

HEAT SHOCK PROTEIN 70 AND EXERCISE: MORPHOFUNCTIONAL RELATIONSHIPS

HEAT SHOCK PROTEIN 70 ED ESERCIZIO FISICO: RELAZIONI MORFOFUNZIONALI

Daniele Palumbo, Filippo Macaluso, Giuseppe Battaglia, Rosario Barone

CAPSULA EBURNEA, 3(9):1-7, 2008.

Dipartimento di Medicina Sperimentale (DI.ME.S.), Sezione di Anatomia Umana "E. Luna", Università degli Studi di Palermo

Correspondence:

Dr. Daniele Palumbo:
daniele_palumbo@hotmail.it

Received: March 16th, 2008

Revised: March 20th, 2008

Accepted: March 30th, 2008.

No conflicts of interest were declared.

Category of paper:

Review

Language of the Article: Italian.

Abstract.

The expression of Heat Shock Proteins (HSPs) is one of the most defensive mechanism against cellular stress, HSPs are an heterogeneous family of molecules highly maintained across the species during the evolution.

Exercise training represents the most important source of stress in the skeletal muscle and it triggers the increase of the expression of HSPs, particularly Hsp70, into the cells, plays the intracellular role of chaperone and stress sensor. It has been shown that the expression of Hsp70 as cell response to stress is directly proportional to stress intensity. Several authors described Hsp70 trends as result of different training protocols in both human and animal skeletal muscles, getting out contrasting results.

The purpose of this review is to clarify the influence of exercise on the production of Hsp70.

Further experiments are necessary to understand better the Hsp70 role in damage induced by physical training to schedule an optimal workout program.

KEYWORDS: physical exercise, heat shock proteins, muscle damage, stress proteins.

Riassunto.

Le cellule si difendono dallo stress attraverso una serie di Heat Shock Proteins (HSPs), una famiglia di molecole ubiquitariamente presenti negli organismi e altamente conservate con l'evoluzione.

L'esercizio fisico rappresenta una delle maggiori fonti di stress per il muscolo scheletrico che in risposta aumenta la sintesi di diverse HSPs. Tra queste, quella maggiormente espressa è la Hsp70 che svolge un ruolo di chaperone e di segnalatore di stress.

È stato dimostrato come la risposta della Hsp70 sia direttamente proporzionale all'intensità dello stress. Molti autori descrivono l'andamento e l'espressione di questa proteina nel muscolo scheletrico di uomo e di animali in seguito a diversi protocolli di allenamento ottenendo risultati contrastanti.

Scopo di questa review è di chiarire l'influenza dell'esercizio fisico sulla produzione della Hsp70.

Ulteriori esperimenti permetteranno di comprendere meglio il ruolo di questa proteina contro i danni indotti dall'esercizio fisico in modo da pianificare una tipologia di allenamento ottimale.

PAROLE CHIAVE: esercizio fisico, proteine da shock termico, danno muscolare, proteine da stress.

Muscolo scheletrico e Hsp70

Il muscolo scheletrico è un tessuto estremamente dinamico, possiede la capacità di adattarsi a numerosi stimoli fisiologici o stress esterni. Durante la contrazione muscolare una grande quota dell'energia utilizzata è convertita in energia termica provocando l'innalzamento della temperatura muscolare (1). Lo stress termico può indurre direttamente o indirettamente la denaturazione proteica che funge da termometro cellulare. Uno dei meccanismi di adattamento allo stress cellulare di natura termica è la produzione delle Heat Shock Proteins (HSPs); queste rappresentano il più antico sistema di difesa in tutti gli organismi viventi. Questa molecola chaperone è presente in tutti gli organismi ed è indispensabile per la sopravvivenza della cellula (2-4). Nelle cellule non stressate, le HSPs svolgono funzioni di chaperone associate con nuova sintesi polipeptidica assicurando il corretto folding, locazione e funzione proteica (5,6). Un incremento delle HSPs in seguito a stress ristabilisce l'omeostasi cellulare, facilita il processo di riparazione da danno e protegge le cellule da infortuni futuri (7-9).

Vi sono diverse HSPs che variano a seconda delle caratteristiche biologiche e funzionali, classificate in diversi gruppi in base al peso molecolare. Le HSPs identificate nel muscolo scheletrico maggiormente espresse sono la Hsp70, Hsp60 e Hsp90 (10). In particolare la Hsp70 funziona da indicatore cellulare di stress e riveste un importante ruolo nella trasduzione del segnale in quanto il suo ruolo nel muscolo scheletrico è di segnalatore di stress (11). Inoltre svolge un ruolo fondamentale nel metabolismo delle proteine, e recentemente è stato riconosciuto un suo ruolo nel processo di adattamento muscolare, così come nell'apoptosi e nella miogenesi (12,13). Diversi lavori presenti in letteratura mostrano come la risposta della Hsp70 è indotta da differenti meccanismi correlati con l'intensità della causa stressante (14-16). È ampiamente accettato che l'esercizio fisico è uno stimolo sufficientemente stressante per indurre la risposta della Hsp70 nel muscolo scheletrico (17-20).

Molti fattori stressanti sono associati con l'esercizio fisico tra cui: elevata temperatura, stress metabolici, produzione di catecolamine, incremento intracellulare di calcio e delle specie reattive dell'ossigeno, deplezione di glicogeno e di ATP, diminuzione del pH intracellulare (15,21,22).

Inoltre durante la fase di contrazione muscolare l'apporto di sangue intramuscolare è interrotto temporaneamente per poi riprendere nella fase di rilasciamento; in questo modo il muscolo va incontro al fenomeno della ischemia-riperfusion (23,24). Tutti questi fattori stres-

santi determinano un aumento della espressione delle HSPs da parte del muscolo scheletrico, e in particolare della Hsp70.

Variazione dei livelli sierici e tissutali di Hsp70 in seguito a diversi protocolli di allenamento

Diversi autori hanno ipotizzato che modificando i parametri del lavoro muscolare come carico, volume e intensità dell'allenamento, si possono avere effetti diversi sugli adattamenti precedentemente descritti e quindi una diversa risposta della Hsp70.

Già negli anni '90 l'attività fisica era considerata come uno stimolo che induce le HSPs (25). Molti lavori mostrano che la risposta della Hsp70 è direttamente correlata all'intensità della causa stressante (15); questo è ben documentato negli studi sugli animali, mentre sono di meno e controversi i lavori relativi ai muscoli scheletrici nell'uomo.

È stato dimostrato che anche negli esseri umani la produzione della Hsp70 può essere indotta molto rapidamente in organi e tessuti dopo esposizione a uno stimolo stressante (26-28). Ad esempio Fehrenbach ha dimostrato come i livelli della Hsp70 e Hsp27 aumentano nei leucociti dopo uno sforzo di tipo acuto, mantenendosi elevati anche dopo 24 ore (29,30). In uno studio condotto da Walsh alcuni soggetti effettuavano una seduta di allenamento di corsa su treadmill di 1 ora al 70% della soglia aerobica (moderata intensità). Si osservava già a 30 minuti un aumento di espressione della Hsp70 nel sangue durante l'esercizio. Questo incremento non era una diretta conseguenza del lavoro muscolare, ma era ampiamente preceduto da un incremento intramuscolare della Hsp70 (31). Un'ulteriore conferma si è avuta da Febbraio et al. (32) in uno studio condotto su soggetti in cui è andato a investigare il rilascio della Hsp70 nel tessuto epatico. I soggetti venivano sottoposti ad un allenamento di 2 ore su bike statica alla massima capacità aerobica; veniva prelevato contemporaneamente sangue dall'arteria brachiale e delle vene femorale ed epatica principale a 30, 60 e 120 minuti dopo l'esercizio. La concentrazione della Hsp70 aumentava solo nel sangue epatico e non negli altri distretti sanguigni. Questo dimostrava che l'esercizio stimolava la produzione di questa proteina nel fegato. Tuttavia la risposta della Hsp70 nel muscolo scheletrico, sembra essere specifica in termini di tempo. Nell'uomo il tempo di risposta nella produzione della Hsp70 ha una maggiore latenza rispetto ai roditori (in particolare i ratti) in cui varia dal minuto all'ora (19).

Uno dei primi autori a studiare il tempo di risposta della Hsp70 nel muscolo scheletrico in seguito ad esercizio fisico è stato Puntschart (33). Questi ha studiato l'espressione della forma

inducibile della Hsp70 nelle cellule muscolo scheletriche umane, dopo una singola seduta di allenamento di tipo aerobico, su treadmill per 30 minuti, in soggetti non allenati. Si è visto che la concentrazione dell'mRNA della Hsp70 era aumentata significativamente dopo 4 minuti dal termine dell'esercizio e che questo valore si manteneva elevato anche dopo 3 ore dalla fine della seduta allenamento. Ma al contrario il livello proteico della Hsp70 non cambiava nelle 3 successive all'allenamento. La conclusione tratta è stata che un singolo esercizio non ha effetti sul livello proteico basale, di per se elevato, della Hsp70; oppure il periodo di osservazione è stato troppo breve per avere un incremento significativo. Puntschart concluse che l'analisi del mRNA della Hsp70 è potenzialmente utile come metodo per rilevare lo stress in tessuti con un elevato livello basale di HSPs (33).

Da uno studio condotto sui canottieri professionisti, e quindi con un livello di allenamento elevato, Liu e collaboratori sono andati a indagare il livello proteico della Hsp70 dopo un allenamento di endurance (34). Dopo 4 settimane dal termine della prova, i livelli proteici erano ancora significativamente più alti di 3 volte rispetto al livello basale. Questo lavoro ha dimostrato che nei canottieri professionisti aumenta il livello proteico della Hsp70 nel muscolo scheletrico, ma non spiega se questo aumento è dipeso dall'intensità o dal volume dell'allenamento.

Sempre lo stesso Liu ha condotto un lavoro su due gruppi di canottieri allenati, sottoponendoli a un protocollo di allenamento, in cui variava l'intensità e il volume dividendo il lavoro in tre fasi (20). Un gruppo ha effettuato un allenamento ad alta intensità in una prima fase, mentre l'altro gruppo ha effettuato un allenamento ad alta intensità in una seconda fase. Il volume dell'allenamento è aumentato in entrambi i

gruppi nella seconda fase. Nella terza fase sono stati ridotti sia l'intensità sia il volume dell'allenamento. Da questa sperimentazione hanno osservato che si ha un aumento della risposta della Hsp70 subito dopo l'aumento dell'intensità dell'allenamento e riduzione quando questa viene ridotta nella terza fase, mentre l'espressione della Hsp70 non sembra risentire del parametro del volume dell'allenamento (20). Questa relazione, tra intensità e volume di allenamento, e risposta della Hsp70 nel muscolo scheletrico umano, è fortemente supportata da studi successivi sugli animali (v. tab. 1).

Tupling nel 2007 (35) ha dimostrato come inseguito a un allenamento di tipo acuto isometrico l'espressione della Hsp70 a livello proteico non cambiava immediatamente dopo l'esercizio. Questo aumentava del 43% dopo un giorno di recupero e restava elevato per i 6 giorni successivi. Questi autori ipotizzano che la discrepanza tra i tempi di risposta a livello proteico e a livello di mRNA potrebbe essere dovuta al fatto che i meccanismi post trascrizionali svolgono un ruolo nella regolazione dei livelli di espressione della Hsp70 umana nel muscolo scheletrico, in risposta ad allenamento.

Hsp70 e muscolo scheletrico: studi sul modello animale

Diversi lavori hanno mostrato come non vi sia una correlazione specifica tra la risposta della Hsp70 nel muscolo scheletrico umano e nel muscolo scheletrico degli animali, e in particolare nei ratti. Uno studio sulla risposta della Hsp70 all'allenamento di endurance sugli animali è stato effettuato da Milne e Noble (36). Questi hanno sottoposto due gruppi di ratti a un protocollo di allenamento di corsa su treadmill; un gruppo a bassa intensità, l'altro ad alta intensità. Entrambi i gruppi sono stati allenati per 8 settimane. L'incremento dell'espressione si è

TIPO DI ALLENAMENTO	DURATA	NUMERO SOGGETTI	VARIAZIONE Hsp70	RIFERIMENTO BIBLIOGRAFICO
Aerobico, alta intensità	30 minuti	5, non allenati	++	(33)
Endurance, intensità massima	4 settimane	10, allenati	++	(20)
Alta intensità e settimana di recupero	3 settimane	6, allenati	+	(34)
Bassa intensità e settimana di recupero	3 settimane	8, allenati	±	(34)
Acuto isometrico	30 minuti	10, non allenati	+	(35)

Tab. 1: Relazione tra intensità e volume di allenamento e risposta della Hsp70 nel muscolo scheletrico umano.

avuto soltanto nel gruppo allenato ad alta intensità nonostante il volume dell'allenamento, e quindi la distanza percorsa, fosse la stessa per entrambi i gruppi (36).

In un altro studio, Melling (37), ha esaminato l'attivazione del gene della Hsp70 inseguito ad esercizio di tipo acuto, utilizzando due gruppi di ratti; uno formato da ratti sedentari, l'altro da ratti precedentemente allenati con un programma di tipo aerobico. Non vi erano differenze significative nell'espressione della Hsp70 nell'mRNA subito dopo l'esercizio tra i due gruppi di animali.

Altri esperimenti condotti sugli animali sottoposti a un programma di allenamento di endurance a bassa intensità hanno mostrato, a differenza del tipo di risposta avuta negli esseri umani, un incremento della HSP70 a prescindere se i ratti avessero effettuato o meno un periodo di adattamento all'esercizio. Diversi autori hanno così ipotizzato che la risposta della HSP70 nel muscolo scheletrico umano è influenzata dallo stato di allenamento e quindi di adattamento all'esercizio (20,38,39).

L'espressione della Hsp70 nelle fibre muscolari

Differenti tipologie muscolari presentano caratteristiche biochimiche funzionali diverse tra loro, così com'è diversa la loro risposta all'espressione delle HSPs. Già nel 1991 Locke (40) aveva dimostrato che la forma inducibile della Hsp70 è costitutivamente espressa nei muscoli di ratto nelle fibre di tipo I e non in quelle di tipo II. Nei muscoli con fibre di tipo misto l'espressione è proporzionale alla presenza delle fibre di tipo I.

In un lavoro sulla relazione tra l'isoforma MHC e la risposta della Hsp70 è stato dimostrato che durante lo sviluppo muscolare il livello basale della Hsp70 nel muscolo soleo (fibre low-twitch) incrementa parallelamente all'aumentare delle fibre di tipo I, evento non riscontrato nel muscolo plantare prevalentemente formato da fibre di tipo II (fast-twitch) (41).

È stato mostrato come l'espressione della Hsp70 e la risposta all'esercizio sono in relazione con il tipo di fibra muscolare che viene stimolata (42). Molti dei lavori presenti in letteratura hanno utilizzato come modello il muscolo vasto laterale (con tipologia di fibre low-twitch) con svariati esercizi tutti di tipo aerobico (corsa e ciclismo). Thompson è stato il primo ad andare a valutare e comparare la risposta della Hsp70, utilizzando un altro modello muscolare, il bicipite brachiale (con tipologia di fibre fast-twitch) e nel vasto laterale (43). L'esperimento è stato condotto su soggetti non allenati; il protocollo di allenamento ha previsto un esercizio di tipo eccentrico ad alta intensità per il bicipite brachiale (50 ripetizioni alla massima intensità)

e un esercizio a bassa intensità per il vasto laterale (corsa su treadmill con inclinazione di meno 10 gradi per 30 min). L'espressione della Hsp70 è stata valutata 48 ore dopo la fine dell'allenamento e si è avuta una risposta significativa sia a livello proteico sia nell'mRNA solo nel bicipite brachiale e non nel vasto laterale.

Brkic, invece, ha messo in correlazione la risposta e l'espressione della Hsp70 con l'esercizio e la tipologia delle fibre muscolari stimulate (44). Quest'ultimo ha osservato la risposta della Hsp70 nel muscolo tricipite brachiale (fibre veloci) ad un allenamento di forza combinato con esercizi balistici e di stretching. Si è avuto un incremento della Hsp70 sia a livello proteico sia a livello dell'mRNA. La conclusione è stata che in risposta all'allenamento, la Hsp70 può essere indotta nei muscoli del braccio umano, e che il ruolo universale di chaperone molecolare Hsp70 può avere importanti effetti nell'adattamento all'allenamento di forza nei muscoli del braccio, composti prevalentemente da fibre muscolari veloci (44).

Recentemente Tupling (35) ha studiato la risposta della Hsp70 in fibre specifiche in risposta ad un esercizio di tipo acuto per 30 minuti sul muscolo vasto laterale. Non vi era differenza nel contenuto basale, pre esercizio, della Hsp70 nelle fibre di tipo I, IIA, e IIX/IIIX. Immediatamente dopo l'esercizio il contenuto della Hsp70 aumenta nelle fibre di tipo I di circa l'87%, e rimane invariata nelle fibre di tipo II. A un giorno di recupero, e nei 6 giorni successivi alla prova, il contenuto aumentava in tutte le fibre rispetto al livello basale, maggiormente nelle fibre di tipo I dove era sempre più alto rispetto alle altre. È stato valutato che la deplezione del contenuto di glicogeno subito dopo l'esercizio avveniva a carico soltanto delle fibre di tipo II e non nelle fibre di tipo I. Quindi la differenza di espressione della Hsp70 nelle fibre non è correlata con la disponibilità di glicogeno. Questi risultati dimostrano che la risposta della Hsp70 nel muscolo scheletrico indotta dall'esercizio è specifica a seconda del tipo di fibra.

Ruolo della Hsp70 nell'adattamento muscolare conseguente all'allenamento

Il primo a ipotizzare che un protocollo di allenamento che non crea danno muscolare possa incrementare la risposta della Hsp70 è stato Khassaf (45). Questi è andato a studiare l'andamento della risposta della Hsp70 con un protocollo di allenamento sub massimale a tempo zero a 24, 48, 72 ore e dopo 6 giorni dalla fine della prova, su biopsie del muscolo vasto laterale. In questo studio i soggetti eseguivano un esercizio di ciclismo con una gamba sola per 45 minuti al 70% della loro soglia aerobica. Questo modello di esercizio è stato utiliz-

zato per ridurre il più possibile la possibilità di trauma muscolare e quindi di infiammazione, fattori che avrebbero potuto influenzare il risultato finale in quanto promotori della risposta della Hsp70. La media del contenuto muscolare della Hsp70 aumenta enormemente dopo 6 giorni dal termine della prova. Il segnale responsabile per l'attivazione della risposta da stress dopo questa forma di esercizio non è chiaro; si è ritenuto ciò potesse essere dovuto all'aumentata temperatura muscolare, alla presenza di enzimi dello stress ossidativo o alla variabilità dei soggetti.

Morton nel 2006 ha caratterizzato le modalità e l'andamento della risposta delle maggiori HSPs, e in particolare della Hsp70, nel muscolo scheletrico umano inseguito ad allenamento acuto su treadmill (45 minuti a velocità corrispondente alla soglia aerobica dei soggetti) che non provoca danno muscolare in soggetti che praticano attività fisica di tipo ricreativo (non allenati e non sedentari) (46). In questo studio vengono effettuate delle biopsie muscolari subito dopo l'allenamento e dopo 24, 48, 72 ore e una settimana dopo l'allenamento. Si è riscontrato un aumento della risposta della Hsp70 anche se l'andamento e la variazione della risposta era sostanzialmente bassa rispetto a precedenti lavori su soggetti sedentari. Si è speculato che la risposta dei soggetti sedentari a stimoli stressanti è maggiore rispetto a soggetti attivi, o allenati, in modo tale da ripristinare, più rapidamente, l'omeostasi cellulare turbata dall'esercizio (46).

Recentemente Paulsen (47) ha investigato la risposta di alcune HSPs, e in particolare della Hsp70, nel muscolo scheletrico ad un esercizio di tipo eccentrico massimale in soggetti non abituati a questa tipologia di allenamento. Sono state effettuate delle biopsie sul quadricipite femorale a 30 minuti e a 4, 8, 24, 96 e 168 ore dopo la prova. La Hsp70 aumentava in modo significativo dopo 24 ore a livello citosolico, e dopo 4 giorni a livello miofibrillare, mentre l'espressione dell'mRNA era largamente aumentata già dopo 8 ore dal termine dell'esercizio. Si è ipotizzato, quindi, che l'incremento sia a livello proteico sia a livello di mRNA indichi un ruolo fondamentale della Hsp70 nel recupero e nel processo di rimodellamento/adattamento muscolare nell'esercizio di tipo eccentrico massimale.

Conclusioni

Nonostante la presenza di molteplici lavori in bibliografia, la risposta del muscolo scheletrico umano allo stress indotto dall'esercizio fisico rimane non del tutto chiara e compresa. L'interpretazione dei dati provenienti da studi umani è spesso limitata alla risposta di una par-

ticolare famiglia HSP (in particolare Hsp70), ed è complicata da variazioni dei tempi di campionamento dei tessuti, da soggetti con differenti caratteristiche (ad esempio, l'età, lo stato di allenamento, il sesso, lo stato nutrizionale), e dall'utilizzo dei protocolli di allenamento più disparati. Ciò è particolarmente importante nel caso in cui vi è una componente nel protocollo di allenamento che crea danno muscolare, dove il danno è definito come necrosi evidente, accompagnato da una riduzione significativa della capacità del muscolo di generare forza. Le cellule fagocitarie migrano verso il sito dove è presente il danno e in cui i livelli di HSPs sono relativamente alti (48). L'uso di un protocollo di allenamento che non crea danno muscolare, tuttavia, fornisce un approccio metodologico più controllato in cui la maggiore espressione di HSPs è probabile che si presenti all'interno delle cellule muscolari scheletriche, piuttosto che nel contenuto delle cellule fagocitarie.

La risposta dose dipendente della Hsp70 allo stress cellulare nel muscolo scheletrico ha un importante significato fisiologico e fisiopatologico in quanto un incremento del contenuto muscolare della Hsp70 inseguito ad esercizio fisico è pensato per ristabilire l'omeostasi cellulare, promuovere il rimodellamento cellulare e provvedere a protezione cellulare contro danni futuri (48,49). Uno dei processi di adattamento del muscolo scheletrico in seguito ad allenamento è dato dalla diminuzione del danno. Poiché una delle funzioni della Hsp70 è quella di svolgere un ruolo protettivo nei confronti del danno muscolare indotto dall'allenamento, la sua espressione è stata messa in correlazione al processo di adattamento muscolare, anche se ulteriori indagini sono necessarie per confermare questa ipotesi (50).

Un'ulteriore comprensione del ruolo di queste proteine, in particolare della Hsp70, nella protezione contro i danni indotti dall'esercizio nel muscolo scheletrico, e dell'induzione della loro produzione dopo diverse tipologie di esercizio, potrebbe facilitare una pianificazione logica per un allenamento ottimale, riducendo al minimo i danni muscolari, ottenendo il massimo adattamento all'attività contrattile e prevenendo l'overtraining.

Bibliografia

1. Brooks GA, Hittelman KJ, Faulkner JA, Beyer RE: Tissue temperatures and whole-animal oxygen consumption after exercise. *Am J Physiol* 1971; 221, 427-431.
2. Senisterra GA, Huntley SA, Escaravage M, Sekhar KR, Freeman ML, Borrelli M, Lepock JR: Destabilization of the Ca²⁺-ATPase of sarcoplasmic reticulum by thiol-specific, heat shock inducers results in thermal denaturation

- at 37 degrees C. *Biochemistry* 1997; 36, 1100-2-11011.
3. Hightower LE: Heat shock, stress proteins chaperones, and proteotoxicity. *Cell* 1991; 66, 191-197.
 4. Liu Y, Steinacker JM: Changes in skeletal muscle heat shock proteins: Pathological significance. *Front Biosci* 2001; 6, D12-D25.
 5. Ku Z, Yang J, Menon V, Thompson DB: Decreased polysomal HSP70 may slow polypeptide elongation during skeletal muscle atrophy. *Am J Physiol* 1995; 268, C1369-C1374.
 6. Beckmann RP, Mizzen LA, Welch WJ: Interaction of HSP70 with newly synthesized proteins: Implications for protein folding and assembly. *Science* 1990; 248, 850-854.
 7. Kiang JG, Tsokos GC: Heat shock protein 70 kDa: molecular biology, biochemistry and physiology. *Pharmacol Ther* 1998; 80: 183-201.
 8. McArdle F, Spiers S, Aldemir H, Vasilaki A, Beaver A, Iwanejko I, McArdle A, Jackson MJ. Preconditioning of skeletal muscle against contraction-induced damage: the role of adaptations to oxidants in mice. *J Physiol* 2004; 561: 233-244.
 9. Maglara AA, Vasilaki A, Jackson MJ, and McArdle A. Damage to developing mouse skeletal muscle myotubes in culture: protective role of heat shock proteins. *J Physiol* 2003; 548: 83-7-846.
 10. Locke M, Noble EG: Stress proteins: the exercise response. *Can J Appl Physiol* 1995; 20, 155-167.
 11. Hightower LE: Heat shock, stress proteins chaperones, and proteotoxicity. *Cell* 1991; 66, 191-197.
 12. Duguez S, Bihan MC, Gouttefangeas D, Feasson L, Freyssenet D: Myogenic and non-myogenic cells differentially express proteinases, Hsc/Hsp70, and BAG-1 during skeletal muscle regeneration. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2003; 285, E206-E215.
 13. Pette D, Staron R S: Myosin isoforms, muscle fiber types, and transitions. *Microsc Res Tech* 2000; 50, 500-509.
 14. Noble EG: Heat shock protein and their induction with exercise. In: *Exercise and Stress Response: The role of stress proteins*, edited by Locke M and Noble EG. Boca Raton, FL: CRC, 2002; p. 43-78.
 15. Liu Y, Steinacker JM: Changes in skeletal muscle heat shock proteins: Pathological significance. *Front Biosci* 2001; 6, D12-D25.
 16. Milne KJ, Noble EG: Exercise-induced elevation of HSP70 is intensity dependent. *J Appl Physiol* 2002; 93, 561-568.
 17. Noble EG: Heat shock protein and their induction with exercise. In: *Exercise and Stress Response: The role of stress proteins*, edited by Locke M and Noble EG. Boca Raton, FL: CRC, 2002; p. 43-78.
 18. Noble EG, Ho R, Dzialoszynski T: Exercise is the primary factor associated with Hsp70 induction in muscle of treadmill running rats. *Acta Physiol* 2006; 187, 495-501.
 19. Oishi Y, Taniguchi K, Matsumoto H, Ishihara A, Ohira Y, Roy RR: Differential responses of HSPs to heat stress in slow and fast regions of rat gastrocnemius muscle. *Muscle Nerve* 2003; 28, 587-594.
 20. Liu Y, Mayr S, Opitz-Gress A, Zeller C, Lormes W, Baur S, Lehmann M, Steinacker JM. Human skeletal muscle HSP70 response to training in highly trained rowers. *J Appl Physiol* 1999 Jan; 86(1):101-4.
 21. Steinacker JM, Liu Y: Stress proteins and applied exercise physiology. In: *Exercise and Stress Response - The Role of Stress Proteins*. Eds: Locke, M, Noble, E,G, CRC Press, Boca Raton, 2002;211-230.
 22. Kraniou Y, Cameron-Smith D, Misso M, Collier G, Hargreaves M: Effects of exercise on GLUT-4 and glycogenin gene expression in human skeletal muscle. *J Appl Physiol* 2000; 88, 794-796.
 23. Lindquist S: The heat-shock response. *Ann Rev Biochem* 1986; 55, 1151-1191.
 24. Lindquist S, Craig EA: The heat-shock proteins. *Ann Rev Genet* 1988; 22, 631-677.
 25. Fehrenbach E, Niess AM: Role of heat shock proteins in the exercise response. *Exerc Immunol Rev* 1999; 5, 57-77.
 26. Ramaglia V, Harapa GM, White N, Buck LT: Bacterial infection and tissue-specific Hsp7-2, -73 and -90 expression in western painted turtles. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 2004; 138, 139-148.
 27. Manzerra P, Rush SJ, Brown IR: Tissue-specific differences in heat shock protein hsc70 and hsp70 in the control and hyperthermic rabbit. *J Cell Physiol* 1997;170, 130-137.
 28. Zhang Z, Ferraris JD, Brooks HL, Brisc I, Burg MB: Expression of osmotic stress-related genes in tissues of normal and hyposmotic rats. *Am J Physiol Renal Physiol* 2003;285, F688-F693.
 29. Fehrenbach E, Niess A M, Schlotz E, Passek F, Dickhutt HH, Northoff H: Transcriptional and translational regulation of heat shock proteins in leukocytes of endurance runners. *J Appl Physiol* 2000; 89, 704.
 30. Fehrenbach E, Niess AM: Role of heat shock proteins in the exercise response. *Exerc Immunol Rev* 1999; 5, 57-77.
 31. Walsh RC, Koukoulas I, Garnham A, PL Moseley, M Hargreaves, MA Febbraio: Exercise increases serum Hsp72 in humans. *Cell Stress Chaperones* 2001;6, 386-393.
 32. Febbraio MA, Ott P, Nielsen HB, Steen-berg A, Keller C, Krstrup P, Secher NH, Pe-

- dersen BK: Exercise induces hepatosplanchnic release of heat shock protein 72 in humans. *J Physiol* 2002; 544, 957-962.
33. Puntschart A, Vogt M, Widmer HR, Hoppeler H, Billeter R: Hsp70 expression in human skeletal muscle after exercise. *Acta Physiol Scand* 1996; 157, 411-417.
34. Liu Y, Lormes W, Baur S, Opitz-Gress A, Altenburgm D, Lehmann M, Steinacker JM: Human skeletal muscle HSP70 response to physical training depends on exercise intensity. *Int J Sports Med* 2000; 21, 351-355.
35. Tupling AR, Bombardier E, Stewart RD, Vigna C, Aquil AE: Muscle fiber type-specific response of Hsp70 expression in human quadriceps following acute isometric exercise. *J Appl Physiol* 2007 Dec; 103 (6): 2105-11.
36. Milne KJ, Noble EG: Exercise-induced elevation of HSP70 is intensity dependent. *J Appl Physiol* 2002; 93, 561- 568.
37. Melling CW, Thorp DB, Milne KJ, Krause MP, Noble EG: Exercise-mediated regulation of Hsp70 expression following aerobic exercise training. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007; Dec 293 (6): H3692-8.
38. Samelman TR: Heat shock protein expression is increased in cardiac and skeletal muscles of Fischer 344 rats after endurance training. *Exp Physiol* 2000; 85, 92-102.
39. Samelman TR, Shiry LJ, Cameron DF: Endurance training increases the expression of mitochondrial and nuclear encoded cytochrome c oxidase subunits and heat shock proteins in rat skeletal muscle. *Eur J Appl Physiol* 2000; 83, 22-27.
40. Locke M, Noble EG, Aktinson BG: Inducible isoform of HSP70 in constitutively expressed in a muscle fiber type specific pattern. *Am J Physiol* 1991; 261, C774-C779.
41. Ogata T, Y Oishi, Roy RR, Ohmori H: Endogenous expression and developmental changes of HSP72 in rat skeletal muscles. *J Appl Physiol* 2003; 95, 1279-1286.
42. Neuffer PD, Ordway GA, Hand GA, Shelton JM, Richardson JA, Benjamin IJ, Williams RS: Continuous contractile activity induces fiber type specific expression of HSP70 in skeletal muscle. *Am J Physiol* 1996; 271, C1828-C1837.
43. Thompson HS, Maynard EB, Morales ER, Scordilis SP.: Exercise-induced HSP27, HSP70 and MAPK responses in human skeletal muscle. *Acta Physiol Scand* 2003; 178, 61-72.
44. Brkic M, Liu Y, Schlumberger A, Wirth K, Schmidtbleicher D, Steinacker JM: Arm muscle HSP70 response to strength training. *Med Sci Sports Exerc* 2004; 36, S318.
45. Khassaf M, Child RB, McArdle A, Brodie DA, Esanu C, Jackson MJ: Time course of responses of human skeletal muscle to oxidative stress induced by nondamaging exercise. *J Appl Physiol* 2001; 90, 1031-1035.
46. Morton JP, MacLaren PM, Cable NT, Bongers T, Griffiths RD, Campbell IT, Evans L, Kayani A, McArdle A, Drust B: Time course and differential responses of the major heat shock protein families in human skeletal muscle following acute nondamaging treadmill exercise. *J Appl Physiol* 2006; 101: 176-182.
47. Paulsen G, Vissing K, Kalkhovde JM, Ugelstad I, Bayer ML, Kadi F, Schjerling P, Hallén J, Raastad T: Maximal eccentric exercise induces a rapid accumulation of small heat shock proteins on myofibrils and a delayed HSP70 response in humans. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2007; 293:R844-53.
48. Maglara AA, Vasilaki A, Jackson MJ, McArdle A: Damage to developing mouse skeletal muscle myotubes in culture: protective effect of heat shock proteins. *J Physiol* 2003; 548, 837-846.
49. McArdle A, Dillmann WH, Mestrel R, Faulkner JA, Jackson MJ: Overexpression of HSP70 in mouse skeletal muscle protects against muscle damage and age-related muscle dysfunction. *FASEB J* 2004; 18, 355-357.
50. Kilgore JL, Musch TI, Ross CR: Physical activity, muscle, and the HSP70 response. *Can J Appl Physiol* 1998; 23, 245-260.