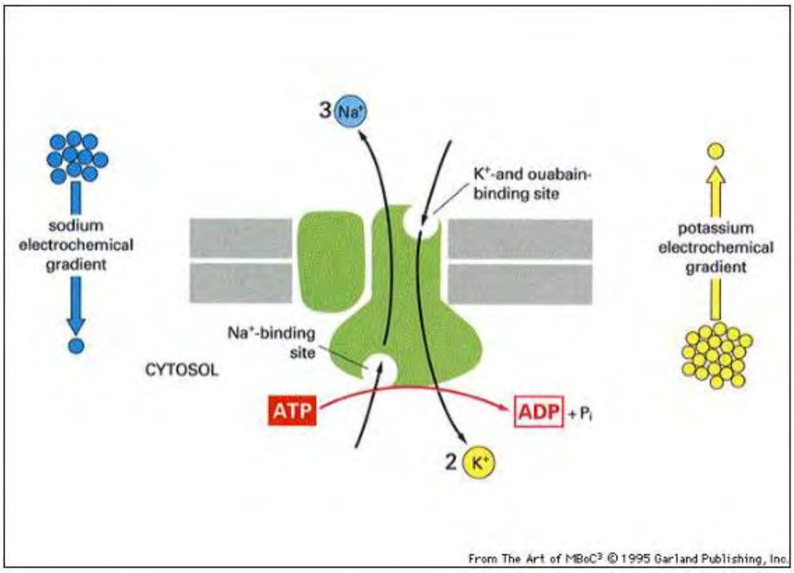
Μία από τις βασικές φυσιολογικές λειτουργίες που σχετίζονται με την επαγόμενη από το στρες συσσώρευση της πρωτεΐνης HSP70 είναι η επίκτητη θερμο-ανθεκτικότητα. Αυτή ορίζεται ως η ικανότητα ενός κυττάρου ή γενικευμένα ενός οργανισμού να καταστεί ανθεκτικός σε συνθήκες θερμικής καταπόνησης μετά από έκθεση σε υψηλή περιβαλλοντική θερμοκρασία που έχει προηγηθεί. Η HSP70 έχει προταθεί ότι λειτουργεί ως δείκτης της θερμο-ανθεκτικότητας στα κύτταρα. Αυξημένα επίπεδα HSP έχουν αναφερθεί κατά την έκθεση σε διαφορετικές περιβαλλοντικές συνθήκες, όπου μεταξύ άλλων είναι η υψηλή περιβαλλοντική θερμοκρασία, αλλά επίσης και η χαμηλή θερμοκρασία, η εμφάνιση λοίμωξης και φλεγμονής, η έντονη άσκηση, η έκθεση του κυττάρου σε τοξίνες, η υποξία (στέρηση οξυγόνου) ή η στέρηση νερού.

1.2.10. Το ένζυμο Na+/K+-ATPase

Το ένζυμο NA+/K+ATPase είναι μία ολιγομερής πρωτεΐνη η οποία αποτελείται από υπομονάδες-α και υπομονάδες-β, και αποτελεί ένα αναπόσπαστο ένζυμο της μεμβράνης των κυττάρων των ανώτερων οργανισμών. Το ένζυμο έχει σαν βασική λειτουργία τη διατήρηση της διαβάθμισης των ιόντων Na+ και K+ διαμέσου της πλασματικής μεμβράνης των κυττάρων στα θηλαστικά. Αυτές οι διαβαθμίσεις είναι απαραίτητες για τη μεταφορά μιας ποικιλίας οργανικών και ανόργανων μορίων μαζί με τα ιόντα Na+ και για την ηλεκτρική διεγερσιμότητα των νεύρων και των μυών. Στη μεμβράνη του πλάσματος, οι μεταβολές ιόντων που σχηματίζονται από το ένζυμο Na+/K+-ATPase είναι απαραίτητες για τη μεταφορά μεταβολιτών, θρεπτικών ουσιών και ιόντων μαζί με τα ιόντα Na+ και αντιπροσωπεύουν ένα υποψήφιο γονίδιο μελέτης για τα χαρακτηριστικά θερμο-ανθεκτικότητας (Geering et al., 1987). Είναι υπεύθυνο για τον έλεγχο του όγκου των κυττάρων και της βασικής χρήσης της ενέργειας, όπως επίσης και για την πρόσληψη της γλυκόζης και των αμινοξέων. Η δράση της ATPάσης ρυθμίζεται με διαφορετικούς τρόπους, ένας από τους οποίους είναι φωσφορυλίωση της υπομονάδας α η οποία αποτελεί έναν τρόπο άμεσης ρύθμισης. Στους τρόπους ρύθμισης ανήκει και η διαφοροποίηση των ενδοκυτταρικών συγκεντρώσεων των ιόντων Na+, καθώς και η άμεση αναστολή μέσω της σύνδεσης ενδογενών αναστολέων του ενζύμου.

Η Na+/K+ATPase είναι ένα ετεροδιμερές που αποτελείται από 2 διαφορετικές υπομονάδες, τις υπομονάδες α και β, σε ισομοριακές ποσότητες. Η υπομονάδα α, η οποία έχει μοριακό βάρος 112kDa και ρυθμίζει την καταλυτική δραστικότητα. Περιλαμβάνει θέσεις ενδοκυτταρικής σύνδεσης ATP και ιόντων Na+ , θέσεις εξωκυτταρικής σύνδεσης ιόντων K+, καθώς επίσης και θέση φωσφορυλίωσης. Έχει μεγάλο μέγεθος της και υδρόφοβο χαρακτήρα. Στην υπομονάδα α υπάρχουν συνήθως 6-10 διαμεμβανικές περιοχές, εξωκυτταρικές καθώς και κυτταροπλασματικές περιοχές. Η υπομονάδα β είναι υπεύθυνη τόσο στο σχηματισμό του διμερούς α/β όσο και στην επακόλουθη μεταφορά του ολοενζύμου στην πλασματική μεμβράνη. Στη υπομονάδα β εντοπίζονται 1-4 διαμεμβρανικές περιοχές, εξωκυτταρικές περιοχές, οι οποίες αποτελούν το μεγαλύτερο τμήμα της υπομονάδας, και κυτταροπλασματικές περιοχές στις οποίες υπάρχει μικρό υδρόφιλο τμήμα και αμινοτελική περιοχή.

Η αρχική ενεργοποίηση της αντλίας γίνεται με την σύνδεση των ιόντων Na^+ στο ενδοκυτταρικό τμήμα της αντλίας και ακολουθεί υδρόλυση του ATP. Η αντλία αυτή απαιτεί ενέργεια και επίσης λειτουργεί με ανοδική κατεύθυνση, δηλαδή από χαμηλή προς υψηλή συγκέντρωση των ιόντων. Στη δράση της αντλίας συμβαίνει φωσφορυλίωση και απόφωσφορυλίωση, και συνεπώς αν εμποδιστεί κάποιο βήμα, αναστέλλεται ολόκληρος ο κύκλος δράσης της. Σε αυτή την περίπτωση η συγκέντρωση των ενδοκυτταρικών ιόντων Na^+ αυξάνεται.



Πηγή εικόνας : The art of MBOC 3 : the complet set of figures from Molecular biology of the cell, Garland, 1996

Εικόνα 4 : Η δράση της αντλίας Na^+/K^+ και η ροή των ιόντων.

Τα βήματα δράσης της αντλίας αυτής είναι τα εξής :

- Η σύνδεση των ιόντων Na στο ενδοκυτταρικό τμήμα της αντλίας γίνεται μετά από τη δέσμευση του ATP, όπως αναφέρθηκε, και ακολουθεί η υδρόλυση του, με την οποία φωσφορυλιώνεται το ένζυμο. Αυτό συνεπάγεται τη μεταβολή της διαμόρφωσης και το κλείσιμο της εσωτερικής οπής, και συνεπώς δεν είναι δυνατή η περαιτέρω σύνδεση των ιόντων Na+, τα οποία απελευθερώνονται προς το εξωτερικό του κυττάρου. Αυτό συμβαίνει καθώς η φωσφορυλιωμένη μορφή της αντλίας έχει χαμηλή συγγένεια για τα ιόντα Na^+.
- Αφού τα ιόντα Na^+ απελευθερωθούν εξωτερικά του κυττάρου, δημιουργούνται επιφάνειες, όπου προσδένονται τα ιόντα K^+. Η πρόσδεση των ιόντων ακολουθείται από αποφωσφορυλίωση η οποία προκαλεί αλλαγή της διαμόρφωσης στην προηγούμενη κατάσταση με αποτέλεσμα να απελευθερώνονται τα ιόντα K^+ στο εσωτερικό του κυττάρου. Αυτό γίνεται καθώς η μη φωσφορυλιωμένη μορφή της αντλίας έχει μεγαλύτερη συγγένεια για τα ιόντα Na^+ από τα ιόντα K^+.

1.3. Μοριακά εργαλεία

1.3.1. PCR - Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) είναι μια τεχνική που χρησιμοποιείται στη μοριακή βιολογία για την ενίσχυση ενός μόνο αντιγράφου ή μερικών αντιγράφων ενός τμήματος DNA δημιουργώντας χιλιάδες έως εκατομμύρια αντίγραφα μίας συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA. Είναι ένας εύκολος, φθηνός και αξιόπιστος τρόπος να πολλαπλασιαστεί επανειλημμένα ένα συγκεκριμένο τμήμα του DNA.
Η PCR ενισχύει μια συγκεκριμένη περιοχή ενός κλώνου του DNA-στόχου. Οι περισσότερες μέθοδοι PCR ενισχύουν τμήματα DNA μεταξύ 0,1 και 10 kbp, αν και μερικές τεχνικές επιτρέπουν την ενίσχυση τμημάτων μεγέθους έως 40 kbp. Η ποσότητα του ενισχυμένου προϊόντος προσδιορίζεται από τα διαθέσιμα υποστρώματα στην αντίδραση, τα οποία περιορίζονται καθώς εξελίσσεται η αντίδραση.
Τα συστατικά και τα αντιδραστήρια που απαιτεί μια αντίδραση PCR:

- Ένα πρότυπο DNA που περιέχει την περιοχή στόχο για ενίσχυση
- Μια DNA πολυμεράση (ένζυμο)
- Δύο εκκινητές DNA που είναι συμπληρωματικοί προς τα 3 'άκρα καθενός από τους κλώνους sense και anti-sense του DNA στόχου επιλεκτικοί εκκινητές που είναι συμπληρωματικοί προς την περιοχή στόχου DNA
- Τριφωσφορικά δεοξυνουκλεοτίδια ή dNTPs, τα οποία είναι τα δομικά στοιχεία από τα οποία η DNA πολυμεράση συνθέτει την νέα αλυσίδα DNA
- Ένα ρυθμιστικό διάλυμα που παρέχει κατάλληλο χημικό περιβάλλον για τη βέλτιστη δραστικότητα και τη σταθερότητα της DNA πολυμεράσης
- Δισθενή κατιόντα μαγνησίου (Mg)
- ddH_2O

Η αντίδραση συνήθως διεξάγεται σε τελικό όγκο 50 μl σε μικρούς σωλήνες αντίδρασης και πραγματοποιείται σε τρία στάδια, τα οποία επαναλαμβάνονται διαδοχικά, και τα οποία είναι:

1. Αποδιάταξη: Οι δύο αλυσίδες του DNA διαχωρίζονται με θέρμανση σε θερμοκρασία 94-95° C για περίπου 30 sec έως 1 min.

2. Υβριδισμός εκκινητών: Με μείωση της θερμοκρασίας στους 55-65° C για περίπου 30 sec έως 1 min, οι εκκινητές υβριδίζονται στις συμπληρωματικές τους αλληλουχίες στο εκμαγείο DNA.

3. Επιμήκυνση: Για τη σύνθεση της νέας αλυσίδας αυξάνουμε τη θερμοκρασία στους 72° C, τη βέλτιστη θερμοκρασία δράσης της Taq πολυμεράσης. Η πολυμεράση

επιμηκύνει τους εκκινητές εισάγοντας τριφωσφορικά δεοξυνουκλεοτίδια (dNTPs) χρησιμοποιώντας τη συμπληρωματική αλληλουχία DNA ως εκμαγείο.

Τα παραπάνω στάδια επαναλαμβάνονται από 25 έως 35 φορές. Η PCR εκτελείται στον θερμικό κυκλοποιητή (Thermal cycler), συσκευή που φέρει θερμαινόμενη πλάκα που μπορεί να εναλλάσσει θερμοκρασίες με ταχύτητα και ακρίβεια.

1.3.2. Πολυμορφισμός διαμόρφωσης μονόκλωνης αλυσίδας (Single Strand Conformational Polymorphism - SSCP)

Βασική αρχή της τεχνικής SSCP είναι ότι το δίκλωνο DNA όταν αποδιατάσσεται, παίρνει μια ειδική διαμόρφωση. Αυτή η διαμόρφωση είναι μοναδική και εξαρτάται από την αρχική αλληλουχία των νουκλεοτιδίων, η οποία με τη σειρά της καθορίζει τις ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις στο μόριο.

Η κινητικότητα των μονόκλωνων προϊόντων PCR εξαρτάται από την δευτεροταγή δομή τους. Επομένως, τα προϊόντα PCR με διαφορές στην αλληλουχία, ή ακόμα και με προσθήκες ή απαλοιφές, θα έχουν διαφορετική κινητικότητα.

Στην ανάλυση SSCP, η αλληλουχία που περιέχει μια μετάλλαξη, εντοπίζεται από την διαφορά στην κινητικότητα της στην πηκτή πολυακρυλαμίδης, λόγω της διαφοροποιημένης αναδιπλωμένης δομής της. Θεωρείται μια τεχνική με υψηλή διακριτική ικανότητα, καθώς είναι δυνατόν να αναγνωρίζονται αλλαγές στην αλληλουχία σε μόνο μία βάση (Kenshi Hayashi,1991).

Στόχος της τεχνικής αυτής είναι η ομαδοποίηση των δειγμάτων με ταυτόσημο πρότυπο. Είναι μια τεχνική που χρησιμοποιείται τόσο για τον εντοπισμό άγνωστων μεταλλάξεων, όσο για την μελέτη των παραλλαγών μιας αλληλουχίας (Kakavas V. Konstantinos et al, 2007). Στη δεύτερη περίπτωση, η ταυτοποίηση των μεταλλάξεων γίνεται με τη σύγκριση με κάποια πρότυπα, έτσι ώστε να υπάρχει ταύτιση των γονοτύπων με βάση τα χαρακτηριστικά πρότυπα των ζωνώσεων, και όχι των μεταλλάξεων (Kakavas V. Konstantinos et al, 2007).

Υπάρχουν κάποιες παράμετροι που έχουν χαρακτηριστεί ως κάποιες που επηρεάζουν την ευαισθησία της τεχνικής SSCP. Αυτές είναι οι εξής (Kakavas V. Konstantinos et al, 2007) :

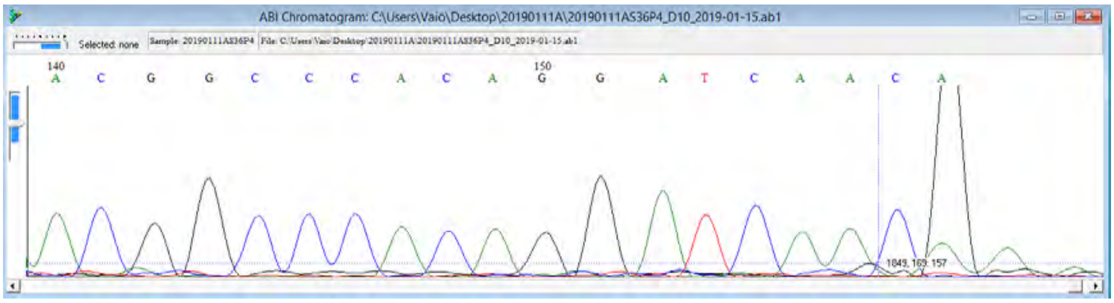
1. ο τύπος της μετάλλαξης
2. το μέγεθος του προιόντος PCR
3. η περιεκτικότητα του ενισχυμένου τμήματος σε C/G
4. η σύσταση της πηκτής
5. η ηλεκτρική τάση της ηλεκτροφόρησης
6. η θερμοκρασία κατά την ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων

7. η συγκέντρωση του DNA
8. ο χρόνος της ηλεκτροφόρησης
9. η σύσταση του buffer ηλεκτροφόρησης

1.3.3. Αλληλούχηση και Ανάλυση χρωματογραφημάτων αλληλούχησης

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η απάντηση της αλληλούχησης είναι με τη μορφή χρωματογραφημάτων, η επεξεργασία των οποίων είναι βασικό στάδιο για την εξαγωγή της επιθυμητής πληροφορίας, η οποία γίνεται με το πρόγραμμα BioEdit.

Το χρωματογράφημα αποτελείται από 4 καμπύλες διαφορετικού χρώματος, το οποίο αντιστοιχεί και σε διαφορετικό νουκλεοτίδιο. Συγκεκριμένα, το χρώμα της καμπύλης και το νουκλεοτίδιο στο οποίο αντιστοιχεί φαίνεται στην παρακάτω εικόνα (Εικόνα) :



Εικόνα 5 : Χρωματογράφημα από αλληλούχηση DNA.

Η καμπύλη με το μαύρο χρώμα αντιστοιχεί στη γουανίνη (G), αυτή με το πράσινο χρώμα στην αδενίνη (A), ενώ οι καμπύλες με κόκκινο και μπλε χρώμα αντιστοιχούν στην θυμίνη (T) και στην κυτοσίνη (C), αντίστοιχα.

Η εναλλαγή των καμπύλων με διαφορετικό χρώμα εξασφαλίζει την θέση των νουκλεοτιδίου της υπό μελέτης αλληλουχίας. Η διαδικασία της αλληλούχησης γίνεται και για τις δύο αλυδίσες με τη χρήση των δύο εκκινητών που έχουν σχεδιαστεί για την αντίδραση PCR. Επόμενο στάδιο στην ανάλυση των χρωματογραφημάτων είναι ο ομοπαράθεση των δύο αλληλουχιών που έχουν προκύψει από τις δύο αλυσίδες έτσι ώστε να εντοπιστούν τυχόν λάθη της διαδικασίας. Η ομοπαράθεση γίνεται με τη χρήση του ClustalX, ενός προγράμματος βιοπληροφορικής. Αφού ολοκληρωθεί και αυτό το στάδιο, είναι διαθέσιμη η πλήρης αλληλουχία του τμήματος του γονιδίου που μας ενδιαφέρει.

1.4. Σκοπός

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι να εντοπιστούν τα φαινοτυπικά θερμοάντοχα ζώα στον υπό μελέτη πληθυσμό και να εντοπιστούν πολυμορφισμοί γονιδίων που έχουν συσχετιστεί με θερμο-ανθεκτικότητα.

2. Υλικά και μέθοδοι

2.1. Υλικά

Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στην πειραματική διαδικασία :

Acetic Acid
Acrylamide
Agarose
Bis-Acrylamide
Ammonium persulfate
NaCl
dNTPs
EDTA
EtOH
Proteinase K
NaOH
Formaldehyde
$MgCl_2$
NaBH4
Potassium Acetate
TEMED
AgNO3
100bp Ladder

2.2. Μέθοδοι

2.2.1. Δείγματα

Τα δείγματα (αίμα) για τη συγκεκριμένη μελέτη είναι 107, και συγκεντρώθηκαν τη χρονική περίοδο Αυγούστου-Σεπτεμβρίου 2018 από διάφορες κτηνοτροφικές μονάδες της περιφέρειας της Θεσσαλίας από αγελάδες στις οποίες έγινε τεχνητή σπερματέγχυση.

2.2.2. Απομόνωση DNA

Αρχικό βήμα στην πειραματική διαδικασία, μετά τη συλλογή των δειγμάτων που προορίζονται για μελέτη, είναι να απομονωθεί το γενετικό υλικό. Για την απομόνωση του DNA από τα δείγματα αίματος των αγελάδων χρησιμοποιήθηκε το PureLink™ Genomic DNA Mini kit από την εταιρία Invitrogen σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

2.2.3. Προσδιορισμός συνολικής ποσότητας DNA ανά δείγμα

Αφού ολοκληρωθεί η απομόνωση του DNA ελέγχεται ποιοτικά και ποσοτικά η επιτυχία της διαδικασία είτε με φωτομέτρηση των δειγμάτων είτε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1% w/v. Για την φωτομέτρηση θα πρέπει να έχει γίνει αρχικά αραίωση 2μl διαλύματος του απομονωμένου DNA σε 98μl ddH_2O. Για την εκτίμηση της καθαρότητας ενός διαλύματος νουκλεϊκών οξέων είναι απαραίτητο να μετρηθεί η απορρόφηση στα 260 nm και στα 280 nm και στη συνέχεια να υπολογιστεί ο λόγος των δύο απορροφήσεων A260nm/A280nm. Όταν η τιμή του λόγου αυτού είναι 1,8, τότε το διάλυμα DNA χαρακτηρίζεται ως καθαρό. Η ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πηκτή αγαρόζης περιγράφεται στην παράγραφο 2.2.5.

2.2.4. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης - PCR

Για την ενίσχυση των τμημάτων των γονιδίων υπό μελέτη (HSP70A1A, ATP1A1) πραγματοποιήθηκε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR), και για την κάθε μια περίπτωση χρησιμοποιήθηκαν οι εξής εκκινητές αντίστοιχα (πίνακες 3,4) :

2.2.4.1. Γονίδιο HSP70A1A

Πίνακας 3 : Οι εκκινητές για το γονίδιο HSP70A1A για την αντίδραση PCR

Εκκινητής	Αλληλουχία εκκινητή
HSP70A1A-A-F	5'-CGT-TGA-TCC-TGT-GGG-CCG-TTT-T-'3
HSP70A1A-A-R	5'-TGG-TGC-GGT-TGC-CCT-GGT-CG-'3

Οι αλληλουχίες των εκκινητών HSP70A1A-A-F/-R για το γονίδιο HSP70A1A-A έχουν σχεδιαστεί με βάση την αλληλουχία του γονιδίου (GenBank accession No. AY149618) για να ενισχύουν ένα τμήμα 177bp (Qiuling Li et al,2010).

2.2.4.2. Γονίδιο ATP1A1

Πίνακας 4 : Οι εκκινητές για το γονίδιο ATP1A1 για την αντίδραση PCR

Εκκινητής	Αλληλουχία εκκινητή
ATP1A1EX17-F	5'-ACA-AAC-AAA-AGG-GTC-ACA-ACA-T-'3
ATP1A1EX17-R	5'-CTT-ACC-CTA-GAT-CCT-GGC-TCA-T-'3

Οι αλληλουχίες των εκκινητών για το γονίδιο ATP1A1 έχουν σχεδιαστεί για να ενισχύουν ειδικά τμήματα του γονιδίου. Συγκεκριμένα, οι εκκινητές ATP1A1EX17-F/-R σχεδιάστηκαν με το λογισμικό Oligo 6.12, βασιζόμενο στην αλληλουχία του γονιδίου ATP1A1 (GenBank accession No.NC_007301.3) για να ενισχύουν ένα τμήμα 301bp που περιλαμβάνει τμήμα του εξωνίου 17 (Yanxin Liu et at, 2010).

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζεται η σύσταση του διαλύματος της αντίδρασης PCR (πίνακας 5) :

Πίνακας 5 : Σύσταση διαλύματος για την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης.

	Αρχική συγκέντρωση	Τελική συγκέντρωση	Ποσότητες per PCR tube (50μl)
Buffer Kappa Taq	10x	1x	5 μl
$MgCl_2$	50mM	2mM	1 μl
Εκκινητής Forward	50pM	1pM	1 μl
Εκκινητής	50pM	1pM	1 μl

Reverse			
DNA πολυμεράση (Kappa Taq)	5 U/μL	1 U	0,2 μl
dNTPs	10mM	0,2mM	1 μl
DNA εκμαγείο	100 ng		
ddH_2O	μέχρι τα 50 μl		

Οι συνθήκες για την ενίσχυση των τμημάτων των γονιδίων ATP1A1 και HSP70A1A είναι οι εξής:

Στάδιο 1
Αρχική αναδιάταξη : 95^{o}C για 5 min

Στάδιο 2
Βήμα 1 - Αποδιάταξη : 95^{o}C για 40 sec

Βήμα 2 - Υβριδοποίηση : 59^{o}C (ATP1A1EX17) για 40 sec
60^{o}C (HSP70A1A-A)

Βήμα 3 - Επιμήκυνση : 72^{o}C για 40 sec
Το στάδιο αυτό επαναλαμβάνεται για 35 κύκλους

Στάδιο 3
Βήμα 1 - Τελική επιμήκυνση : 72^{o}C για 10 min
Βήμα 2 - Συντήρηση των δειγμάτων : 4^{o}C

Στη συνέχεια τα προϊόντα PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αγαρόζης 2% w/v, για να επιβεβαιωθεί η επιτυχημένη ολοκλήρωση της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR).

2.2.5. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης

Με την ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης πραγματοποιείται διαχωρισμός των τμημάτων DNA ανάλογα με το μέγεθος τους.

Στο στάδιο της παρασκευής του πηκτώματος της αγαρόζης χρησιμοποιείται διάλυμα 1x TAE , στο οποίο διαλύθηκε η κατάλληλη ποσότητα αγαρόζης ανάλογα με την επιθυμητή περιεκτικότητας σε αγαρόζη, η οποία διαφοροποιείται ανάλογα με το μέγεθος των τμημάτων DNA που πρέπει να διαχωριστούν. Το πήκτωμα τοποθετείται σε ειδικό καλούπι για να πολυμεριστεί.

Για πήκτωμα αγαρόζης το οποίο χρησιμοποιείται κυρίως για την οπτικοποίηση του DNA μετά από την απομόνωση του, διαλύονται 0,5gr και 1gr αγαρόζης σε 50ml και 100ml 1x TAE Electrophoresis Buffer αντίστοιχα.

Για πηκτή αγαρόζης η οποία χρησιμοποιείται για ηλεκτροφόρηση των ενισχυμένων τμημάτων DNA για τον έλεγχο επιτυχίας της αντίδρασης PCR, διαλύονται 0,8gr και 1,6gr αγαρόζης σε 50ml και 100ml 1x TAE Electrophoresis Buffer αντίστοιχα.
Για την ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων, και στις δυο περιπτώσεις που προαναφέρθηκαν, προστίθενται 3μl loading buffer στο καθένα από αυτά. Απο το απομονωμένο DNA χρησιμοποιούνται 3μl για την ηλεκτροφόρηση του, ενώ για το ενισχυμένο DNA με την τεχνική της PCR χρησιμοποιούνται 6μl απο αυτό. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται σε ειδική συσκευή, με ηλεκτρική τάση στα 100-150 Volts και ακολουθεί παρατήρηση της πηκτής σε λάμπα υπεριώδους φωτός.

2.2.6. Πολυμορφισμός διαμόρφωσης μονόκλωνης αλυσίδας (Single Strand Conformational Polymorphism - SSCP)

Όπως αναφέρθηκε, στην τεχνική αυτή βασική αρχή είναι οτι η κινητικότητα των μονόκλωνων προϊόντων PCR εξαρτάται από την δευτεροταγή δομή τους, και συνεπώς από την αρχική αλληλουχία των νουκλεοτιδίων.

Πρώτο στάδιο για την τεχνική SSCP είναι η παρασκευή της πηκτής πολυακρυλαμίδης, η οποία επιλέχθηκε να είναι 10% καθώς τα προϊόντα PCR έχουν μεγέθη 177bp και 301bp για τα γονίδιο HSP70A1A και ATP1A1, αντίστοιχα. Για την παρασκευή της πηκτής πολυακρυλαμίδης 10%, στην οποία ηλεκτροφορούνται τα δείγματα προς μελέτη, χρησιμοποιούνται τα συστατικά με τη σύσταση όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα (πίνακας 6) :

Πίνακας 6 : Σύσταση των συστατικών για την παρασκευή της πηκτής πολυακρυλαμίδης.

Ακρυλαμίδη	6,25 γραμμάρια
Bis-ακρυλαμίδη (N,N-μεθυλενο-δις-ακρυλαμίδιο)	0,16 γραμμάρια
Glycerol 50%	6,25 ml
10x TBE Buffer	3,2 ml
TEMED	62,5μl
APS 20% w/v	375μl
ddH_2O	Έως 62,5 ml

Η bis-ακρυλαμίδη, συντελεί στον σχηματισμό γεφυρών μεταξύ των αλυσίδων των πολυμερών του ακρυλαμιδίου. Με αυτόν τον τρόπο δημιουργείται ένα τρισδιάστατο πολυμερές πλέγμα, το μέγεθος των πόρων του οποίου εξαρτάται από τον βαθμό πολυμερισμού και είναι αντιστρόφως ανάλογο της συγκέντρωσης των μονομερών του ακρυλαμιδίου. Η γλυκερόλη προστίθεται καθώς αποτρέπει τη διάχυση του δείγματος στην πηκτή. Το υπερθειϊκό αμμώνιο, ή αλλιώς APS λειτουργεί ως εκκινητής του πολυμερισμού καθώς και καταλύτης δημιουργίας των ελεύθερων ριζών, ενώ ο φωτοχημικός καταλύτης, N,N, τετραμεθυλοεθυλενοδιαμίνη, που είναι γνωστός ως TEMED, αποσυνθέτει το υπερθειϊκό ιόν και λειτουργεί ως επιταχυντής του πολυμερισμού, για το σχηματισμό του πολυμερούς.

Αρχικά, με τη χρήση του ηλεκτρονικού ζυγού, ζυγίζεται η ακρυλαμίδη και η bis-ακρυλαμίδη, και τοποθετούνται σε ένα ποτήρι ζέσεως. Προστίθεται επίσης το 10x TBE buffer και ένα μέρος από το συνολικό όγκο του ddH_2O και ακολουθεί η ανάδευση τους με τη βοήθεια ενός μαγνήτη. Ακολουθεί η διήθηση του διαλύματος σε ογκομετρικό κύλινδρο με τη χρήση διηθητικού χαρτιού και συμπληρώνεται ο υπόλοιπος όγκος ddH_2O μέχρι τα 62,5ml. Στο τέλος προστίθενται η κατάλληλη ποσότητα του APS 20%w/v και του TEMED, σύμφωνα με τον παραπάνω πίνακα, τα οποία θα επιταχύνουν τον πολυμερισμό της ακρυλαμίδης, και αφού αναδευτεί ήπια το διάλυμα ακρυλαμίδης τοποθετείται σε ειδική κατασκευή για κάθετη ηλεκτροφόρηση για να πολυμεριστεί, σε περίπου 30 λεπτά. Η συσκευή αυτή αποτελείται από δύο γυάλινες πλάκες (τζάμια) που ευθυγραμίζονται στην κάτω επιφάνεια της συσκευής και διαχωρίζονται μεταξύ τους από ειδικά τμήματα (spacers) που δημιουργούν ενδιάμεσα κενά όπου θα τοποθετηθεί το διάλυμα ακρυλαμίδης.

Για την ηλεκτροφόρηση της πηκτής, μετακινείται αυτή σε συσκευή κατακόρυφης ηλεκτροφόρησης, όπου προστίθενται το ρυθμιστικό διάλυμα των ηλεκτροδίων, 0,5x TBE buffer. Για κάθε δείγμα που πρόκειται να φορτωθεί στην πηκτή προστίθενται 10μl loading buffer καθώς και 10μl από το PCR προϊόν και ακολουθεί αποδιάταξη σε ειδικές συνθήκες, όπως φαίνεται παρακάτω :

Στάδιο 1

Αποδιάταξη στους 95 ^oC για 2'

Στάδιο 2

Αποδιάταξη στους 97^oC για 2'

Στάδιο 3

Αποδιάταξη στους 99 ^oC για 9'

Στη συνέχεια τα δείγματα διατηρούνται στον πάγο μέχρι να τοποθετηθούν στην πηκτή. Αφού τοποθετηθούν στην πηκτή, ξεκινά η ηλεκτροφόρηση στα 220 volts σε θερμοκρασία δωματίου για περίπου 20 ώρες.

2.2.7. Χρώση πηκτών πολυακρυλαμίδης με νιτρικό άργυρο

Μετά το πέρας των 20 ωρών που διαρκεί η ηλεκτροφόρηση της πηκτής πολυακρυλαμίδης, ακολουθεί χρώση της έτσι ώστε να οπτικοποιηθεί το αποτέλεσμα. Για τη χρώση των πηκτών πρέπει να παρασκευαστούν 3 διαφορετικά διαλύματα. Παρακάτω παρουσιάζεται η σύσταση των διαλυμάτων καθώς και τα βήματα παρασκευής τους.

2.2.7.1. Διαλύματα για χρώση της πηκτής πολυακρυλαμίδης

Διάλυμα 1

Ογκομετρούνται 400ml ddH_2O (2 x 200ml) και προστίθεται σε δοχείο μαζί με 500μl οξικού οξέος (acetic acid) και αναδεύονται.

Διάλυμα 2

Σε έναν ογκομετρικό σωλήνα προστίθενται 200ml ddH_2O και 0,3gr νιτρικού αργύρου ($AgNO_3$) μαζί με μαγνήτη για να εξασφαλιστεί συνεχής ανάδευση του διαλύματος μέχρι την πλήρη διαλυτοποίηση του νιτρικού αργύρου.

Διάλυμα 3

Σε ένα ποτήρι ζέσεως προστίθενται 200ml ddH_2O, 3gr υδροξείδιο του Νατρίου ($NaOH$), 1ml φορμαλδεύδη και 0,01gr βοροϋδρίδιο του Νατρίου ($NaBH_4$). Το $NaBH_4$ προστίθεται τελευταίο από τα συστατικά καθώς είναι διαβρωτικό.

2.2.7.2. Στάδια χρώσης της πηκτής

Αρχικά, αφαιρούνται από την πηκτή τα τζάμια που σχηματίζουν την κατασκευή της και η πηκτή τοποθετείται σε ειδικό δοχείο για να ακολουθήσει η χρώση της.

Στάδιο 1 :

Στο ειδικό δοχείο που βρίσκεται η πηκτή προστίθενται 200ml από το διάλυμα 1 και αυτή αναδεύεται για 2 λεπτά. Το διάλυμα 1 απορρίπτεται και η διαδικασία επαναλαμβάνεται.

Στάδιο 2 :

Στην πηκτή προστίθενται το διάλυμα 2 με τον νιτρικό άργυρο και η πηκτή αφήνεται υπό συνεχή ανάδευση για 15 λεπτά.

Στάδιο 3 :

Ακολουθούν 2 πλύσεις της πηκτής με ddH_2O για 2 λεπτά η κάθε μια.

Στάδιο 4 :

Σε αυτό το στάδιο προστίθεται το διάλυμα 3 και πραγματοποιείται ανάδευση έως ότου να εμφανιστούν τα κλάσματα της ηλεκτροφόρησης (ζωνώσεις).

Στάδιο 5 :

Γίνεται μια τελευταία πλύση της πηκτής με ddH_2O, και στη συνέχεια αυτή αποθηκεύεται σε μεμβράνη για να είναι εύκολη η παρατήρηση της και η σύγκριση των πρότυπων ζωνώσεων.

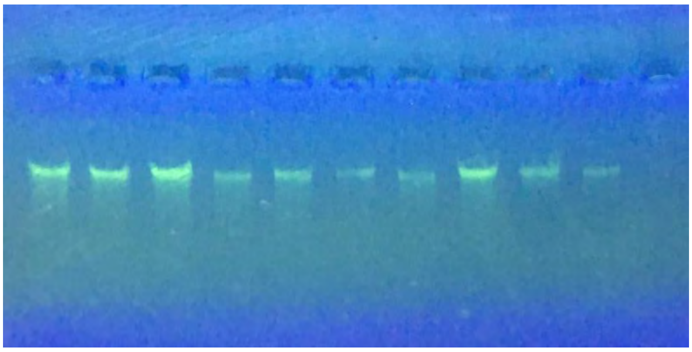
2.2.8. Αλληλούχηση

Μετά από την παρατήρηση των πηκτών της SSCP και την απαρίθμηση των πιθανών προτύπων, τα προϊόντα PCR των επιλεγόμενων δειγμάτων, υφίστανται καθαρισμό πριν αποσταλλούν για αλληλούχηση. Ο καθαρισμός γίνεται με τη χρήση του kit SureClean και με τον τρόπο αυτό απομακρύνονται εκκινητές και συστατικά της αντίδρασης PCR, καθώς και παραπροϊόντα, και στη συνέχεια αποστέλλονται σε κάποια εταιρεία για να ολοκληρωθεί η διαδικασία της αλληλούχησης. Ως απάντηση της εταιρείας αποστέλλονται τα αποτελέσματα υπό τη μορφή χρωματογραφήματος, μέσω του οποίου και με τη χρήση των κατάλληλων προγραμμάτων βιοπληροφορικής είναι δυνατή η εξαγωγή της επιθυμητής αλληλουχίας.

3. Αποτελέσματα - Συζήτηση

3.1. Απομόνωση

Από την ηλεκτροφόρηση του DNA που προέκυψε από την απομόνωση, σε πηκτή αγαρόζης 1% w/v πήραμε το παρακάτω αποτέλεσμα (εικόνα 6), όπου φαίνονται οι ζώνες του απομονωμένου DNA.

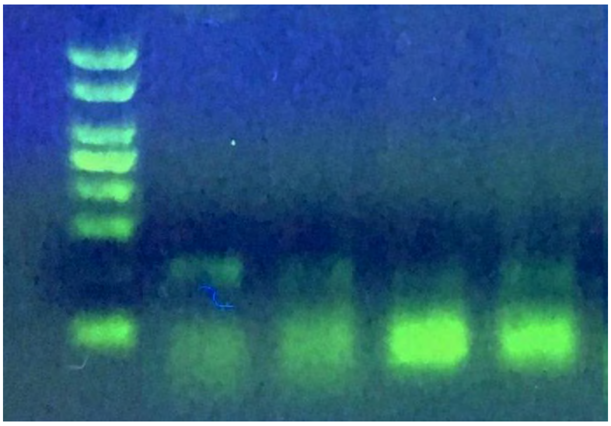


Εικόνα 6 : Ηλεκτροφόρηση απομονωμένου DNA

Για το γονίδιο HSPA1A

3.2. PCR

Με τη χρήση των κατάλληλων εκκινητών, όπως αναφέρθηκε στην πειραματική διαδικασία παραπάνω, ενισχύθηκε ένα τμήμα του γονιδίου ATP1A1, καθώς και τμήμα του γονιδίου HSP70A1A. Για τον έλεγχο της επιτυχίας της διαδικασίας που εκτελέστηκε, πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 2% w/v, στην οποία ηλεκτροφορήθηκαν τα προϊόντα PCR με μάρτυρα μοριακού μεγέθους τμημάτων DNA (100bp ladder), όπως φαίνεται στην παρακάτω εικόνα (εικόνα 7).



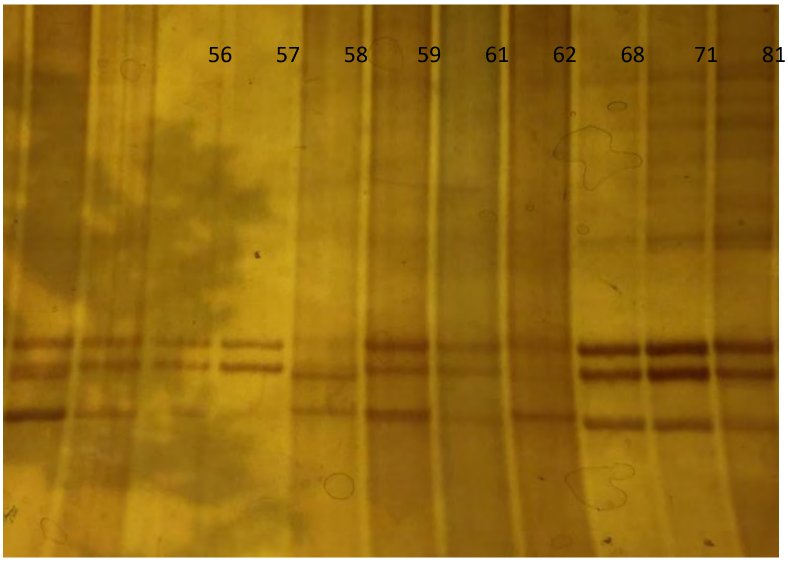
←177bp

Εικόνα 7 : Ηλεκτροφόρηση προιόντων PCR για το γονίδιο HSPA1A (θέσεις 2-5) με μάρτυρα μοριακού μεγέθους τμημάτων DNA (100bp) (θέση 1).

3.3. SSCP

Τα προϊόντα PCR που προέκυψαν από δυο διαφορετικά ζευγάρια εκκινητών, για τα τμήματα των γονιδίων ATP1A1 και HSP70A1A, μετά από τη διαδικασία αποδιάταξης, ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή πολυακρυλαμίδης 10% σε θερμοκρασία δωματίου στα 220 volts για περίπου 20 ώρες. Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, και αφού ολοκληρώθηκε η χρώση των πηκτών με νιτρικό άργυρο παρατηρήθηκαν οι ζώνες που εμφανίστηκαν στην πηκτή, για να χαρακτηριστούν τα διάφορα πρότυπα.

Αντίστοιχα και για το γονίδιο HSP70A1A παρατίθεται παρακάτω εικόνα (εικόνα 8) από πηκτή πολυακρυλαμίδης για τα δείγματα με αριθμό 56-59, 61, 62, 68, 71, 81-83.



Εικόνα 8 : SSCP για το γονίδιο HSPA1A.

Στην πηκτή εμφανίζονται 4 διαφορετικά πρότυπα ζωνών, στα οποία αντιστοιχούν τα δείγματα :

- πρότυπο Α : 56
- πρότυπο Β : 57, 58, 59, 62, 68, 81, 82, 83
- πρότυπο Γ : 61
- πρότυπο Δ : 71

3.4. Αλληλούχηση

Αφού συγκεντρώθηκαν όλα τα διαφορετικά πρότυπα που εμφανίζονταν στις πηκτές για το τμήμα του γονιδίου HSP70A1A, επιλέχθηκαν 17 δείγματα για αλληλούχηση. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της αλληλούχησης προκύπτουν 4 πρότυπα, τα οποία παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα (πίνακας 7) και αντιστοιχούν σε 63 άτομα του υπό μελέτη πληθυσμού :

Πίνακας 7 : Τα πρότυπα SSCP και ο αριθμός των δειγμάτων που αντιστοιχούν στο καθένα από αυτά.

Πρότυπα	Αριθμός δειγμάτων
πρότυπο 1	1
πρότυπο 2	14
πρότυπο 3	1
πρότυπο 4	47

Οι αλληλουχίες που προέκυψαν είναι :

```
                                         10        20        30        40        50        60        70        80        90
100
                                ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
23 dna:primary_assembly primar  TTGATCCTGTGGGCCGTTTTCAGGTTTGAAGCTTATCTCGGAGCCGAAAAGGCAGGGCACCGGCATGGCGAAAAACATGGCTATCGGCATCGACCTGGGC
S21                             ....................................................................................................
S22                             ....................................................................................................
S23                             ....................................................................................................
S24                             ....................................................................................................
S25                             ....................................................................................................
S26                             ....................................................................................................
S27                             .................................................................................................S..
S28                             ....................................................................................................
S29                             .................................................................................................S..
S30                             ....................................................................................................
S31                             ....................................................................................................
S32                             ....................................................................................................
S33                             ....................................................................................................
S34                             ....................................................................................................
S35                             ....................................................................................................
S36                             .................................................................................................S..
S37                             ....................................................................................................

                                       110       120       130       140       150       160
                                ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
23 dna:primary_assembly primar  ACCACCTACTCCTGCGTAGGGGTGTTCCAGCACGGCAAGGTGGAGATCATCGCCAACGACCAGGG
S21                             ..........................................K......................
S22                             .................................................................
S23                             .................................................................
S24                             ............................................K....................
S25                             .................................................................
S26                             .................................................................
S27                             .................................................................
S28                             .................................................................
S29                             .................................................................
S30                             .................................................................
S31                             .................................................................
S32                             .................................................................
S33                             .................................................................
S34                             .................................................................
S35                             .................................................................
S36                             .................................................................
S37                             .................................................................
```

3.5. SNPs

Από την ήδη υπάρχουσα βιβλιογραφία, για το γονίδιο HSP70A1A έχει καταχωρηθεί μια μετάλλαξη (G/A) στην νουκλεοτιδική θέση 1524 της κωδικής περιοχής του γονιδίου (Qiuling Li et al, 2010).

Για το SNP στη νουκλεοτιδική θέση 1524, που σημειώνεται με βέλος στην αλληλουχία παραπάνω, στην παρούσα μελέτη δεν ανιχνεύτηκε, ωστόσο προέκυψαν από τα δεδομένα της αλληλούχησης επιπλέον 3 SNP. Συγκεκριμένα, τα SNP που βρέθηκαν εντοπίζονται στις θέσεις :

1. νουκλεοτιδική θέση 1499 : (G/C)
   Η μετάλλαξη στη θέση αυτή είναι μη συνώνυμη, και παρατηρείται αλλαγή προλίνη (P) → αλανίνη (A)

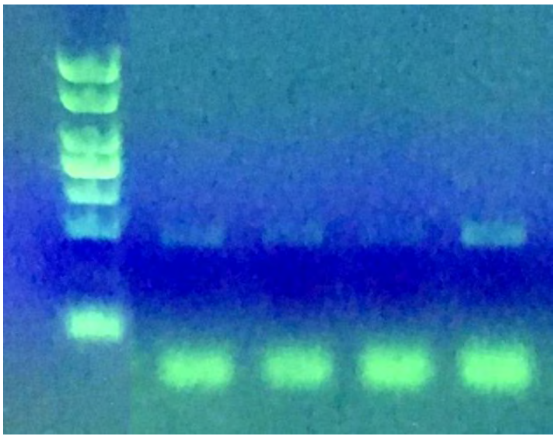
2. νουκλεοτιδική θέση 1545 : (G/T)
   Η μετάλλαξη στη θέση αυτή είναι μη συνώνυμη, και παρατηρείται αλλαγή θρυπτοφάνη (W) → κυστεινη (C)

3. νουκλεοτιδική θέση 1547 : (G/T)
   Η μετάλλαξη στη θέση αυτή είναι μη συνώνυμη, και παρατηρείται αλλαγή γλυκίνη (G) → βαλίνη (V)

Για το γονίδιο ATP1A1

3.2. PCR

Με τη χρήση του κατάλληλου ζεύγους εκκινητών, όπως αναφέρθηκε στην πειραματική διαδικασία παραπάνω, ενισχύθηκε ένα τμήμα του γονιδίου ATP1A1. Για τον έλεγχο της επιτυχίας της διαδικασίας που εκτελέστηκε, πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 2% w/v, στην οποία ηλεκτροφορήθηκαν τα προϊόντα PCR με μάρτυρα μοριακού μεγέθους τμημάτων DNA (100bp ladder), όπως φαίνεται στην παρακάτω εικόνα (εικόνα 9).



←301bp

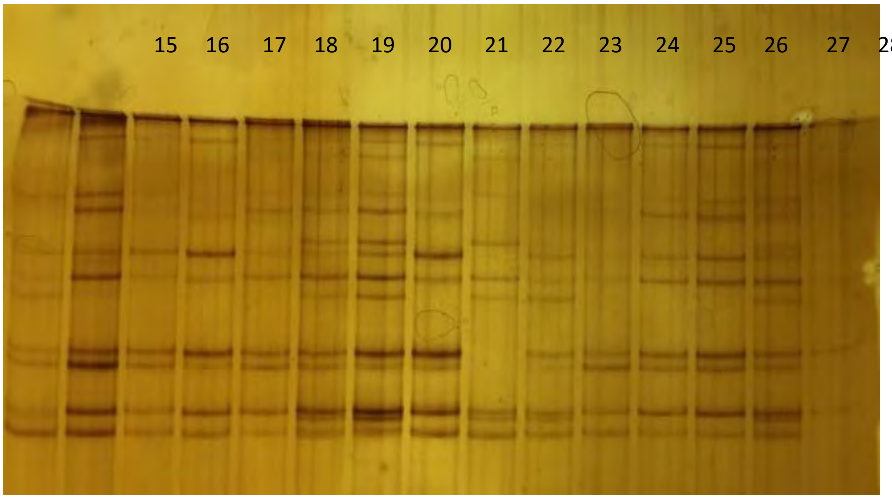
Εικόνα 9 : Ηλεκτροφόρηση προιόντων PCR για το γονίδιο ATPA1A1 (θέσεις 2-5) με μάρτυρα μοριακού μεγέθους τμημάτων DNA (100bp) (θέση 1).

3.3. SSCP

Τα ενισχυμένα τμήματα του γονιδίου ATP1A1, μετά από τη διαδικασία αποδιάταξης, ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή πολυακρυλαμίδης 10% σε θερμοκρασία δωματίου στα

220 volts για περίπου 20 ώρες. Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, και αφού ολοκληρώθηκε η χρώση των πηκτών με νιτρικό άργυρο παρατηρήθηκαν οι ζώνες που εμφανίστηκαν στην πηκτή, για να χαρακτηριστούν τα διάφορα πρότυπα.

Ενδεικτικά παρατίθεται παρακάτω εικόνα (εικόνα 10) από πηκτή πολυακρυλαμίδης για τα δείγματα με αριθμό 15-29.



Εικόνα 10 : SSCP για το γονίδιο ATP1A1.

Στη συγκεκριμένη πηκτή εμφανίζονται 4 διαφορετικά πρότυπα ζωνών, στα οποία αντιστοιχούν τα εξής δείγματα :

- πρότυπο Α : 15, 24
- πρότυπο Β : 16, 17, 18, 19, 22, 25, 26, 27, 29
- πρότυπο Γ : 20, 21, 28
- πρότυπο Δ : 23

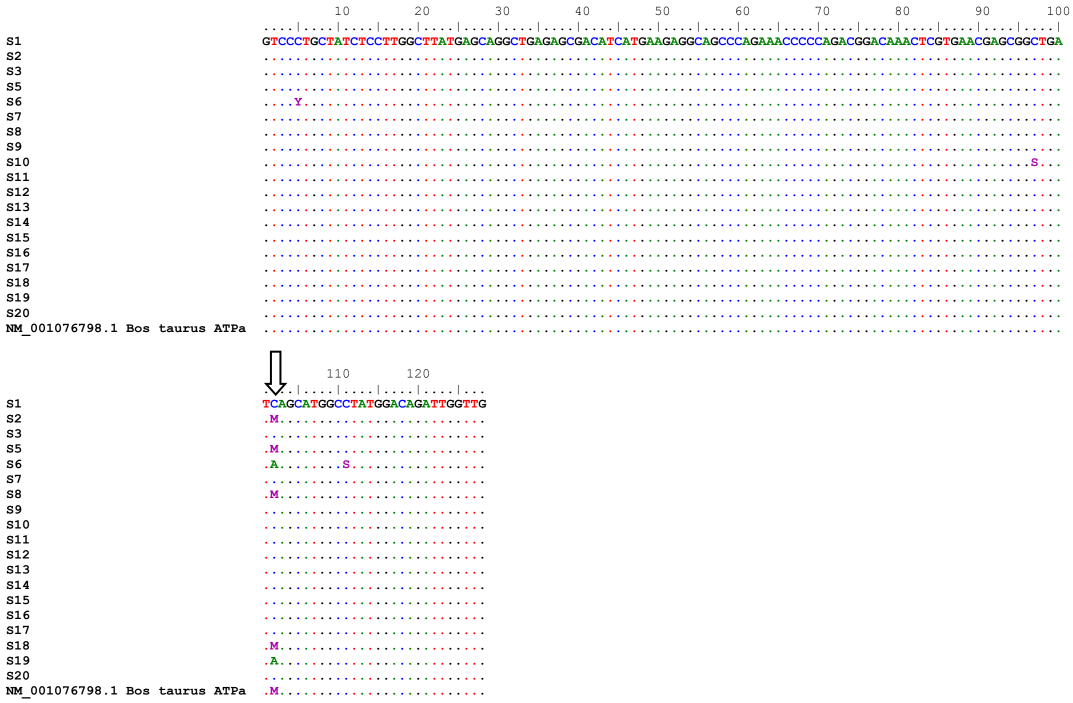
3.4. Αλληλούχηση

Αφού συγκεντρώθηκαν όλα τα διαφορετικά πρότυπα που εμφανίζονταν στις πηκτές για το τμήμα του γονιδίου ATP1A1 επιλέχθηκαν 20 δείγματα για να σταλούν για αλληλούχηση. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της αλληλούχησης για το γονίδιο ATP1A1 προκύπτουν 5 πρότυπα, τα οποία παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα (πίνακας 8) και αντιστοιχούν σε 67 άτομα του υπό μελέτη πληθυσμού :

Πίνακας 8 : Τα πρότυπα SSCP και ο αριθμός των δειγμάτων που αντιστοιχούν στο καθένα από αυτά.

Πρότυπα	Αριθμός δειγμάτων
πρότυπο 1	1
πρότυπο 2	1
πρότυπο 3	56
πρότυπο 4	8
πρότυπο 5	1

Οι αλληλουχίες που προέκυψαν είναι :



3.5. SNPs

Στην ήδη υπάρχουσα βιβλιογραφία υπάρχουν SNPs για τα υπό μελέτη γονίδια,. Συγκεκριμένα για το γονίδιο ATP1A1 έχει βρεθεί μια σημειακή μετάλλαξη (C/A) στη νουκλεοτιδική θέση 2789 του γονιδίου (Yanxin Liu et al, 2010). Η μετάλλαξη στη θέση αυτή είναι συνώνυμη. Για το SNP αυτό, λοιπόν, υπολογίστηκαν τόσο ο αριθμός των ανθεκτικών και μη ατόμων της μελέτης, όσο και οι συχνότητες εμφάνισης τους στον πληθυσμό. Ως ανθεκτικά άτομα του πληθυσμού ορίζονται αυτά τα οποία κατά τη διάρκεια του καλοκαιριού, το διάστημα που έγινε η λήψη του δείγματος αίματος, κατέστησαν έγκυα. Αντίστοιχα, ως μη ανθεκτικά ορίζονται τα άτομα που δεν κατάφεραν να γονιμοποιηθούν στις συνθήκες της μελέτης.

Για το SNP στη νουκλεοτιδική θέση 2789, η οποία σημειώνεται με βέλος στην αλληλουχία παραπάνω, βρέθηκαν τα εξής :

- Ως προς τους γονοτύπους (CC,AA,CA)

    - αριθμός ατόμων/ 67 άτομα μελέτης

Γονότυπος	Ανθεκτικά άτομα	Μη ανθεκτικά άτομα
CC	12	45
AA	0	2
CA	3	5

    - γονοτυπικές συχνότητες

Γονότυπος	Ανθεκτικά άτομα	Μη ανθεκτικά άτομα
CC	0,80	0,86
AA	0	0,04
CA	0,20	0,10

- Ως προς τα αλληλόμορφα (C,A)

    - αλληλομορφικές συχνότητες

Αλληλόμορφο	Ανθεκτικά άτομα	Μη ανθεκτικά άτομα
C	0,90	0,91
A	0,10	0,09

Στα δείγματα της μελέτης για το γονίδιο ATP1A1, και συγκεκριμένα για το τμήμα του γονιδίου που περιλαμβάνει το εξώνιο 17, εκτός από τα SNP της βιβλιογραφίας, προέκυψαν από τα δεδομένα της αλληλούχησης επιπλέον 3 SNP. Συγκεκριμένα, τα SNP που βρέθηκαν εντοπίζονται στις θέσεις :

1. νουκλεοτιδική θέση 2692 : (C/T)
   Στη θέση αυτή η μετάλλαξη είναι συνώνυμη.

2. νουκλεοτιδική θέση 2784 : (C/G)
   Η μετάλλαξη στη θέση αυτή είναι μη συνώνυμη, και παρατηρείται αλλαγή λευκίνη (L) → βαλίνη (V)

3. νουκλεοτιδική θέση 2798 : (C/G)
   Στη θέση αυτή η μετάλλαξη είναι συνώνυμη.

3.6. Συζήτηση

Heat stress (HS) ή αλλιώς θερμική καταπόνηση αποτελεί ένα σημαντικό πρόβλημα που επηρεάζει σε μεγάλο βαθμό διάφορους παράγοντες που αφορούν τα ζώα παραγωγής και συγκεκριμένα τα βοοειδή, που αποτελούν αντικείμενο μελέτης της παρούσας εργασίας. Η θερμική καταπόνηση επηρεάζει πληθώρα των παραγωγικών χαρακτηριστικών των οργανισμών, όπως είναι η παραγωγή γάλακτος, η ανάπτυξη, η αναπαραγωγική δραστηριότητα προκαλώντας αρνητικές συνέπειες για το επίπεδο διαβίωσης καθώς και για την επιβίωση (Archana PR et al, 2017).

Σε τέτοιες συνθήκες οι οργανισμοί ενεργοποιούν αμυντικούς μηχανισμούς, μέσω των οποίων παράγονται οι πρωτεΐνες θερμικής καταπόνησης σε κυτταρικό επίπεδο (Archana PR et al, 2017). Τα αυξημένα επίπεδα παραγωγής των πρωτεϊνών αυτών συνδυάζονται με την έκφραση γονιδίων που έχουν συσχετιστεί με θερμορρύθμιση (Archana PR et al, 2017). Οι πρωτεΐνες θερμικής καταπόνησης είναι κυτταρικές πρωτεΐνες οι οποίες έχουν βρεθεί σε αφθονία ακόμα και σε συνθήκες μη θερμικής καταπόνησης. Είναι πρωτεΐνες με υψηλό βαθμό συντήρησης και τείνουν να ενεργοποιείται η παραγωγή τους από παράγοντες άγχους όπως είναι και η υψηλή περιβαλλοντική θερμοκρασία.

Οι πρωτεΐνες θερμικής καταπόνησης κατηγοριοποιούνται ανάλογα με το μοριακό τους βάρος, καθώς και με τη βιολογική τους λειτουργία στις HSP110, HSP100, HSP90, HSP70, HSP60, HSP40, HSP10, καθώς και στις οικογένειες HSP μικρού μοριακού βάρους (Archana PR et al, 2017). Από αυτές τις κατηγορίες με την θερμο-αντοχή έχουν συσχετιστεί οι HSP70 καθώς και οι HSP90, στα διάφορα είδη (Archana PR et al, 2017).

Συγκεκριμένα για τις HSP70, έχουν χαρακτηριστεί από μεγάλη ευαισθησία στη θερμοκρασία. Επίσης η οικογένεια αυτή των HSP έχε βρεθεί να παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στο περιβαλλοντικό στρες. Σε υψηλές θερμοκρασίες που παρατηρούνται στη διάρκεια των καλοκαιρινών μηνών η έκφραση των HSP70 παρουσιάζει μεγάλη διαφορά συγκριτικά με τους χειμερινούς μήνες (Archana PR et al, 2017). Οι πρωτεΐνες της οικογένειας των HSP70 έχουν τη δυνατότητα να προωθούν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων καθώς και την ανοσοποίηση. Υπάρχουν ενδείξεις ότι οι HSP70 έχουν συσχετιστεί με την απόκτηση θερμικής ανοχής καθώς και με την πιο γρήγορη αποκατάσταση των μετουσιωμένων πρωτεϊνών υπό υψηλές συνθήκες στη φυσική τους κατάσταση. Ο βασικός ρόλος των HSP70 είναι κυρίως η επιτάχυνση της πρωτεϊνοσύνθεσης καθώς και επιπλέον η συμμετοχή στην αναδίπλωση των πρωτεϊνών (Quiling et al, 2010). Στην οικογένεια των HSP70 ανήκει και αυτή που κωδικοποιείται από το γονίδιο HSP70A1A ή αλλιώς HSPA1A.

Σύμφωνα με την επιστημονική βιβλιογραφία που ήδη υπάρχει, έχει βρεθεί σημειακή μετάλλαξη στη νουκλεοτιδική θέση 1524 στην κωδική περιοχή του γονιδίου HSP70A1A (Quiling et al, 2010). Στη συγκεκριμένη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν οι αλληλουχίες εκκινητών όπως είχαν σχεδιαστεί σε προηγούμενη μελέτη (Quiling et al, 2010) για ενίσχυση του τμήματος του γονιδίου με αντίδραση PCR. Το προϊόν της αντίδρασης PCR που ενισχύθηκε είναι 177 bp.

Στην παρούσα μελέτη δεν ανιχνεύτηκε ο πολυμορφισμός της βιβλιογραφίας στη νουκλεοτιδική θέση 1524. Ωστόσο από τα δεδομένα της αλληλούχησης προέκυψαν 3 επιπλέον SNP για το τμήμα του γονιδίου, στις νουκλεοτιδικές θέσεις 1499, 1545 και 1547. Και οι 3 αυτοί πολυμορφισμοί αφορούν σημειακές μη συνώνυμες μεταλλάξεις. Συγκεκριμένα για τη θέση 1499, η σημειακή μετάλλαξη G/C προκαλεί την αλλαγή του αμινοξέος προλίνη (P) σε αλανίνη (A), τα οποία είναι μη απαραίτητα αμινοξέα. Στη θέση 1545 η σημειακή μετάλλαξη G/T οδηγεί σε αλλαγή του απαραίτητου αμινοξέος θρυπτοφάνη (W) σε κυστεινη (C) το οποίο είναι μη απαραίτητο αμινοξύ. Στη θέση 1547 η σημειακή μετάλλαξη είναι επίσης G/T αλλά έχει ως αποτέλεσμα την αλλαγή του μη απαραίτητου αμινοξέος γλυκίνη (G) στο απαραίτητο αμινοξύ βαλίνη (V).

Εκτός όμως από τις πρωτεΐνες θερμικής καταπόνησης των οποίων η έκφραση επάγεται από τη θερμική καταπόνηση, υπάρχουν και άλλα γονίδια που εκφράζονται σε απόκριση θερμικής καταπόνησης και υφίστανται αλλαγές στην έκφραση τους σε τέτοιες συνθήκες. Στα γονίδια αυτά, ανήκει και το γονίδιο ATP1A1.

Το γονίδιο ATP1A1, το οποίο έχει μέγεθος 3746 bp, χαρτογραφείται στο χρωμόσωμα 3 των βοοειδών. Συνολικά περιλαμβάνει 23 εξώνια. Το γονίδιο κωδικοποιεί για την α1 ισομορφή της υπομονάδας α του συμπλόκου Na+/K+ ATPase. Το σύμπλοκο αυτό είναι μια ATPάση που ανήκει στην κλάση 3.6.3.9. των ενζύμων, και αποτελεί μια αντλία για τη μεταφορά ιόντων νατρίου και καλίου. Η κλάση αυτή είναι μια ειδική κλαση ATPασών, στην οποία ανήκουν και η H,K-ATPάση, καθώς και η Ca-ATPάση.

Το ένζυμο NA+/K+ATPase είναι ένα αναπόσπαστο ένζυμο της μεμβράνης των κυττάρων των ανώτερων οργανισμών και είναι μεγάλης σημασίας, καθώς το 25% του ATP που καταβολίζεται από ένα άτομο σε κατάσταση ηρεμίας συμβαίνει από το ένζυμο αυτό. Το ένζυμο έχει σαν βασική λειτουργία τη διατήρηση της διαβάθμισης των ιόντων Na+ και K+ διαμέσου της πλασματικής μεμβράνης των κυττάρων στα θηλαστικά. Η συνεχής λειτουργία του ενζύμου, που συνδέεται με την υδρόλυση του ATP, συνιστά το ένζυμο υπεύθυνο για τον έλεγχο του όγκου των κυττάρων, της βασικής χρήσης της ενέργειας, την πρόσληψη της γλυκόζης καθώς και των αμινοξέων. Η δράση της ATPάσης ρυθμίζεται με διαφορετικούς τρόπους, ανάλογα με τοκατάλληλο ερέθισμα. Η άμεση ρύθμιση του ενζύμου μπορεί να συμβεί με διάφορους τρόπους, όπως με φωσφορυλίωση της υπομονάδας α, με διαφοροποίηση των ενδοκυτταρικών συγκεντρώσεων των ιόντων Na+, καθώς και με άμεση αναστολή μέσω της σύνδεσης ενδογενων αναστολέων του ενζύμου. Η Na+/K+ATPase είναι ένα ετεροδιμερές που αποτελείται από 2 διαφορετικές υπομονάδες, την υπομοναδα α και β, σε ισομοριακές ποσότητες.

Η υπομονάδα α, η οποία έχει μοριακό βάρος 112kDa και κωδικοποιείται από το γονίδιο ATP1A1,ρυθμίζει την καταλυτική δραστικότητα και επίσης περιλαμβάνει θέσεις ενδοκυτταρικής σύνδεσης ATP και ιόντων Na+ , θέσεις εξωκυτταρικής σύνδεσης ιόντων K+, καθώς επίσης και θέση φωσφορυλίωσης. Η υπομονάδα αυτή χαρακτηρίζεται από το μεγάλο μέγεθος της και τον υδρόφοβο χαρακτήρα της και επιπλέον από μεγάλη ετερογένεια λόγω της ύπαρξης πολλών ισομορφών της. Στην α υπομονάδα υπάρχουν συνήθως 6-10 διαμεμβανικές περιοχές, εξωκυτταρικές καθώς και κυτταροπλασματικές περιοχές.

Η υπομονάδα β είναι απαραίτητη για τη δράση του ενζύμου καθώς διευκολύνει το σχηματισμό του διμερούς α/β και την επακόλουθη μεταφορά του ολοενζύμου στην πλασματική μεμβράνη. Στη β υπομονάδα εντοπίζονται 1-4 διαμεμβρανικές περιοχές, εξωκυτταρικές περιοχές, οι οποίες αποτελούν το μεγαλύτερο τμήμα της υπομονάδας, και κυτταροπλασματικές περιοχές στις οποίες υπάρχει μικρό υδρόφιλο τμήμα και αμινοτελική περιοχή.

Η κύρια δράση της αντλίας είναι κυκλική, και σε αυτή γίνεται μεταφορά 3 ιόντων νατρίου στο εξωτερικό του κυττάρου και αντίστοιχη μεταφορά 2 ιόντων καλίου στο εσωτερικό του κυττάρου. Η αρχική ενεργοποίηση του ενζύμου γίνεται με τη σύνδεση του μορίου ATP και ακολουθεί η σύνδεση με τα ιόντα Na+ στην ενδοκυτταρική περιοχή καθώς και η υδρόλυση του μορίου ATP. Για να μπορέσει να μελετηθεί και να γίνει κατανοητός ο μοριακός μηχανισμός της απόκρισης στη θερμική καταπόνηση, επιλέχθηκε το γονίδιο ATP1A1 που κωδικοποιεί για την υπομονάδα α1 του ενζύμου Na+/K+ ATPase, καθώς παρουσιάζει ιδιαίτερη ευαισθησία στο οξειδωτικό στρες (Morel et al, 1998).

Σε μια προηγούμενη μελέτη, στην οποία αναλύθηκε τμήμα του εξωνίου 17 του συγκεκριμένου γονιδίου, και συγκεκριμένα μια σημειακή μετάλλαξη C/A στη νουκλεοτιδική θέση 2789, το αλληλόμορφο C συσχετίσθηκε με θερμο-ανθεκτικότητα στις φυλές αγελάδων (Yanxin Liu et al, 2010). Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν οι αλληλουχίες εκκινητών από τη μελέτη των Yanxim Liu (2010) για να στοχεύσουμε στο ίδιο τμήμα του γονιδίου ATP1A1 και συγκεκριμένα αυτό που περιλαμβάνει το εξώνιο 17. Το ενισχυμένο προϊόν PCR έχει μέγεθος 301 bp. Σε προηγούμενη μελέτη (Liu et al, 2010) για τον πολυμορφισμό C/A στη θέση 2789 βρέθηκαν συχνότητες των αλληλομόρφων C και A 0,86 και 0,14 αντίστοιχα. Με βάση τη μελέτη αυτή (Liu et al, 2010) πραγματοποιήθηκε και μία ακόμα μελέτη (Kashyap et al, 2015). Στη μελέτη αυτοή χρησιμοποιήθηκαν επίσης οι αλληλουχίες των εκκινητών της αρχικής μελέτης (Liu et al, 2010) για να ενισχυθεί το τμήμα του εξωνίου 17, για το γονίδιο ATP1A1. Στο τμήμα αυτό εντοπίστηκε ο πολυμορφισμός C/A στη νουκλεοτιδική θέση 2789, ωστόσο, τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν άνηκαν σε 2 διαφορετικές φυλές, τις Vrindavani και Tharparkar. Για τις φυλές αυτές οι αλληλομορφικές συχνότητες ήταν 0,51 και 0,52 για το αλληλόμορφο A, και 0,49 και 0,48 για το αλληλόμορφο C αντίστοιχα. Οι συχνότητες αυτές δεν διαφέρουν σε μεγάλο βαθμό, ωστόσο παρουσιάζουν σημαντική διαφορά με τις συχνότητες που παρατηρήθηκαν τόσο στην αρχική μελέτη (Liu et al, 2010) όπου οι αλληλομορφικές συχνότητες για C και A αλληλόμορφο ήταν 0,86 και 0,14 αντίστοιχα, όσο και στην παρούσα μελέτη που οι αλληλουχίες ήταν 0,90 και 0,10 στα ανθεκτικά άτομα του υπό μελέτη πληθυσμού. Όσον αφορά τις γονοτυπικές συχνότητες για τους γονότυπος CC, AA, CA στις 2 διαφορετικές φυλές είναι 0,29 , 0,24, 0,47 και 0,30, 0,31, 0,39 για τις φυλές Vrindavani και Tharparkar αντίστοιχα (Kashyap et al, 2015). Στην παρούσα μελέτη, αρχικά τα υπό μελέτη άτομα κατηγοριοποιηθήκαν σε 2 διακριτές ομάδες, τα ανθεκτικά και μη ανθεκτικά άτομα, με κριτήριο εάν κατάφεραν να γονιμοποιηθούν κατά τη διάρκεια του καλοκαιριού, όποτε και έγινε η λήψη των δειγμάτων αίματος από τις αγελάδες του συγκεκριμένου προγράμματος. Οι γονοτυπικές συχνότητες CC, AA, CA για τα ανθεκτικά και μη ανθεκτικά άτομα είναι 0,80, 0, 0,20 και 0,86, 0,04, 0,10 αντίστοιχα. Όπως είναι φανερό δεν παρουσιάζεται μεγάλη διαφορά στις γονοτυπικές συχνότητες των ανθεκτικών και μη ανθεκτικών ατόμων. Το ίδιο παρατηρείται πιο κατανοητά και από τις αλληλομορφικές συχνότητες C και A που είναι 0,90 και 0,10 για τα ανθεκτικά άτομα και 0,91 και 0,09 για τα μη ανθεκτικά άτομα του πληθυσμού.

Εκτός από τη σημειακή μετάλλαξη C/A στη νουκλεοτιδική θέση 2789 σύμφωνα με την υπάρχουσα βιβλιογραφία, στην μελέτη εντοπίστηκαν επιπλέον 3 SNP, στις θέσεις 2692, 2784 και 2798. Στη θέση 2692 εντοπίστηκε η σημειακή μετάλλαξη C/T, η οποία είναι συνώνυμη, όπως αντίστοιχα και η μετάλλαξη C/G στη θέση 2798. Στη θέση 2784 η μετάλλαξη C/G είναι μη συνώνυμη και έχει ως αποτέλεσμα την αλλαγή του αμινοξέος λευκίνη (L) σε βαλίνη (V) τα οποία είναι και τα δύο απαραίτητα αμινοξέα.

4. Συμπεράσματα

Η θερμική καταπόνηση, ως συνέπεια της συνεχώς αυξανόμενης περιβαλλοντικής θερμοκρασίας λόγω της παγκόσμιας κλιματικής αλλαγής, τείνει να επηρεάζει σε μεγάλο βαθμό τα ζώα παραγωγής, επιδεινώνοντας τις συνθήκες διαβίωσης και μειώνοντας το παραγωγικό αλλά και το αναπαραγωγικό τους προφίλ. Για το γονίδιο HSP70A1A που μελετήθηκε, δεν μπορεί να εξαχθεί κάποιο συμπέρασμα, καθώς ο πολυμορφισμός που επιλέχθηκε να μελετηθεί δεν ανιχνεύτηκε στα άτομα του υπό μελέτη πληθυσμού. Για το γονίδιο ATP1A1, σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας για τον πολυμορφισμό C/A που εντοπίζεται στο εξώνιο 17 του γονιδίου, στη θέση 2789, οι αλληλομορφικές συχνότητες C και A μεταξύ των δύο ομάδων όπου κατηγοριοποιήθηκαν τα άτομα, δεν παρουσιάζουν μεγάλη διαφορά για τα ανθεκτικά και μη ανθεκτικά άτομα. Ωστόσο, παρατηρώντας τις γονοτυπικές συχνότητες αυτό που προκύπτει είναι ότι τα αποτελέσματα αυτά δεν ταιριάζουν με τις προηγούμενες μελέτες από τις οποίες ο γονότυπος CC συσχετίστηκε με θερμο-ανθεκτικότητα. Ως γενικό συμπέρασμα που απορρέει από την μελέτη είναι ότι δεν εντοπίστηκε καμία συσχέτιση των παραπάνω γονιδίων με τη θερμο-ανθεκτικότητα.

Σε συνέχεια της παρούσας εργασίας προτείνεται να γίνει πιο εκτεταμένη δειγματοληψία καθώς επίσης και έλεγχος επιπλέον γονιδίων που έχουν συσχετιστεί με θερμο-ανθεκτικότητα. Η χρήση μοριακών τεχνικών που στοχεύουν σε περισσότερες περιοχές του γονιδιώματος, όπως το Whole Genome Sequencing, και οι οποίες αναμένεται να αποκαλύψουν περιοχές που σχετίζονται με εμφάνιση ευαισθησίας ή ανθεκτικότητας στην θερμική καταπόνηση. Ακόλουθο είναι ότι μετά τη συσχέτιση των πολυμορφισμών των αντίστοιχων γονιδίων με τις παραμέτρους που ελέγχουν την θερμο-ανθεκτικότητα, θα μπορέσει να αναπτυχθεί ένα νέο εργαλείο για την ταχεία και αποτελεσματική επιλογή των θερμο-άντοχων ζώων ενός πληθυσμού, κατα τη γέννηση τους κιόλας. Το νέο αυτό εργαλείο είναι οι μοριακοί δείκτες, που θεωρούνται γενικά ως μια βιώσιμη και καινοτόμος λύση για το σοβαρό πρόβλημα που αντιμετωπίζει η βοοτροφία, ως συνέπεια της κλιματικής αλλαγής. Τελικός στόχος θα πρέπει να είναι η δημιουργία πληθυσμών παραγωγικών ζώων με τα επιθυμητά χαρακτηριστικά, έτσι ώστε σε επόμενο στάδιο να μελετηθεί το κατά πόσο το χαρακτηριστικό αυτό είναι κληρονομήσιμο, μέσω σχεδιασμένων συζεύξεων.

5. Βιβλιογραφία

Bhat, S., Kumar, P., Kashyap, N., Deshmukh, B., Dige, M. S., Bhushan, B., … Singh, G. (2016). Effect of heat shock protein 70 polymorphism on thermotolerance in Tharparkar cattle. *Veterinary World*, *9*(2), 113–117. https://doi.org/10.14202/vetworld.2016.113-117

Das, R., Sailo, L., Verma, N., Bharti, P., Saikia, J., Imtiwati, & Kumar, R. (2016). Impact of heat stress on health and performance of dairy animals: A review. *Veterinary World*, *9*(3), 260–268. https://doi.org/10.14202/vetworld.2016.260-268

Das, R., Gupta, I. D., Verma, A., Singh, A., & Chaudhari, M. V. (2015). Genetic polymorphisms in ATP1A1 gene and their association with heat tolerance in Jersey crossbred cows, *68*(1), 50–54.

Dash, S., Chakravarty, A. K., Singh, A., Upadhyay, A., Singh, M., & Yousuf, S. (2016). Effect of heat stress on reproductive performances of dairy cattle and buffaloes: A review. *Veterinary World*, *9*(3), 235–244. https://doi.org/10.14202/vetworld.2016.235-244

Hansen, P. J. (2004). Physiological and cellular adaptations of zebu cattle to thermal stress. *Animal Reproduction Science*, *82–83*, 349–360. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2004.04.011

Hansen, P. J. (2007). Exploitation of genetic and physiological determinants of embryonic resistance to elevated temperature to improve embryonic survival in dairy cattle during heat stress. *Theriogenology*, *68*(SUPPL. 1), 242–249. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.04.008

Jordan, E. R. (2003). Effects of Heat Stress on Reproduction. *Journal of Dairy Science*, *86*, E104–E114. https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)74043-0

Kashyap, N., Kumar, P., Deshmukh, B., Bhat, S., Kumar, A., Chauhan, A., … Sharma, D. (2015). Association of ATP1A1 gene polymorphism with thermotolerance in Tharparkar and Vrindavani cattle. *Veterinary World*, *8*(7), 892–897. https://doi.org/10.14202/vetworld.2015.892-897

Konstantinos, K. V., Panagiotis, P., Antonios, V. T., Agelos, P., & Argiris, N. V. (2008). PCR-SSCP: A method for the molecular analysis of genetic diseases. *Molecular Biotechnology*, *38*(2), 155–163. https://doi.org/10.1007/s12033-007-9006-7

Li, Q., Han, J., Du, F., Ju, Z., Huang, J., Wang, J., … Zhong, J. (2011). Novel SNPs in HSP70A1A gene and the association of polymorphisms with thermo tolerance traits and tissue specific expression in Chinese Holstein cattle. *Molecular Biology Reports*, *38*(4), 2657–2663. https://doi.org/10.1007/s11033-010-0407-5

Liu, Y., Li, D., Li, H., Zhou, X., & Wang, G. (2011). A novel SNP of the ATP1A1 gene is associated with heat tolerance traits in dairy cows. *Molecular Biology Reports*, *38*(1), 83–88. https://doi.org/10.1007/s11033-010-0080-8

Liu, Y. X., Zhou, X., Li, D. Q., Cui, Q. W., & Wang, G. L. (2010). Association of ATP1A1 gene polymorphism with heat tolerance traits in dairy cattle. *Genetics and Molecular Research*, *9*(2), 891–896. https://doi.org/10.4238/vol9-2gmr769

Price, E. M. (1990). Molecular Genetics of Na , K-ATPase.

PR, A. (2017). Role of Heat Shock Proteins in Livestock Adaptation to Heat Stress. *Journal of Dairy, Veterinary & Animal Research*, *5*(1), 1–8. https://doi.org/10.15406/jdvar.2017.05.00127

Polsky, L., & von Keyserlingk, M. A. G. (2017). Invited review: Effects of heat stress on dairy cattle welfare. *Journal of Dairy Science*, *100*(11), 8645–8657. https://doi.org/10.3168/jds.2017-12651

Wang, G., Kawakami, K., & Gick, G. (2007). Divergent signaling pathways mediate induction of Na,K-ATPase α1 and β1 subunit gene transcription by low potassium. *Molecular and Cellular Biochemistry*, *294*(1–2), 73–85. https://doi.org/10.1007/s11010-006-9247-y

Wolfenson, D. (2009). Impact of heat stress on production and fertility of dairy cattle. *Proceedings of the 18th Annual Tri-State Dairy Nutrition Conference*, *XX*(Xx), 5. https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)73803-X