เชียงใหม่สัตวแพทยสาร 2560; 15(1): 1-14. DOI: 10.14456/cmvj.2017.X

เชียงใหม่สัตวแพทยสาร

Chiang Mai Veterinary Journal

ISSN; 1685-9502 (print) 2465-4604 (online)

Website; www.vet.cmu.ac.th/cmvj

บทความปริทัศน์

บทบาทของฮีทช็อคโปรตีน 70 ในการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตของปศุสัตว์

วิชาภรณ์ เลิศวีรพล

หน่วยวิจัยวิทยาการสืบพันธุ์ในสัตว์เลี้ยง คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ถนนนครสวรรค์ ต.ตลาด อ.เมือง จ.มหาสารคาม 44000

บทคัดย่อ ฮีทช็อคโปรตีน 70 (heat shock proteins 70; Hsp70s) เป็นแชเพอโรนโปรตีนที่ช่วยควบคุมการจัดรูปร่างของโปรตีนชนิดอื่น รวมทั้งป้องกันการเกาะกลุ่มของโปรตีน การสังเคราะห์โปรตีนใหม่ การส่งสัญญาณและควบคุมการทำงานของโปรตีน ฮีทช็อคโปรตีนถูกพบในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตทั้งโปรแคริโอตและยูแคริโอต การสร้างฮีทช็อคโปรตีน 70 ที่เพิ่มขึ้นเกิดจากเซลล์เผชิญกับสภาวะความเครียดเนื่องจากความร้อน ในฮีทช็อคโปรตีนจำนวนหลายชนิด พบว่าฮีทช็อคโปรตีน 70 มีบทบาทสำคัญในการแสดงถึงความทนต่อความร้อนของเซลล์ และสามารถใช้ระดับการแสดงออกของยีนฮีทช็อคโปรตีน 70 บ่งบอกความสามารถในการปรับตัวต่อสภาพอากาศร้อนของสัตว์ได้ อาจกล่าวได้ว่าฮีทช็อคโปรตีน 70 เป็นตัวชี้วัดของความทนทานต่อความร้อนในสัตว์ นอกจากนี้ฮีทช็อคโปรตีน 70 ยังมีบทบาทสำคัญในระบบสืบพันธุ์ของทั้งเพศผู้และเมีย โดยเพิ่มความสามารถในการปฏิสนธิของอสุจิ อัตราการรอดชีวิตของอสุจิ การพัฒนาของตัวอ่อน มีความสำคัญในการป้องกันเซลล์เต้านมจากความเครียดเนื่องจากความร้อนและช่วยกระตุ้นการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน พบว่าฮีทช็อคโปรตีน 70 อาจเป็นประโยชน์ในการป้องกันและรักษาโรคการเสื่อมของระบบประสาทและโรคมะเร็งในมนุษย์ ดังนั้นบทความปริทัศน์นี้จึงเขียนขึ้นเพื่อนำเสนองานวิจัยใหม่ที่แสดงให้เห็นถึงบทบาทสำคัญของฮีทช็อคโปรตีน 70 และอาจใช้เป็นแนวทางในการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตของปศุสัตว์ได้ในอนาคต

คำสำคัญ ฮีทช็อคโปรตีน 70, ประสิทธิภาพการผลิต, ปศุสัตว์

* **ผู้รับผิดชอบบทความ** วิชาภรณ์ เลิศวีรพล หน่วยวิจัยวิทยาการสืบพันธุ์ในสัตว์เลี้ยง คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ถนนนครสวรรค์ ต.ตลาด อ.เมือง จ.มหาสารคาม 44000 โทรศัพท์ 043-742823. อีเมล์: wichaporn.l@msu.ac.th

ข้อมูลบทความ *วันที่ได้รับบทความ 27 ธันวาคม พ.ศ.2559 วันที่ได้รับการตีพิมพ์ 19 มกราคม พ.ศ.2560 วันที่ตีพิมพ์ออนไลน์ 23 มกราคม พ.ศ.2560*

Review article

The roles of heat shock proteins 70 in enhancing the productive performances of livestock animals

Wichaporn Lerdweeraphon

Reproduction in Domestic Animals Research Unit Faculty of Veterinary Sciences Mahasarakham University, Talad, Muang, Mahasarakham 44000

Abstract Heat shock proteins 70 (HSP70s) are chaperone proteins that assist a wide range of folding processes, including protein aggregation, newly synthesized proteins, signal transduction, and control of the activity of regulatory proteins. Heat shock proteins are present in all the different subcellular compartments of all cell types of prokaryotes and eukaryotes. The elevated of cellular HSP70s synthesis result from exposing to heat stress. Among the HSPs, HSP70s have a significant role in cell thermotolerance and its expression acts as a potential indicator of animal adaptation to hot climate. It can be said that HSP70s may act as a biomarker of heat tolerance in large animals. In addition, HSP70s also have important roles in both male and female reproductive systems, including enhanced sperm fertilizing ability, survival of spermatozoa, embryo development, mainly responsible for mammary cell protection from heat stress, and stimulate immune system responses. Furthermore, HSP70s can be beneficial in the prevention and treatment of various human neurodegenerative diseases and cancer. Therefore, this review proposes recent evidences and hypotheses suggesting that HSP70s may be important roles in enhancing productive performances of livestock animals in the future.

Keywords; heat shock proteins 70, productive performances, livestock animals

* **Corresponding author:** Wichaporn Lerdweeraphon, Reproduction in Domestic Animals Research Unit, Faculty of Veterinary Sciences Mahasarakham University, Talad, Muang, Mahasarakham 44000 Tel : 043-742823. E-mail; wichaporn.l@msu.ac.th

Article history; received manuscript: 27 December 2016, accepted manuscript: 19 January 2017, published online: 23 January 2017

บทนำ

ความเครียดจากความร้อน (heat stress) เป็นปัญหาสำคัญในประเทศเขตร้อนและร้อนชื้น เช่น ประเทศไทย เนื่องจากส่งผลโดยตรงต่อสุขภาพสัตว์ ลดประสิทธิภาพการผลิต และลดความสามารถในการถ่ายทอดพันธุกรรม (Dobson and Smith, 2000) เช่น ในโคนมพบว่าส่งผลให้ปริมาณน้ำนมลด (Ravagnolo et al., 2000) และความสมบูรณ์พันธุ์ลด (Sartori et al., 2004) ในสุกรพบว่าลดความสมบูรณ์พันธุ์ของแม่สุกรสาวและอัตราการรอดชีวิตของลูกสุกร (Wegner et al., 2014) ดังนั้นปัจจัยด้านสิ่งแวดล้อมโดยเฉพาะอุณหภูมิจึงมีความสำคัญต่อการจัดการฟาร์ม พบว่าผลของความเครียดเนื่องจากความร้อนจะรุนแรงมากขึ้นหากเกิดร่วมกับความชื้นในอากาศสูง (Wegner et al., 2016) ในสัตว์แต่ละสายพันธุ์และแต่ละตัวทนร้อนมีการตอบสนองทางสรีรวิทยาแตกต่างกัน (Hansen, 2014) ทำให้ต้องพยายามรักษาสมดุลอุณหภูมิในร่างกายโดยการเพิ่มการระบายความร้อน ได้แก่ เพิ่มอัตราการหายใจ อัตราการเต้นของหัวใจ และอัตราการขับเหงื่อ (Hansen, 2004) ซึ่งสัตว์ที่เผชิญกับสภาวะเครียดเนื่องจากความร้อนแล้วสามารถปรับอุณหภูมิของร่างกายให้กลับเข้าสู่ค่าปกติได้เร็ว แสดงว่าสัตว์สายพันธุ์นั้นมีความทนร้อนมาก (Paula-Lopes et al., 2003) นอกจากนี้การประเมินความเครียดเนื่องจากความร้อนยังสามารถใช้ค่าดัชนีอุณหภูมิและความชื้น (temperature-humidity index; THI) พิจารณาร่วมกับอัตราการหายใจที่เพิ่มขึ้น ค่าโลหิตวิทยา ค่าชีวเคมีของเลือด และตัวแปรทางความเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress parameters) เป็นตัวชี้วัดความเครียดเนื่องจากความร้อนในกระบือ (Chaudhary et al., 2015) อย่างไรก็ตามภายใต้สภาวะเครียดจากความร้อนพบว่าเซลล์มีการสร้างโปรตีนกลุ่มแชเพอโรน (chaperones) ที่เรียกว่า ฮีทช็อคโปรตีน (heat shock protein, HSPs) โดยเฉพาะฮีทช็อคโปรตีน 70 เพื่อรักษาโครงสร้างของโปรตีนในเซลล์ ช่วยให้โปรตีนในเซลล์ที่เสียหายม้วนพับตัวให้กลับมาสู่สภาพปกติ และช่วยยับยั้งการตายของเซลล์ (Basirico et al., 2011) พบว่าหากเซลล์สร้างฮีทช็อคโปรตีนในปริมาณมากจะแสดงถึงความสามารถทนทานต่อความร้อนได้ดี (Kregel, 2002) จึงสามารถใช้ระดับการแสดงออกของยีนฮีทช็อคโปรตีน 70 จากเซลล์เป็นตัวชี้วัด (biomarker) ความทนทานต่อความร้อนในโค (Basirico et al., 2011) และกระบือได้ (Manjari et al., 2015) นอกจากนี้การให้ฮีทช็อคโปรตีนจากภายนอก (exogenous HSPs) ยังช่วยเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของตัวอสุจิของพ่อพันธุ์สุกรและโค (Elliott et al., 2009) และแกะ (Lloyd et al., 2009) รวมทั้งสามารถป้องกันโรคการเสื่อมของระบบประสาท (neurodegenerative diseases) และโรคมะเร็ง (cancer) ในมนุษย์ (Yurinskaya et al., 2015) ดังนั้นการใช้เทคโนโลยีด้านพันธุศาสตร์โมเลกุล (molecular genetics) โดยการค้นหายีนเครื่องหมายพันธุกรรม (genetic marker) ที่สัมพันธ์กับลักษณะความทนทานต่อความเครียดเนื่องจากความร้อน อาจเป็นแนวทางที่ช่วยเพิ่มความแม่นยำ ช่วยย่นระยะเวลาในการปรับปรุงสายพันธุ์และสามารถแก้ไขปัญหาการผลิตที่ยั่งยืน รวมทั้งการพัฒนาการให้ฮีทช็อคโปรตีนจากภายนอกเพื่อใช้ในการรักษาและป้องกันโรคในปศุสัตว์ ซึ่งอาจใช้เป็นแนวทางในการเพิ่มประสิทธิภาพผลิตของปศุสัตว์ไทยได้

ฮีทช็อคโปรตีนคืออะไร

ในสภาวะปกติภายในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตจะมีโปรตีนชนิดหนึ่งที่เรียกว่า แชเพอโรนโปรตีน ทำหน้าที่ช่วยให้โปรตีนอื่นๆ ที่เซลล์สร้างขึ้นมีการทำงานได้ตามหน้าที่ของโปรตีนแต่ละชนิดได้อย่างเหมาะสม (Ellis, 1987; Hartl, 1996; Haslbeck, 2002) และสามารถพบแชเพอโรนโปรตีน ในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตทั้งโปรแคริโอตและยูแคริโอต (Robert, 2003) โดยแชเพอโรนโปรตีน

เหล่านี้มีความสำคัญต่อการควบคุมสมดุลระหว่างการสร้างและกำจัดโปรตีน ภายในเซลล์ เมื่อเซลล์เผชิญกับสภาวะเครียด เช่น การเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิ การขาดออกซิเจน (hypoxia) การขาดเลือด (ischemia) การได้รับสารโลหะหนัก (heavy metals) การได้รับรังสี (radiation) การขาดกลูโคส (glucose deprivation) มะเร็ง (cancer) การอักเสบ (inflammation) และการติดเชื้อจุลชีพ (microbial infection) จะส่งผลเซลล์มีการตอบสนองต่อสภาวะเครียดเหล่านี้ โดยการสร้างแชเพอโรนโปรตีนหลายชนิด เพิ่มขึ้น เพื่อช่วยป้องกันการเสียสภาพของโปรตีนชนิดอื่น ภายในเซลล์ทำให้เซลล์สามารถดำรงชีวิตต่อไปได้ในสภาวะแวดล้อมนั้น (Sejerkilde et al., 2003) เนื่องจากมีการค้นพบการทำงานของแชเพอโรนโปรตีนเหล่านี้เป็นครั้งแรกจากเซลล์ที่ได้รับการกระตุ้นด้วยความร้อนจึงเรียกแชเพอโรนโปรตีนเหล่านี้อีกชื่อหนึ่งว่า ฮีทช็อคโปรตีน โดยฮีทช็อคโปรตีนที่พบในเซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมอาจแบ่งได้ออกเป็น 6 ประเภทตามน้ำหนักโมเลกุล (molecular weights) ตั้งแต่ 10–150 กิโลดาลตัน (kDa) ได้แก่ HSP100, HSP90, HSP70, HSP60, HSP40 และ small HSPs ซึ่ง small HSPs มีน้ำหนักโมเลกุลตั้งแต่ 15-30 กิโลดาลตัน เช่น HSP27 โดยประเภทของฮีทช็อคโปรตีนเหล่านี้สามารถพบในเซลล์และมีหน้าที่แตกต่างกันไป (Kregel, 2002) (Table 1) ฮีทช็อคโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลมากจะเป็นแชเพอโรนที่ทำงานขึ้นอยู่กับเอทีพี (ATP-dependent chaperones) ส่วนฮีทช็อคโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลน้อย จะทำงานโดยไม่ขึ้นอยู่กับเอทีพี (ATP-independent fashion) (Jego et al., 2013) เมื่อเซลล์ถูกกระตุ้นโดยความเครียดทางสรีรวิทยาและทางกายภาพ (physiological and physical stressors) จะส่งผลให้เซลล์เกิดการตอบสนองโดยการสร้างฮีทช็อคโปรตีนเพิ่มขึ้น เพื่อควบคุมการจัดรูปร่างโปรตีน โดยเฉพาะอย่างยิ่งช่วยป้องกันการเกาะกลุ่มของโปรตีน (protein aggregation) และการจัดรูปร่างของโปรตีนใหม่ (refolding of misfolded proteins) (Csermely et al., 1998)

ในกลุ่มของฮีทช็อคโปรตีนทั้งหมดพบว่าฮีทช็อคโปรตีน 70 ไวต่อการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิมากที่สุด (Kregel, 2002) โดยอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้นจะกระตุ้นให้สร้างฮีทช็อคโปรตีน 70 (inducible Hsp70) ในเซลล์มากขึ้น เพื่อให้เซลล์มีความสามารถทนต่อความร้อน (thermotolerance) โดยการลดโพลีเปปไทด์ที่ความเสียหายและผิดปกติในเซลล์ (Parsell et al., 1993) ซึ่งสนับสนุนโดยการศึกษาเมื่อไม่นานมานี้ที่พบว่า จีโนไทป์เอเอ (genotype AA) ในส่วนของยีนฮีทช็อคโปรตีน 70 ถูกพบมากที่สุดในโคที่ทนต่อความร้อน (heat tolerance) ดังนั้นโพลีมอร์ฟิสม์ทางพันธุกรรม (polymorphism) ของฮีทช็อคโปรตีน 70 จึงสามารถใช้ประเมินความทนร้อนในโคและอาจช่วยในการคัดเลือกพันธุ์โคที่ทนต่อความร้อนได้ (Bhat et al., 2016) นอกจากนี้ฮีทช็อคโปรตีน 70 ยังเป็นหนึ่งในประเภทของฮีทช็อคโปรตีนที่ได้รับความสนใจและมีการศึกษาวิจัยอย่างมาก (Todryk et al., 2003) เนื่องจากฮีทช็อคโปรตีน 70 มีส่วนของโมเลกุลที่ใช้ในการจับกับแชเพอโรนอื่น ทำให้สามารถออกฤทธิ์ได้กว้าง (broad spectrum) ดังนั้นจึงมีการศึกษาที่พบว่าฮีทช็อคโปรตีน 70 มีบทบาทสำคัญในการยับยั้งกระบวนการตายของเซลล์ (inhibition of apoptosis)(Wang et al., 2014) มีการศึกษาที่พบว่าฮีทช็อคโปรตีน 70 สามารถป้องกันกระบวนการตายของเซลล์ประสาทที่ได้รับเชื้อเลนทิไวรัส (lentivirus) โดยการรักษาระดับแคลเซียมไอออนในเซลล์ (maintaining cellular Ca^{2+} homeostasis) ซึ่งการแสดงออกของฮีทช็อคโปรตีน 70 ที่เพิ่มขึ้น (HSP70 overexpression) จะทำให้เพิ่มระดับ mRNA expression ของ sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca^{2+}-ATPase (SERCA) และลดระดับโปตีนและ mRNA ของ inositol 1,4,5-trisphosphate receptor (IP3R) ดังนั้นจึงเป็นกลไกที่ช่วยลดระดับแคลเซียมไอออนในเซลล์ (intracellular $Ca2^{+}$

concentration) หลังจากที่เซลล์อยู่ในภาวะ ischemia-hypoxia/reoxygenation (Liu et al., 2016)

มีการศึกษาที่แสดงให้เห็นว่าฮีทช็อคโปรตีน 70 มีบทบาทสำคัญในการกระตุ้นการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน โดยมีการศึกษาที่พบว่าฮีทช็อคโปรตีน 70 สามารถกระตุ้นการทำงาน natural killer (NK) cells เพื่อทำลายเซลล์มะเร็ง (Elsner et al., 2010) นอกจากนี้ฮีทช็อคโปรตีน 70 ยังสามารถเปลี่ยนการทำงานของระบบมิคุ้มกัน (immunomodulating effects) โดยเกี่ยวข้องกับการสร้างและการหลั่ง tumor growth factor–α (TNF-α), interleukin-1β, interleukin-6, และ interleukin-12 (Asea et al., 2000; Quintana and Cohen, 2005) และฮีทช็อคโปรตีน 70 ยังมีบทบาทลดการอักเสบที่เกี่ยวข้องกับการกระตุ้นการสร้าง proinflammatory cytokine เช่น interleukin-10 (IL-10) (Borges et al., 2012) ซึ่งสนับสนุนโดยการศึกษาเมื่อไม่นานมานี้พบว่าการให้ฮีทช็อคโปรตีน 70 จากภายนอกสามารถลดการอักเสบในทางเดินหายใจของหนูทดลองซึ่งได้รับเอ็นโดท็อกซินจากแบคทีเรีย (Shevchenko et al., 2016) ยิ่งไปกว่านี้ฮีทช็อคโปรตีน 70 อาจเป็นประโยนช์ในการรักษาโรคมะเร็ง (Guzhova and Margulis, 2016; Kumar et al., 2016) โดยมีการศึกษาที่พบว่าเปปไทด์วัคซีนที่ผลิตจากฮีทช็อคโปรตีน 70 สามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งตับ (hepatocellular carcinoma) โดยการกระตุ้นการทำงาน T-lymphocyte ในหนูทดลอง (Wang et al., 2016)

Table 1 Cellular locations and proposed functions of mammalian heat shock protein families (Kregel, 2002)

HSP Family	Cellular Location	Proposed Function
HSP27 (sHSP)	Cytosol, nucleus	Microfilament stabilization, antiapoptotic
HSP60	Mitochondria	Refolds proteins and prevents aggregation of denatured proteins, proapoptotic
HSP70 family:		Antiapoptotic
HSP72 (Hsp70)	Cytosol, nucleus	Protein folding, cytoprotection
HSP73 (Hsc70)	Cytosol, nucleus	Molecular chaperones
HSP75 (mHSP70)	Mitochondria	Molecular chaperones
HSP78 (GRP78)	ER	Cytoprotection, molecular chaperones
HSP90	Cytosol, ER, nucleus	Regulation of steroid hormone receptors, protein translocation
HSP110/104	Cytosol	Protein folding

HSP, heat shock protein; sHSP, small HSP; ER, endoplasmic reticulum.

โครงสร้าง หน้าที่ และกลไลการทำงานของฮีทช็อคโปรตีน 70

ฮีทช็อคโปรตีน 70 (Hsp70s) คือ ฮีทช็อคโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 70 กิโลดาลตัน ซึ่งมีโมเลกุลที่ประกอบด้วยส่วนของปลายด้านเอ็นซึ่งเป็นส่วนที่ใช้จับกับ ATP (N-terminal ATPase domain, ABD) และส่วนปลายด้านซี (C-terminal หรือ carboxyl terminal) หรือเรียกว่า peptide binding domain (PBD) (Figure 1) โดย EEVD domain ที่ส่วนปลายด้านซีทำหน้าที่ในการจับกับซับสเตรท (substrate binding/refolding) โดยส่วนของปลายด้านเอ็นจะถูกกระตุ้นให้เกิดเอทีพีไฮโดรไลซีส (ATP hydrolysis) จากนั้นแชเพอโรนอื่น (co-chaperones) จะจับกับฮีทช็อคโปรตีน 70 และควบคุมการทำงานของฮีทช็อคโปรตีน 70 โดยฮีทช็อคโปรตีน 70 จะจับกับแชเพอโรนอื่นซึ่งมีอยู่ 3 ประเภท แชเพอโรนอื่นประเภทที่หนึ่งคือ J-domain ซึ่งก็คือ Hsp40 ที่จับกับส่วนของปลายด้านเอ็นหรือ ABD ในฮีทช็อคโปรตีน 70 และกระตุ้นการทำงานของ low ATPase แชเพอโรนอื่นประเภทที่สองคือ nucleotide exchange factors ได้แก่ Bag-1, Hsp110 และ HspBP1 ซึ่งแชเพอโรนอื่นประเภทนี้ช่วยเร่งการปล่อย ADP และทำให้วงจรเอทีพีเอส (ATPase cycle) ของฮีทช็อคโปรตีน 70 เกิดขึ้นสมบูรณ์ และแชเพอโรนอื่นประเภทที่สามคือ TPR domain ได้แก่ Hop, Hdj-1 และ CHIP ซึ่งจะจับกับส่วนปลายซี (C-terminal EEVD motif) ของทั้งฮีทช็อคโปรตีน 70 และ 90 และช่วยให้เกิด Hsp70 และ Hsp90 complexes (Figure 1)

ฮีทช็อคโปรตีน 70 เป็นแชเพอโรนโปรตีน ที่ช่วยควบคุมการจัดรูปร่างของโปรตีนอื่น (protein folding) ป้องกันการเกาะกลุ่มของโปรตีน การสังเคราะห์โปรตีนใหม่ การหลั่งโปรตีน และควบคุมการทำงานของโปรตีน (Hartl and Hayer-Hartl, 2002) ดังนั้นฮีทช็อคโปรตีน 70 จึงเปรียบเสมือน housekeeper ในเซลล์ที่คอยจัดรูปร่างโปรตีนใหม่ นำส่งสัญญาณ (signal transduction) ควบคุมการทำหน้าที่ของโปรตีน และช่วยในการม้วนพับโปรตีนให้กลับคืนสู่สภาพปกติ (Kumar et al., 2016)(Figure 2)

การทำงานของฮีทช็อคโปรตีน 70 ในเซลล์ให้มีประสิทธิภาพจะต้องอาศัยปัจจัยหลายประการ ประการแรกคือการเพิ่มจำนวน (amplification) และความหลากหลาย (diversification) ของยีนฮีทช็อคโปรตีน 70 ซึ่งทำหน้าสังเคราะห์แชเพอโรนโปรตีนชนิดฮีทช็อคโปรตีน 70 ประการที่สองคือมีแชเพอโรนโปรตีนอื่นที่ช่วยคัดเลือกแชเพอโรนโปรตีนชนิดฮีทช็อคโปรตีน 70 ที่สามารถทำหน้าที่ได้อย่างเต็มที่ และประการที่สามคือการทำงานประสานกันระหว่างแชเพอโรนโปรตีนชนิดฮีทช็อคโปรตีน 70 และแชเพอโรนอื่นเพื่อให้ทำงานได้กว้างขึ้น (broad spectrum) ดังนั้นประสิทธิภาพการทำงานของแชเพอโรนโปรตีนชนิดฮีทช็อคโปรตีน 70 จึงขึ้นกับการทำงานของแชเพอโรนโปรตีนอื่น (co-chaperones) ดังที่กล่าวมาแล้วข้างต้น เพื่อสร้างระบบกลไกในการทำหน้าที่จัดรูปร่างของโปรตีนให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น

นอกจากฮีทช็อคโปรตีน 70 จะมีหน้าที่พิเศษในการควบคุมการจัดรูปร่างของโปรตีนโพลีเปปไทด์ใหม่ (de novo folding) และโปรตีนที่ส่งสัญญาณภายในเซลล์ (signaling transduction proteins) แล้ว ฮีทช็อคโปรตีน 70 ยังช่วยควบคุมการจัดรูปร่างของแบคทีเรียโปรตีนประมาณร้อยละ 10–20 โดยขึ้นอยู่กับประสิทธิภาพของฮีทช็อคโปรตีน 70 ซึ่งสัมพันธ์กับขนาดของโปรตีน (Bukau et al., 2000) ซึ่งขนาดของโปรตีนโดยเฉลี่ยของเซลล์ยูแคริโอต ในคนประมาณ 52 กิโลดาลตัน และแบคทีเรีย (*E. coli*) ประมาณ 35 กิโลดาลตัน (Cagney et al., 2003) ดังนั้นจึงเชื่อว่าฮีทช็อคโปรตีน 70 น่าจะมีบทบาทควบคุมการจัดรูปร่างของโปรตีนใหม่ในเซลล์ยูแคริโอต โดยเฉพาะเซลล์ยูแคริโอตที่มีขนาดใหญ่ ยิ่งไปกว่านั้นพบว่าฮีทช็อคโปรตีน 70

ยังทำหน้าที่ควบคุมโปรตีนกลายพันธุ์ เช่น p53 ที่กลายพันธุ์ (mutant p53) (Gaiddon et al., 2001) และเอนไซม์ซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทสที่กลายพันธุ์ (mutant superoxide dismutase) (Shinder et al., 2001) ทำให้ฮีทช็อคโปรตีน 70 จะต้องทำงานประสานกับโปรตีนชนิดอื่น เช่น โปรตีน Bcl-2 โดยมีการศึกษาที่พบว่าฮีทช็อคโปรตีน 70 มีผลต่อการถอดรหัส (transcription) ของโปรตีน Bcl-2 ซึ่งโปรตีน Bcl-2 มีบทบาทในการควบคุมกระบวนการตายของเซลล์ (apoptosis) โดยผ่านทางการควบคุมการหลั่ง caspase activators ซึ่งเรียกโปรตีน Bcl-2 ว่าเป็น tumor suppressor protein p53 โดยฮีทช็อคโปรตีน 70 สามารถสร้างพร้อมกับ p53 ที่กลายพันธุ์ เพื่อกระตุ้น apoptosis ของ DNA damage ดังนั้นฮีทช็อคโปรตีน 70 จึงสามารถควบคุม p53 ที่กลายพันธุ์ได้ (Zylicz et al., 2001)แต่อย่างไรก็ตามบทบาทสำคัญของฮีทช็อคโปรตีน 70 สามารถทำหน้าที่ได้อย่างมีประสิทธิภาพเมื่อเซลล์เผชิญกับภาวะเครียดเนื่องจากความร้อน (Krueger et al., 1999) โดยพบว่าหากเซลล์สร้างฮีทช็อคโปรตีน 70 ในปริมาณมากจะแสดงถึงความทนทานต่อความร้อน (thermotolerance) ได้ดี (Kregel, 2002) ซึ่งเกิดจากกลไกการส่งสัญญาณทางสรีรวิทยา (physiological signals) มากระตุ้นการสร้างฮีทช็อคโปรตีน 70 และเพิ่มการแสดงออกของยีนฮีทช็อคโปรตีน 70 (Hsp70 expression) ในเซลล์ โดยพบว่าในไซโทพลาซึมมี Heat shock factors (HSFs) จับกับ heat shock proteins (HSPs) ซึ่งอยู่ในภาวะไม่ทำงาน (inactive state) เมื่อเซลล์ได้รับการกระตุ้นจากความเครียด (stressors) ส่งผลกระตุ้น HSFs ให้อยู่ในภาวะทำงาน (active state) และทำให้แยกตัวออกจาก HSPs จากนั้น HSFs จะถูกฟอสฟอริเลท (phosphorylated, P) โดยเอนไซม์โปรตีนไคเนส (protein kinases) และสร้างเป็น HSF trimer complexes ในไซโทพลาซึม โดย HSF trimer complexes เหล่านี้จะเข้าสู่นิวเครียสและจับกับ heat shock elements (HSE) ที่ตำแหน่ง promoter region ของยีนฮีทช็อคโปรตีน 70 จากนั้น Hsp70 mRNA จะถูกถอดรหัสและออกจากนิวเคลียสเข้าสู่ไซโทพลาซึม ซึ่งจะเกิดฮีทช็อคโปรตีน 70 ใหม่เพิ่มขึ้น จากนั้นฮีทช็อคโปรตีน 70 ใหม่เหล่านี้จะไปช่วยซ่อมแซมและจัดรูปร่างโปรตีนที่เสียหาย (stress-denatured proteins) (Figure 3) ซึ่งความทนทานต่อความร้อนของสัตว์สามารถถ่ายทอดทางพันธุกรรมได้ (Hansen, 2014) และสามารถใช้ระดับการแสดงออกของยีนฮีทช็อคโปรตีน 70 จากเซลล์เม็ดเลือดขาว (peripheral blood mononuclear cells) เป็นตัวชี้วัด (biomarker) ความทนทานต่อความร้อนในโค (Basirico et al., 2011) โดยการศึกษาในกระบือพบว่าระดับการแสดงออกของยีนฮีทช็อคโปรตีน 70 (relative expression values) จากเซลล์เม็ดเลือดขาว ซึ่งวัดด้ยวิธี Real-time PCR ในช่วงฤดูร้อน (2.37±0.12) มีค่าสูงกว่าในช่วงฤดูหนาว (0.29±0.04) อย่างมีนัยสำคัญ และสามารถใช้การแสดงออกของยีนฮีทช็อคโปรตีน 70 เป็นตัวชี้วัดความทนทานต่อความร้อนในกระบือได้ (Manjari et al., 2015)

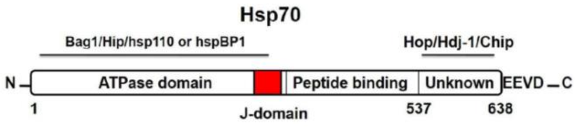

Figure 1 Structure of Hsp70 with sites of action N-terminal shows ATPase domain with associated co-chaperones (Bag1/Hip/hsp110 or hspBP1). However, C-terminal represents EEVD domain with its co-chaperone (Hop/Hdj-1/Chip) and peptide binding domain. J-domain localizes in the central approximately. (Kumar et al., 2016)

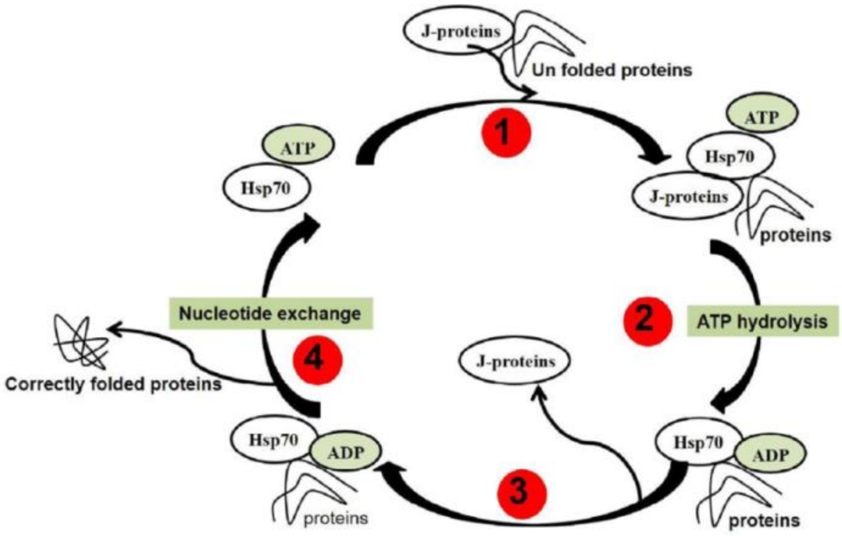

Figure 2 Diagrammatic presentation of the chaperone functions of Hsp70. Hsp70 binds to unfolded protein in the presence of J-proteins using ATP. ATP hydrolysis stimulates J-protein release that further led to release of correctly folded protein(s) and Hsp70 become available for next cycle. (Kumar et al., 2016)

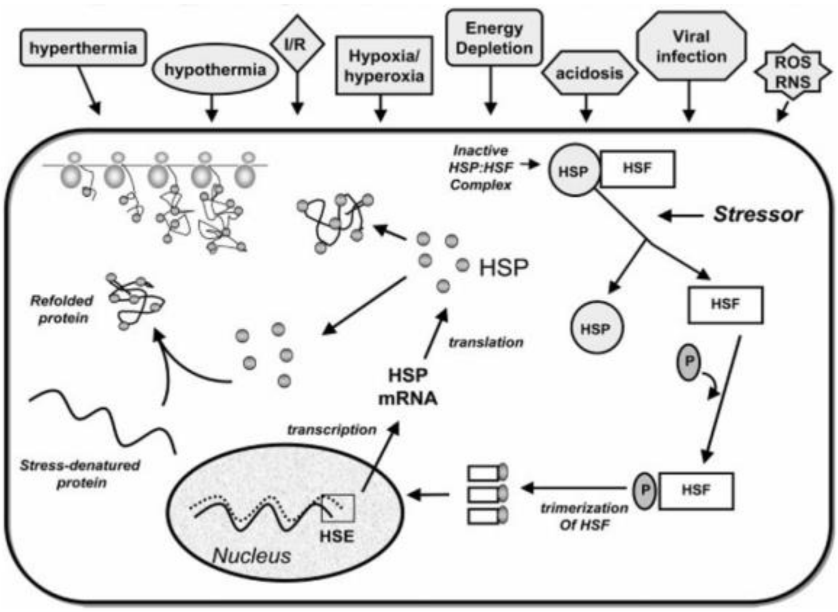

Figure 3 Physiological signals that activate heat shock protein 70 synthesis and expression (Kregel, 2002)

บทบาทของฮีทช็อคโปรตีน 70 ในการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตของปศุสัตว์

นอกจากฮีทช็อคโปรตีน 70 จะมีบทบาทในการป้องกันความเครียดเนื่องจากความร้อนของเซลล์ ในร่างกายสัตว์แล้ว มีงานวิจัยที่พบว่าฮีทช็อคโปรตีน 70 มีบทบาทสำคัญต่อระบบสืบพันธุ์ทั้งในสัตว์เพศผู้และเพศเมีย ในสุกรพบว่าฮีทช็อคโปรตีน 70 มีส่วนช่วยในการปฏิสนธิของตัวอสุจิ (Spinaci et al., 2005) และเพิ่มคุณภาพน้ำเชื้อ (Huang et al., 2000) โดยการศึกษานอกกาย (*in vitro*) พบว่าการให้ฮีทช็อคโปรตีนจากภายนอก (exogenous HSPs) ช่วยเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของอสุจิสุกร โค (Elliott et al., 2009) และแกะ (Lloyd et al., 2009) การศึกษาในสุกรพ่อพันธุ์โดยการเสริมฮีทช็อคโปรตีน 70 หรือ HSPA8 ในสารละลาย sAPM (soluble fraction of oviductal apical plasma membrane proteins) ที่ความเข้มข้น 0.1, 0.5 และ 4 μg/ml แล้วเติมลงในน้ำเชื้ออสุจิบ่มที่อุณหภูมิ 39 องศาเซลเซียส เมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง พบว่ากลุ่มที่เสริมฮีทช็อคโปรตีน 70 ที่ความเข้มข้น 0.1 และ 0.5 μg/ml มีค่าดัชนีการรอดชีวิตของตัวอสุจิ (viability index) สูงกว่ากลุ่มควบคุม (มีเฉพาะสารละลาย sAPM 200 mg/ml อย่างเดียว) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนการศึกษาในโคพ่อพันธุ์โดยการเสริมฮีทช็อคโปรตีน 70 หรือ HSPA8 ในสารละลาย sAPM ที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ 0.1, 0.5 , 1 และ 4 μg/ml แล้วเติมลงในน้ำเชื้ออสุจิบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เมื่อเวลาผ่านไป 48 ชั่วโมง พบว่าที่ความเข้มข้น 0.5 , 1 และ 4 μg/ml มีค่าดัชนีการรอดชีวิตของตัวอสุจิ สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการให้ฮีทช็อคโปรตีนจากภายนอกช่วยให้อสุจิมีชีวิตอยู่ในท่อทางเดินระบบสืบพันธุ์เพศเมียได้นานขึ้น โดยกลไกที่เป็นไปได้คือ ฮีทช็อคโปรตีนช่วยเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของอสุจิ โดยการเพิ่มการจับของอสุจิที่เซลล์เยื่อบุท่อนำไข่ (oviductal epithelial cells) และลดการทำงานของไมโทคอนเดรียของอสุจิ (Moein-Vaziri et al., 2014) จากข้อมูลดังกล่าวชี้ให้เห็นว่าฮีทช็อคโปรตีน 70 น่าจะช่วยสนับสนุนการปฏิสนธิภายนอกร่างกาย (*in vitro* fertilization, IVF) ให้ประสบผลสำเร็จมากยิ่งขึ้น นอกจากนี้ฮีทช็อคโปรตีน 70 ยังสามารถซ่อมแซมเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้เพิ่มสภาพของไหลของเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิ (sperm membrane fluidity) ดังนั้นจึงเชื่อว่าฮีทช็อคโปรตีน 70 ช่วยป้องกันการตายของอสุจิโดยผ่านกลไกการซ่อมแซมเยื่อหุ้มเซลล์ (membrane repair mechanisms) (Moein-Vaziri et al., 2014) โดยกลไกนี้เชื่อว่าเกิดจากฮีทช็อคโปรตีน 70 ยับยั้ง lysosomal membrane permeabilization (LMP) ส่งผลให้ลดการหลั่งเอนไซม์ไลโซโซมเข้าสู่ไซโทพลาซึม จึงเป็นการป้องกันการย่อยสลายของเยื่อหุ้มเซลล์ (Horvath et al., 2008)

การศึกษาเมื่อไม่นานมานี้พบว่าฮีทช็อคโปรตีน 70 มีส่วนช่วยในการพัฒนาของตัวอ่อนในระยะแรกในกระบือ (Sadeesh et al., 2016) สอดคล้องกับการศึกษาในมนุษย์ (Grigore and Indrei, 2001) และในโค (de Oliveira et al., 2005) ที่พบว่ามีการแสดงออกของยีนฮีทช็อคโปรตีนในช่วงการพัฒนาของเซลล์สืบพันธุ์เพศเมีย (oogenesis) และการพัฒนาของเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ (spermatogenesis) รวมถึงในระยะแรกของการตั้งท้อง การพัฒนาของตัวอ่อน (de Oliveira et al., 2005) และการฝังตัวของตัวอ่อนในกรณีการปฏิสนธิภายนอกร่างกาย (Grigore and Indrei, 2001) นอกจากนี้ฮีทช็อคโปรตีน 70 ยังมีบทบาทต่อการพัฒนาระบบสืบพันธุ์เพศเมีย โดยการศึกษาในสุกรพบว่าฮีทช็อคโปรตีนถูกสร้างในเซลล์ฟอลลิคูลาร์แกรนูโลซาของรังไข่ (ovarian follicular granulosa cells) โดยความเครียดเนื่องจากความร้อนจะกระตุ้นการแสดงออกของยีน HSP70.2, HSP72 และ HSP105/110 และทำให้ระดับของฮีทช็อคโปรตีน70 ในเซลล์รังไข่ (ovarian cells) ลดลง ดังนั้นจึงสามารถใช้

ฮีทช็อคโปรตีน 70 เป็นตัวบ่งชี้การทำงานของรังไข่ในการผลิตฮอร์โมนเพศ และสามารถใช้ฮีทช็อคโปรตีนเป็นสารต่อต้านความเครียด (anti-stressor molecules) (Sirotkin and Bauer, 2011) การศึกษาในโคนมพบว่าความเครียดเนื่องจากความร้อนจะกระตุ้นการสร้างฮีทช็อคโปรตีนและส่งผลให้การสร้างโปรตีนในน้ำนมลดลง โดยฮีทช็อคโปรตีน 70 จะไวต่อความเครียดเนื่องจากความร้อนอย่างมากและมีบทบาทสำคัญในการป้องกันเซลล์เต้านม จากความเครียดเนื่องจากความร้อน โดยการศึกษาในเซลล์เต้านมของโคนม ซึ่งได้รับความร้อนที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0.5, 1, 3, 5, 8 และ 12 ชั่วโมง พบว่ามีการถอดรหัสของยีน HSP27, HSP70 และ HSP90 เพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (โดยที่อุณหภูมิ 38 องศาเซลเซียสคือกลุ่มควบคุม) และการถอดรหัสของยีน HSP70 เพิ่มขึ้นสูงสุดเป็น 14 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่เวลา 1 ชั่วโมง นอกจากนี้การแสดงออกของยีนโปรตีนในน้ำนม (milk protein genes) และการสร้างโปรตีนเคซีอิน (caseins) ลดลง หลังจากเซลล์เต้านมได้รับความร้อนที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-5 ชั่วโมง (Hu et al., 2016)

นอกจากนี้การศึกษาในกระบือแม่น้ำพบว่าเซลล์เต้านม ที่ได้รับความร้อนที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จะลดการอยู่รอดของเซลล์และ การแบ่งเซลล์ และกระตุ้นการตายของเซลล์เต้านม (cellular apoptosis and necrosis) และพบการแสดงออกของยีน HSP40, HSP60, HSP70, HSP90 และ HSPB1 ซึ่งสัมพันธ์กับยีนภูมิคุ้มกัน (immune system genes) ได้แก่ IL6, TNFα และ NF-kβ และสัมพันธ์กับความเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) ได้แก่ glutathione peroxidase และ dual specificity phosphatase ซึ่งแสดงให้เห็นว่าความเครียดเนื่องจากความร้อนส่งผลให้เกิดการตอบสนองของเซลล์เต้านมโดยผ่านทางการแสดงออกของยีนฮีทช็อคโปรตีนซึ่งสัมพันธ์กับระบบภูมิคุ้มกัน (Kapila et al., 2016) แต่อย่างไรก็ตาม กลไกการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันในเซลล์เต้านมต่อความเครียดเนื่องจากความร้อนยังไม่ทราบแน่ชัด

ในช่วงสิบปีที่ผ่านมามีงานวิจัยที่ศึกษาเกี่ยวกับการให้ฮีทช็อคโปรตีน 70 จากภายนอก (exogenous Hsp70) แก่สัตว์ทดลองเพื่อพัฒนาการรักษาและป้องกันโรคต่างๆ เช่น การเสื่อมของระบบประสาท และโรคมะเร็งในมนุษย์ (Yurinskaya et al., 2015) การศึกษาในหนูทดลองพบว่าการให้ฮีทช็อคโปรตีน 70 ที่ได้จากมนุษย์ (exogenous recombinant human Hsp70, eHsp70) โดยทางจมูก (intranasal administration) เป็นเวลา 9 เดือนในหนูอายุมาก โดยกลุ่มที่ได้รับ eHsp70 มีอายุขัยเฉลี่ยเท่ากับ 686.1 ± 20.73 วัน มากกว่ากลุ่มควบคุม (อายุเฉลี่ยเท่ากับ 632.0 ± 18.29 วัน) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และการทดสอบความจำด้วยวิธี Morris water maze พบว่ากลุ่มหนูอายุมากที่ได้รับ eHsp70 เป็นเวลา 5 และ 9 เดือนสามารถใช้เวลาในการจำ (time spent in each sector of the Morris water maze) โดยการค้นหา platform เท่ากับ 16 ± 2.5 และ 13 ± 2.7 วินาที ซึ่งน้อยกว่ากลุ่มควบคุม (ใช้เวลาค้นหา platform เท่ากับ 20 ± 3.4 และ 18 ± 2.7 วินาที) อย่างมีนัยสำคัญ

ดังนั้นการให้ฮีทช็อคโปรตีน 70 ในระยะยาวสามารถเพิ่มอายุขัย ความสามารถในการเรียนรู้และความจำในหนูทดลองที่อายุมากได้ (Bobkova et al., 2015) ซึ่งจากการศึกษานี้ก็อาจใช้เป็นแนวทางในการพัฒนาฮีทช็อคโปรตีน 70 เพื่อการรักษาโรคการเสื่อมของระบบประสาทในผู้ป่วยสูงอายุได้ และอาจใช้เป็นแนวทางในการศึกษาและพัฒนาฮีทช็อคโปรตีน 70 เพื่อใช้ในการป้องกันและรักษาโรคในปศุสัตว์ได้ รวมทั้งการใช้ระดับการแสดงออกของยีนฮีทช็อคโปรตีน 70 เป็นตัวชี้วัดทางชีวภาพ ผลของความเครียดเนื่องจากความร้อนในสัตว์ปศุสัตว์ โดยการวัดระดับการแสดงออกของยีนฮีทช็อคโปรตีน 70 ด้วยวิธี Real-time PCR ในเซลล์เม็ดเลือดขาว ซึ่งระดับการแสดงออกของยีนของฮีทช็อค

โปรตีน 70 ในช่วงฤดูร้อนควรสูงกว่าฤดูหนาวประมาณ 2 เท่า จึงจะสามารถใช้บ่งบอกความทนทานต่อความร้อนของสัตว์ได้ (Manjari et al., 2015) และอาจเป็นแนวทางในการปรับปรุงและคัดเลือกพันธุ์สัตว์ให้มีความทนทานต่อความร้อน และอาจส่งผลให้เพิ่มประสิทธิภาพการผลิตปศุสัตว์

บทสรุป

จากข้อมูลที่กล่าวมาข้างต้นสรุปได้ว่า ฮีทช็อคโปรตีน 70 มีบทบาทสำคัญในการป้องกันความเครียดเนื่องจากความร้อนของเซลล์ในร่างกายสัตว์ มีบทบาทสำคัญในการเพิ่มอัตราการรอดของอสุจิ การพัฒนาของตัวอ่อน การส่งสัญญาณไปกระตุ้นการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันในร่างกาย การป้องกันและรักษาโรคทางระบบประสาทและโรคมะเร็ง และสามารถใช้เป็นตัวชี้วัดความเครียดเนื่องจากความร้อนซึ่งแสดงถึงความทนทานต่อความร้อนในสัตว์ใหญ่ได้ ดังนั้นหากมีการศึกษาวิจัยบทบาทของฮีทช็อคโปรตีน 70 ในวงการปศุสัตว์ให้มากขึ้น ก็อาจเป็นแนวทางในการเพิ่มผลผลิต การพัฒนาในการป้องกันและรักษาโรค การปรับปรุงและคัดเลือกพันธุ์ของปศุสัตว์ได้ในอนาคต

เอกสารอ้างอิง

Asea, A., Kraeft, S.K., Kurt-Jones, E.A., Stevenson, M.A., Chen, L.B., Finberg, R.W., Koo, G.C., Calderwood, S.K., 2000, HSP70 stimulates cytokine production through a CD14-dependant pathway, demonstrating its dual role as a chaperone and cytokine. Nat Med 6, 435-442.

Basirico, L., Morera, P., Primi, V., Lacetera, N., Nardone, A., Bernabucci, U., 2011, Cellular thermotolerance is associated with heat shock protein 70.1 genetic polymorphisms in Holstein lactating cows. Cell Stress Chaperones 16, 441-448.

Bhat, S., Kumar, P., Kashyap, N., Deshmukh, B., Dige, M.S., Bhushan, B., Chauhan, A., Kumar, A., Singh, G., 2016, Effect of heat shock protein 70 polymorphism on thermotolerance in Tharparkar cattle. Vet World 9, 113-117.

Bobkova, N.V., Evgen'ev, M., Garbuz, D.G., Kulikov, A.M., Morozov, A., Samokhin, A., Velmeshev, D., Medvinskaya, N., Nesterova, I., Pollock, A., Nudler, E., 2015, Exogenous Hsp70 delays senescence and improves cognitive function in aging mice. Proc Natl Acad Sci U S A 112, 16006-16011.

Borges, T.J., Wieten, L., van Herwijnen, M.J., Broere, F., van der Zee, R., Bonorino, C., van Eden, W., 2012, The anti-inflammatory mechanisms of Hsp70. Front Immunol 3, 95.

Bukau, B., Deuerling, E., Pfund, C., Craig, E.A., 2000, Getting newly synthesized proteins into shape. Cell 101, 119-122.

Cagney, G., Amiri, S., Premawaradena, T., Lindo, M., Emili, A., 2003, In silico proteome analysis to facilitate proteomics experiments using mass spectrometry. Proteome Sci 1, 5.

Chaudhary, S.S., Singh, V.K., Upadhyay, R.C., Puri, G., Odedara, A.B., Patel, P.A., 2015, Evaluation of physiological and biochemical responses in different seasons in Surti buffaloes. Vet World 8, 727-731.

Csermely, P., Schnaider, T., Soti, C., Prohaszka, Z., Nardai, G., 1998, The 90-kDa molecular chaperone family: structure, function, and clinical applications. A comprehensive review. Pharmacol Ther 79, 129-168.

de Oliveira, A.T., Lopes, R.F., Rodrigues, J.L., 2005, Gene expression and developmental competence of bovine embryos produced in vitro under varying embryo density conditions. Theriogenology 64, 1559-1572.

Dobson, H., Smith, R.F., 2000, What is stress, and how does it affect reproduction? Anim Reprod Sci 60-61, 743-752.

Elliott, R.M., Lloyd, R.E., Fazeli, A., Sostaric, E., Georgiou, A.S., Satake, N., Watson, P.F., Holt, W.V., 2009, Effects of HSPA8, an evolutionarily conserved oviductal protein, on boar and bull spermatozoa. Reproduction 137, 191-203.

Ellis, J., 1987, Proteins as molecular chaperones. Nature 328, 378-379.

Elsner, L., Flugge, P.F., Lozano, J., Muppala, V., Eiz-Vesper, B., Demiroglu, S.Y., Malzahn, D., Herrmann, T., Brunner, E., Bickeboller, H., Multhoff, G., Walter, L., Dressel, R., 2010, The endogenous danger signals HSP70 and MICA cooperate in the activation of cytotoxic effector functions of NK cells. J Cell Mol Med 14, 992-1002.

Gaiddon, C., Lokshin, M., Ahn, J., Zhang, T., Prives, C., 2001, A subset of tumor-derived mutant forms of p53 down-regulate p63 and p73 through a direct interaction with the p53 core domain. Mol Cell Biol 21, 1874-1887.

Grigore, M., Indrei, A., 2001, The role of heat shock proteins in reproduction. Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi 105, 674-676.

Guzhova, I.V., Margulis, B.A., 2016, HSP70-based anti-cancer immunotherapy. Hum Vaccin Immunother 12, 2529-2535.

Hansen, P.J., 2004, Physiological and cellular adaptations of zebu cattle to thermal stress. Anim Reprod Sci 82-83, 349-360.

Hansen, P.J., 2014, Genetic variation in resistance of the preimplantation bovine embryo to heat shock. Reprod Fertil Dev 27, 22-30.

Hartl, F.U., 1996, Molecular chaperones in cellular protein folding. Nature 381, 571-579.

Hartl, F.U., Hayer-Hartl, M., 2002, Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. Science 295, 1852-1858.

Haslbeck, M., 2002, sHsps and their role in the chaperone network. Cell Mol Life Sci 59, 1649-1657.

Horvath, I., Multhoff, G., Sonnleitner, A., Vigh, L., 2008, Membrane-associated stress proteins: more than simply chaperones. Biochim Biophys Acta 1778, 1653-1664.

Hu, H., Zhang, Y., Zheng, N., Cheng, J., Wang, J., 2016, The effect of heat stress on gene expression and synthesis of heat-shock and milk proteins in bovine mammary epithelial cells. Anim Sci J 87, 84-91.

Huang, S.Y., Kuo, Y.H., Lee, Y.P., Tsou, H.L., Lin, E.C., Ju, C.C., Lee, W.C., 2000, Association of heat shock protein 70 with semen quality in boars. Anim Reprod Sci 63, 231-240.

Jego, G., Hazoume, A., Seigneuric, R., Garrido, C., 2013, Targeting heat shock proteins in cancer. Cancer Lett 332, 275-285.

Kapila, N., Sharma, A., Kishore, A., Sodhi, M., Tripathi, P.K., Mohanty, A.K., Mukesh, M., 2016, Impact of Heat Stress on Cellular and Transcriptional Adaptation of Mammary Epithelial Cells in Riverine Buffalo (Bubalus Bubalis). PLoS One 11, e0157237.

Kregel, K.C., 2002, Heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance. J Appl Physiol (1985) 92, 2177-2186.

Krueger, A.M., Armstrong, J.N., Plumier, J., Robertson, H.A., Currie, R.W., 1999, Cell specific expression of Hsp70 in neurons and glia of the rat hippocampus after hyperthermia and kainic acid-induced seizure activity. Brain Res Mol Brain Res 71, 265-278.

Kumar, S., Stokes, J., 3rd, Singh, U.P., Scissum Gunn, K., Acharya, A., Manne, U., Mishra, M., 2016, Targeting Hsp70: A possible therapy for cancer. Cancer Lett 374, 156-166.

Liu, Y., Wang, X.C., Hu, D., Huang, S.R., Li, Q.S., Li, Z., Qu, Y., 2016, Heat shock protein 70 protects PC12 cells against ischemia-

hypoxia/reoxygenation by maintaining intracellular Ca(2+) homeostasis. Neural Regen Res 11, 1134-1140.

Lloyd, R.E., Elliott, R.M., Fazeli, A., Watson, P.F., Holt, W.V., 2009, Effects of oviductal proteins, including heat shock 70 kDa protein 8, on survival of ram spermatozoa over 48 h in vitro. Reprod Fertil Dev 21, 408-418.

Manjari, R., Yadav, M., Ramesh, K., Uniyal, S., Rastogi, S.K., Sejian, V., Hyder, I., 2015, HSP70 as a marker of heat and humidity stress in Tarai buffalo. Trop Anim Health Prod 47, 111-116.

Moein-Vaziri, N., Phillips, I., Smith, S., Alminana, C., Maside, C., Gil, M.A., Roca, J., Martinez, E.A., Holt, W.V., Pockley, A.G., Fazeli, A., 2014, Heat-shock protein A8 restores sperm membrane integrity by increasing plasma membrane fluidity. Reproduction 147, 719-732.

Parsell, D.A., Taulien, J., Lindquist, S., 1993, The role of heat-shock proteins in thermotolerance. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 339, 279-285; discussion 285-276.

Paula-Lopes, F.F., Chase, C.C., Jr., Al-Katanani, Y.M., Krininger, C.E., 3rd, Rivera, R.M., Tekin, S., Majewski, A.C., Ocon, O.M., Olson, T.A., Hansen, P.J., 2003, Genetic divergence in cellular resistance to heat shock in cattle: differences between breeds developed in temperate versus hot climates in responses of preimplantation embryos, reproductive tract tissues and lymphocytes to increased culture temperatures. Reproduction 125, 285-294.

Quintana, F.J., Cohen, I.R., 2005, Heat shock proteins as endogenous adjuvants in sterile and septic inflammation. J Immunol 175, 2777-2782.

Ravagnolo, O., Misztal, I., Hoogenboom, G., 2000, Genetic Component of Heat Stress in Dairy Cattle, Development of Heat Index Function. J Dairy Sci 83, 2120-2125.

Robert, J., 2003, Evolution of heat shock protein and immunity. Dev Comp Immunol 27, 449-464.

Sadeesh, E.M., Sikka, P., Balhara, A.K., Balhara, S., 2016, Developmental competence and expression profile of genes in buffalo (Bubalus bubalis) oocytes and embryos collected under different environmental stress. Cytotechnology 68, 2271-2285.

Sartori, R., Haughian, J.M., Shaver, R.D., Rosa, G.J., Wiltbank, M.C., 2004, Comparison of ovarian function and circulating steroids in estrous cycles of Holstein heifers and lactating cows. J Dairy Sci 87, 905-920.

Sejerkilde, M., Sorensen, J.G., Loeschcke, V., 2003, Effects of cold- and heat hardening on thermal resistance in Drosophila melanogaster. J Insect Physiol 49, 719-726.

Shevchenko, M.A., Troyanova, N.I., Servuli, E.A., Bolkhovitina, E.L., Fedorina, A.S., Sapozhnikov, A.M., 2016, Study of Immunomodulatory Effects of Extracellular HSP70 in a Mouse Model of Allergic Airway Inflammation. Biochemistry (Mosc) 81, 1384-1395.

Shinder, G.A., Lacourse, M.C., Minotti, S., Durham, H.D., 2001, Mutant Cu/Zn-superoxide dismutase proteins have altered solubility and interact with heat shock/stress proteins in models of amyotrophic lateral sclerosis. J Biol Chem 276, 12791-12796.

Sirotkin, A.V., Bauer, M., 2011, Heat shock proteins in porcine ovary: synthesis, accumulation and regulation by stress and hormones. Cell Stress Chaperones 16, 379-387.

Spinaci, M., Volpe, S., Bernardini, C., De Ambrogi, M., Tamanini, C., Seren, E., Galeati, G., 2005, Immunolocalization of heat shock protein 70 (Hsp 70) in boar spermatozoa and its role during fertilization. Mol Reprod Dev 72, 534-541.

Todryk, S.M., Gough, M.J., Pockley, A.G., 2003, Facets of heat shock protein 70 show immunotherapeutic potential. Immunology 110, 1-9.

Wang, X., Chen, M., Zhou, J., Zhang, X., 2014, HSP27, 70 and 90, anti-apoptotic proteins, in clinical cancer therapy (Review). Int J Oncol 45, 18-30.

Wang, X.P., Wang, Q.X., Lin, H.P., Xu, B., Zhao, Q., Chen, K., 2016, Recombinant heat shock protein 70 functional peptide and alpha-fetoprotein epitope peptide vaccine elicits specific anti-tumor immunity. Oncotarget 7, 71274-71284.

Wegner, K., Lambertz, C., Das, G., Reiner, G., Gauly, M., 2014, Climatic effects on sow fertility and piglet survival under influence of a moderate climate. Animal 8, 1526-1533.

Wegner, K., Lambertz, C., Das, G., Reiner, G., Gauly, M., 2016, Effects of temperature and temperature-humidity index on the reproductive performance of sows during summer months under a temperate climate. Anim Sci J 87, 1334-1339.

Yurinskaya, M., Zatsepina, O.G., Vinokurov, M.G., Bobkova, N.V., Garbuz, D.G., Morozov, A.V., Kulikova, D.A., Mitkevich, V.A., Makarov, A.A., Funikov, S.Y., Evgen'ev, M.B., 2015, The Fate of Exogenous Human HSP70 Introduced into Animal Cells by Different Means. Curr Drug Deliv 12, 524-532.

Zylicz, M., King, F.W., Wawrzynow, A., 2001, Hsp70 interactions with the p53 tumour suppressor protein. EMBO J 20, 4634-4638.