

Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΑΣΚΗΣΗΣ ΣΤΗΝ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ
c-fos ΣΤΟ ΣΚΕΛΕΤΙΚΟ ΜΥ ΕΠΙΜΥΩΝ

του

Νικολαΐδη Γ. Μιχάλη

Μεταπτυχιακή διατριβή που υποβάλλεται στο καθηγητικό σώμα για τη μερική ολοκλήρωση των απαιτήσεων για την απόκτηση του μεταπτυχιακού τίτλου του Τμήματος Επιστήμης Φυσικής Αγωγής και Αθλητισμού του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης (Προπονητική Ομαδικών Αθλημάτων)

2001

Θεσσαλονίκη

Εγκεκριμένη από το Καθηγητικό σώμα:

1ος Επιβλέπων: Αναπληρωτής καθηγητής Βασίλης Μούγιος

2η Επιβλέπουσα: Αναπληρώτρια καθηγήτρια Χρυσούλα Ματζιάρη

3ος Επιβλέπων: Επίκουρος καθηγητής Αλέξανδρος Λαμπρόπουλος

© 2001

Νικολαΐδης Γ. Μιχάλης

ALL RIGHTS RESERVED

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Είμαι ευγνώμων στον επιβλέποντα αναπληρωτή καθηγητή Βασίλη Μούγιο για την υποστήριξη και βοήθειά του στις δυσκολίες που προέκυψαν κατά τη διάρκεια εκπόνησης της μεταπτυχιακής μου διατριβής. Ιδιαίτερα, όμως, τον ευχαριστώ για όλα αυτά που έχω αποκομίσει από τη συνεργασία μας.

Πολύτιμη ήταν η βοήθεια των μελών της τριμελούς επιτροπής, της αναπληρώτριας καθηγήτριας Χρυσούλας Ματζιάρη και του επίκουρου καθηγητή Αλέξανδρου Λαμπρόπουλου. Την κ. Ματζιάρη ευχαριστώ ιδιαίτερα που μου εμπιστεύτηκε το δαπεδοεργόμετρο για την εκγύμναση των επιμύων.

Ευχαριστώ πολύ τον κ. Αλέξανδρο Κορτσάρη, διευθυντή του ερευνητικού τμήματος του Θεαγενείου, για την εγκάρδια φιλοξενία του. Επίσης, είμαι ευγνώμων στο γιατρό και ερευνητή του ίδιου ερευνητικού τμήματος Κώστα Παπαζήση, η βοήθεια του οποίου στην ολοκλήρωση της μεταπτυχιακής διατριβής ήταν ανεκτίμητη. Ευχαριστώ την ερευνήτρια του ερευνητικού τμήματος του Θεαγενείου Σουλτάνα Βογιατζή, για την υπομονή, την υποστήριξη και τις πολλές ώρες που αφιέρωσε για την εκπαίδευσή μου στις εργαστηριακές τεχνικές που χρησιμοποίησα. Πολύτιμη ήταν η βοήθεια της Χημικού Βίκυς Βάλα, ιδιαίτερα στο στάδιο προσαρμογής μου στο ίδιο εργαστήριο.

Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ στο διδάκτορα Αντώνη Κυπάρη για τη βοήθειά του στην εκμάθηση χειρισμού και άσκησης των επιμύων καθώς και στην αφαίρεση των μυών.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ	7
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ	8
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΕΥΝΑΣ	22
ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ	23
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	29
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	30
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	42

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Μ.Γ. Νικολαΐδης

Η επίδραση της άσκησης στην έκφραση του γονιδίου *c-fos* στο σκελετικό μυ επιμύων

(Υπό την επίβλεψη του Βασίλη Μούγιου)

Σκοπός της μελέτης ήταν να ερευνηθεί την επίδραση οξείας άσκησης αντοχής στα επίπεδα της πρωτεΐνης *c-Fos* στο μακρό εκτείνοντα τους δακτύλους μυ προπονημένων και απροπόνητων επιμύων. Πενήντα επίμυες φυλής Wistar χωρίστηκαν σε δύο ισάριθμες ομάδες, προπονημένων και απροπόνητων. Οι πρώτοι έτρεξαν σε μηχανοκίνητο δαπεδοεργόμετρο με ταχύτητα 20 m/min για 45 min/ημέρα για 5 ημέρες. Την έκτη ημέρα, 5 επίμυες θανατώθηκαν χωρίς άσκηση, ενώ οι υπόλοιποι 20 έτρεξαν όπως περιγράφηκε παραπάνω και θανατώθηκαν 15 min, 3, 6 και 12 h μετά την άσκηση (5 επίμυες σε κάθε χρονικό σημείο). Από τη δεύτερη ομάδα, πέντε επίμυες θανατώθηκαν χωρίς άσκηση, ενώ οι υπόλοιποι 20 έτρεξαν σύμφωνα με το παραπάνω πρωτόκολλο μόνο μία φορά και θανατώθηκαν στα ίδια χρονικά σημεία (5 επίμυες σε κάθε χρονικό σημείο). Η ανάλυση Western έδειξε μια διφασική ανταπόκριση της *c-Fos* στην άσκηση και στις δύο ομάδες, παρουσιάζοντας μείωση μέχρι τις 6 h στους απροπόνητους και μέχρι τις 3 h στους προπονημένους επίμυες, συγκριτικά με τα πριν την άσκηση επίπεδα. Αντίθετα, τα επίπεδα της πρωτεΐνης αυξήθηκαν στις 12 h στα απροπόνητα και στις 6 και 12 h στα προπονημένα πειραματόζωα. Τα πριν την άσκηση επίπεδα της *c-Fos* αυξήθηκαν κατά 55 % μετά από 5 ημέρες προπόνησης. Και οι δύο ομάδες παρουσίασαν το υψηλότερο επίπεδο *c-Fos* στις 12 h μετά την άσκηση. Συμπερασματικά, τα παρόντα ευρήματα υποστηρίζουν την υπόθεση ότι οι προσαρμογές του σκελετικού μύος στην άσκηση αντοχής μπορεί να οφείλονται στη συσσώρευση παροδικών αλλαγών της γονιδιακής έκφρασης κατά τη διάρκεια της αποκατάστασης.

ABSTRACT

M.G. Nikolaidis

The effect of exercise on *c-fos* expression in rat skeletal muscle

(Under the supervision of Vassilis Mougios)

The aim of this study was to investigate the effect of an acute bout of endurance exercise on the levels of c-Fos protein in the extensor digitorum longus muscle of untrained and trained rats. Fifty male Wistar rats were equally divided into a trained and an untrained group. Rats of the trained group ran on a motor-driven treadmill at a speed of 20 m/min for 45 min/day for 5 days. On the sixth day, 5 rats were killed without exercise, while the remaining 20 ran as above and were killed 15 min, 3 h, 6 h, and 12 h post-exercise (5 rats at each time point). In the untrained group, 5 rats were killed without exercise, while the remaining 20 ran according to the same protocol only once and were killed at the same time points (5 rats at each point). Western analysis demonstrated a biphasic response of c-Fos to exercise in both groups, consisting of a decrease up to 6 h in the untrained and up to 3 h in the trained rats, compared to the pre-exercise levels. On the contrary, the protein showed an increase at 12 h in the untrained and at 6 as well as 12 h in the trained animals. The pre-exercise levels of c-Fos increased by 55 % after 5 days of training. Both groups exhibited the highest level of c-Fos 12 h after exercise. In conclusion, our findings support the hypothesis that adaptations of skeletal muscle to endurance training may be the cumulative effect of transient changes in gene expression during recovery from individual exercise bouts.

Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΑΣΚΗΣΗΣ ΣΤΗΝ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ c-fos ΣΤΟ ΣΚΕΛΕΤΙΚΟ ΜΥ ΕΠΙΜΥΩΝ

Ο σκελετικός μυς των ενήλικων θηλαστικών ζώων –συμπεριλαμβανομένου του ανθρώπου– παρουσιάζει μια εντυπωσιακή ικανότητα συνεχών προσαρμογών στις μεταβαλλόμενες απαιτήσεις του περιβάλλοντος. Οι διαδικασίες, μέσω των οποίων συμβαίνουν οι προσαρμογές αυτές, διαφέρουν από τις άμεσες ή βραχυπρόθεσμες φυσιολογικές ανταποκρίσεις που ως αποτέλεσμα έχουν την προμήθεια υποστρωμάτων για την εκτέλεση του μυϊκού έργου κατά τη διάρκεια μιας σωματικής δραστηριότητας. Η σημαντικότερη διαφορά είναι ότι οι προσαρμογές απαιτούν αλλαγές στη γονιδιακή έκφραση μέσω τροποποιήσεων του ρυθμού μεταγραφής συγκεκριμένων γονιδίων και του ρυθμού σύνθεσης των πρωτεϊνών που κωδικοποιούν (Williams & Neuffer 1996).

Η γενετική πληροφορία ρέει από το DNA των γονιδίων στο RNA καταλήγοντας στη σύνθεση πρωτεϊνών, ενώ η ποσότητα μιας πρωτεΐνης κάτω από σταθερές συνθήκες αντιπροσωπεύει μια ισορροπία μεταξύ του ρυθμού σύνθεσης (μετάφρασης του mRNA) και του ρυθμού αποδόμησής της. Ο ρυθμός σύνθεσης κάθε πρωτεΐνης καθορίζεται, εν μέρει, από τη συγκέντρωση του αντίστοιχου mRNA, η οποία με τη σειρά της εξαρτάται από το ρυθμό σύνθεσής του (μεταγραφή) και το ρυθμό αποδόμησής του. Έτσι, η έκφραση ενός συγκεκριμένου γονιδίου αντιπροσωπεύει τη συνισταμένη μιας σειράς συνθετικών και αποικοδομητικών διαδικασιών (Williams & Neuffer 1996).

Η άσκηση αντοχής προκαλεί αύξηση της γονιδιακής έκφρασης συγκεκριμένων μυϊκών πρωτεϊνών (Booth & Thomason 1991· Williams & Neuffer 1996). Αυτός ο αναπρογραμματισμός της γονιδιακής έκφρασης έχει ως αποτέλεσμα –μεταξύ άλλων– την αύξηση των πρωτεϊνών που συμμετέχουν στον οξειδωτικό μεταβολισμό (Williams, Garcia-Moll, Mellor, Salmons & Harlan 1987· Williams, Salmons, Newsholme, Kaufman & Mellor 1986) και την αύξηση των αργών ισομορφών των συστατικών πρωτεϊνών (Brown, Salmons & Whalen 1983). Οι φυσιολογικές αυτές προσαρμογές καθιστούν το

μυ ανθεκτικό στον κάματο κατά τη διάρκεια παρατεταμένης συσταλτικής δραστηριότητας (Booth & Thomason 1991).

Οι παραπάνω προσαρμογές εξαρτώνται από τον τύπο της εκτελούμενης άσκησης και, επομένως, απαιτούν εξειδικευμένους ρυθμιστικούς μηχανισμούς (Aronson, Borpart, Dufresne, Fielding & Goodyear 1998). Οι ενδοκυτταρικοί μηχανισμοί όμως που συνδέουν τις βιοχημικές και μηχανικές επιδράσεις της άσκησης με την τροποποίηση της γονιδιακής έκφρασης είναι σχεδόν άγνωστοι (Aronson et al. 1998· Sherwood et al. 1999). Γενικά, έχει παρατηρηθεί ότι οποιεσδήποτε διαταραχές στην ομοίωση του κυττάρου καταλήγουν σε αλλαγές της γονιδιακής έκφρασης προς όφελος της προσαρμογής του οργανισμού στις μεταβαλλόμενες απαιτήσεις (Booth & Baldwin 1996).

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ

Οι αλλαγές στη γονιδιακή έκφραση προκαλούνται όταν ένα εξωτερικό σήμα προσκολληθεί στον αντίστοιχο υποδοχέα στη μεμβράνη ή στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου-στόχου. Από αυτό το σημείο ξεκινά ένας «καταρράχτης» ενδοκυτταρικών μεταβολικών αλλαγών, ο οποίος προκαλεί αύξηση της μεταγραφής του γονιδίου-στόχου. Σημαντικό ρόλο σε αυτήν τη διαδικασία παίζουν οι μεταγραφικοί παράγοντες, οι πρωτεΐνες δηλαδή που προσδέονται στο DNA του γονιδίου-στόχου και εκκινούν ή ρυθμίζουν τη μεταγραφή του (Blume, Herdegen & Unger 1999).

Μια μεγάλη κατηγορία μεταγραφικών παραγόντων είναι τα προϊόντα των άμεσων-πρώιμων γονιδίων (immediate-early genes, IEG), αν και δεν είναι όλα τα προϊόντα των IEG μεταγραφικοί παράγοντες (Hughes & Dragunow 1995). Τα προϊόντα των IEG, ανεξάρτητα από το εναρκτήριο ερέθισμα, διαθέτουν δύο κύρια χαρακτηριστικά: μετά τον κυτταρικό ερεθισμό (π.χ. από ένα μιτογόνο), η αύξηση του mRNA τους είναι αστραπιαία (συμβαίνει σε μερικά λεπτά) και παροδική (Cohen 1997). Η άμεση επαγωγή (δηλαδή η αύξηση του mRNA) των IEG οφείλεται στην ύπαρξη μεσολαβητικών

πρωτεϊνών που δεν απαιτούν *de novo* σύνθεση (Gess, Wolf, Pfeifer, Riegger & Kurtz 1997) και εξαρτάται μόνο από τροποποιήσεις παραγόντων που βρίσκονται ήδη στο κύτταρο (Thomson, Mahadevan & Clayton 1999). Τα προϊόντα των IEG που παίζουν ρόλο μεταγραφικού παράγοντα χωρίζονται σε οικογένειες. Οι πιο μελετημένες τέτοιες οικογένειες είναι η *fos*, η *jun* και η *egr*, ενώ ο αριθμός των οικογενειών, αλλά και των μελών τους, διαρκώς αυξάνεται (Cohen 1997). Οι IEG μεταγραφικοί παράγοντες είναι επαγωγίμοι, δηλαδή η έκφρασή τους ελέγχεται από εξωγενή ερεθίσματα, σε αντίθεση με τους σταθερά εκφραζόμενους μεταγραφικούς παράγοντες που βρίσκονται γενικά σε σταθερή ποσότητα (Cohen 1997).

Δομή και λειτουργία του *c-fos*

Τα μέλη της οικογένειας *fos* που έχουν χαρακτηριστεί μέχρι σήμερα είναι τα *c-fos*, *fosB*, *fosBdel* και τα συνδεδεμένα με τα *fos* αντιγόνα *fra-1* και *fra-2* (Morgan & Curran 1995). Από αυτά, το πιο συχνά μελετώμενο γονίδιο είναι το *c-fos* [το αρχικό *c* προέρχεται από το *cellular* προς διάκριση από το ιικό *fos* (*v-fos*)], το οποίο συχνά αναφέρεται και ως πρωτοογκογονίδιο, γιατί ελέγχει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και μπορεί να προκαλέσει καρκινώματα μετατρέπόμενο με μετάλλαξη σε ογκογονίδιο (Zubay 1998). Το *c-fos* (σχήμα 1) κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη που αποτελείται από 380 αμινοξέα και έχει μοριακή μάζα 62 kDa (Curran, Miller, Zokas & Verma 1984). Η *c-Fos*, μαζί με ένα μέλος της οικογένειας *Jun*, απαρτίζει το μεταγραφικό παράγοντα AP-1 (activator protein 1), ο οποίος είναι ένα διμερές αποτελούμενο είτε από ένα μέλος κάθε οικογένειας είτε από δύο μέλη της οικογένειας *Jun*. Η σύσταση του AP-1 επηρεάζει τη μεταγραφική δραστηριότητά του και την εξειδίκευσή του ως προς τα γονίδια-στόχους (Angel & Karin 1991).

Η μεταγραφή του *c-fos*, όπως και κάθε άλλου γονιδίου, επηρεάζεται από την προηγούμενη αλληλουχίας βάσεων του DNA, που ονομάζεται επαγωγέας. Ο επαγωγέας του *c-fos* αποτελείται από τρία κύρια μέρη, το ανταποκρινόμενο στον ορό στοιχείο (SRE), το *Sis*-επαγωγίμο στοιχείο και το ανταποκρινόμενο στο κυκλικό AMP

στοιχείο (CRE, Thomson et al. 1999). Το SRE καταλαμβάνεται από δύο πρωτεΐνες που ονομάζονται ανταποκρινόμενος στον ορό παράγοντας (SRF) και παράγοντας τριμερούς συμπλέγματος. Παρομοίως, το CRE καταλαμβάνεται από τη συνδεόμενη με το CRE πρωτεΐνη (πρωτεΐνη CREB, Thomson et al. 1999). Τέλος, το Sis-επαγωγίμο στοιχείο καταλαμβάνεται μόνο μετά από ενεργοποίηση αυξητικών παραγόντων (Thomson et al. 1999).

Πιστεύεται ότι η επαγωγή του γονιδίου c-fos ως αποτέλεσμα αλλαγών στη συστατική δραστηριότητα των μυών μπορεί να αποτελέσει την απαρχή αλλαγών στη ρύθμιση γονιδίων που κωδικοποιούν, μεταξύ άλλων, και μυϊκές πρωτεΐνες. Οι πρωτεΐνες αυτές περιλαμβάνουν τη σκελετική α -ακτίνη2 (Bishopric, Jayasena & Webster 1992; Paradis, MacLellan, Belaguli, Schwartz & Schneider 1996) και τις ελαφριές αλυσίδες της μυοσίνης (Iwaki, Sukhatme, Shubeita & Chien 1990). Επιπλέον, έχει βρεθεί σε καλλιέργειες μυϊκών κυττάρων ότι το γονίδιο του κοιλιακού νατριουρητικού πεπτιδίου περιέχει στον επαγωγέα του θέση για το μεταγραφικό παράγοντα AP-1 (Rosenzweig, Halazonetis, Seidman & Seidman 1991) και η θέση αυτή είναι σημαντική για την ενεργοποίηση ή την καταστολή της έκφρασης του γονιδίου από τον AP-1 (Kovacic-Milivojevic & Gardner 1992). Παρομοίως, θέση σύνδεσης με τον AP-1 υπάρχει στον επαγωγέα της γαλακτικής αφυδρογονάσης (Ryuto et al. 1996) και στον επαγωγέα του ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (Short et al. 1994). Για να μπορέσει όμως η c-Fos να επηρεάσει την έκφραση των παραπάνω γονιδίων θα πρέπει και της ίδιας η έκφραση να επαχθεί μέσω σύνθετων ενδοκυτταρικών οδών.

Κυτταρική σηματοδότηση είναι η διαδικασία μέσω της οποίας ένα εξωκυτταρικό σήμα προκαλεί μια ενδοκυτταρική μεταβολική αλλαγή (Sleight & Lieberman 1998). Η πλειονότητα των εξωκυτταρικών σημάτων δρουν εμμέσως, μέσω πολύπλοκων σηματοδοτικών οδών που προκαλούν ενίσχυση του σήματος. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα ένας μικρός αριθμός εξωκυτταρικών σηματοδοτικών μορίων να επηρεάζει τη λειτουργία πολλών πρωτεϊνών, οι οποίες προκαλούν την επιθυμητή φυσιολογική

ανταπόκριση (Sleight & Lieberman 1998). Μια σχηματική ανασκόπηση της σηματοδοτικής οδού από την πρόσδεση του εξωκυτταρικού σήματος (π.χ. ορμόνη) στον κυτταρικό υποδοχέα μέχρι τη σύνδεση του μεταγραφικού παράγοντα c-Fos (στην πραγματικότητα του διμερούς με μέλος της οικογένειας Jun) στο DNA παρουσιάζεται στο σχήμα 2.

Η άσκηση είναι ένα σύνθετο ερέθισμα που διεγείρει πολλές βιοχημικές και βιοφυσικές πλευρές της κυτταρικής λειτουργίας (Hayashi et al. 1999a). Γι' αυτό, η πρόοδος και τα ερευνητικά δεδομένα στην κατανόηση των μηχανισμών που ρυθμίζουν τη γονιδιακή έκφραση είναι περιορισμένα. Έτσι, συχνά θα αναφερόμαστε σε αποτελέσματα από άλλα καλά μελετημένα μοντέλα, τα οποία συνδέονται με τα ερεθίσματα που προκαλεί η άσκηση και σχετίζονται με τις ανταποκρίσεις της. Για τον ίδιο λόγο, θα παρουσιαστούν αποτελέσματα από μελέτες που έχουν χρησιμοποιήσει άλλους μύες εκτός του σκελετικού, ενώ μερικές φορές θα παρουσιαστούν αποτελέσματα από ποικίλους κυτταρικούς τύπους. Επιπλέον, θα σχολιαστούν έρευνες που χρησιμοποίησαν καλλιέργειες κυττάρων, μυϊκά παρασκευάσματα, άθικτα πειραματόζωα και ανθρώπους. Οι Hayashi, Hirshman, Dufresne & Goodyear (1999b) και οι Xia, Buja, Scarpulla & McMillin (1997), σχολιάζοντας τη σημασία των ερευνών που χρησιμοποίησαν πρωτόκολλα σε καλλιέργειες κυττάρων και απομονωμένους μύες *in vitro*, ανέφεραν ότι προσφέρουν πλούσιες πληροφορίες σχετικά με την επίδραση της τροποποιημένης συσταλτικής δραστηριότητας στη γονιδιακή έκφραση και στην κυτταρική σηματοδότηση. Παρακάτω αναλύονται εργασίες που χρησιμοποίησαν πλήθος πειραματικών μοντέλων, ξεκινώντας από τα λιγότερο σχετικά και καταλήγοντας στα πιο συναφή με την άσκηση. Η έκταση που δίνεται σε κάθε πειραματικό μοντέλο και σε κάθε εργασία αντιστοιχεί στη σημασία των αποτελεσμάτων της στη μελέτη της επίδρασης της άσκησης στην έκφραση του γονιδίου c-fos.

Μελέτες σε κυτταροκαλλιέργειες

Ένας πιθανός μηχανισμός ρύθμισης της έκφρασης του c-fos κατά τη διάρκεια της

άσκησης αλλά και μετά από αυτήν, είναι η αύξηση της συγκέντρωσης των ιόντων ασβεστίου στο κυτταρόπλασμα των μυϊκών κυττάρων. Οι μηχανισμοί σηματοδότησης που εξαρτώνται από τη συγκέντρωση του ασβεστίου έχουν τεράστια σημασία στη μελέτη των μεταγραφικών αλλαγών που συμβαίνουν στο σκελετικό μυ λόγω της άσκησης (Baar, Blough, Dineen & Esser 1999). Ενδεικτικά, κατά τη διάρκεια μιας μέτριας σε ένταση μυϊκής συστολής, τα κυτταροπλασματικά επίπεδα των ιόντων ασβεστίου αυξάνονται περίπου κατά 100 φορές (Baar et al. 1999). Οι Bito, Deisseroth & Tsien (1996) προκάλεσαν αυξημένη συναπτική δραστηριότητα σε κύτταρα από τον υπόκαμπο εφαρμόζοντας ηλεκτρικό ερεθισμό. Η αυξημένη συναπτική δραστηριότητα προξένησε παροδική αύξηση της συγκέντρωσης των ιόντων ασβεστίου στο κυτταρόπλασμα και σημαντική αύξηση του mRNA του c-fos.

Συχνά χρησιμοποιούνται και συγκρίνονται ερευνητικά δεδομένα από μελέτες που προκάλεσαν υποξία με τεχνητό (π.χ. παρεμπόδιση της μιτοχονδριακής αναπνοής) ή φυσιολογικό τρόπο (π.χ. έκθεση σε υψόμετρο) με δεδομένα από μελέτες που χρησιμοποίησαν άσκηση ως ερέθισμα. Η αντιπαραβολή ευρημάτων δε στερείται φυσιολογικής εξήγησης, αφού έχει διαπιστωθεί ότι μείωση της διαθεσιμότητας του οξυγόνου διεγείρει τη δημιουργία τριχοειδών αγγείων και αυξάνει την ταχύτητα της γλυκολυτικής οδού. Μελέτες σε ανθρώπους και ζώα έχουν δείξει ότι η άσκηση προκαλεί παρόμοιες επιδράσεις. Έτσι, φαίνεται λογικό μια έντονη άσκηση να μπορεί να αλλάξει το μεταβολικό και φυσιολογικό φαινότυπο ως αποτέλεσμα υποξίας των ιστών. Επιπρόσθετα, μοριακές αλλαγές ως αποτέλεσμα αναιμίας, έκθεσης σε υψόμετρο ή αγγειακών παθήσεων προκαλούν παρόμοιες προσαρμογές με αυτές της άσκησης (Baar et al. 1999). Ενδεικτικά, οι Gess et al. (1997) μελέτησαν *in vivo* την επίδραση έκθεσης σε μονοξείδιο του άνθρακα (προκαλεί αναπνευστική υποξία) στα επίπεδα του mRNA του c-fos στον καρδιακό μυ επιμύων και ανέφεραν αύξηση κατά περίπου 20 φορές συγκριτικά με τα επίπεδα ηρεμίας.

Αποτέλεσμα της υποξίας είναι η μεταβολή του λόγου της κατάστασης φωσφορυλίωσης

(Rr), του λόγου δηλαδή $[ATP]/([ADP] \times [Pi])$. Ο Rr μειώνεται μέσα σε 15 min από την έναρξη ηλεκτρικού ερεθισμού χαμηλής συχνότητας και παραμένει μειωμένος καθ' όλη τη διάρκεια της επιβάρυνσης (Green, Dusterhoft, Dux & Pette 1992). Υπάρχουν μελέτες που υποστηρίζουν ότι αλλαγές στον Rr μπορούν να αποτελέσουν την απαρχή για την επαγωγή της έκφρασης πολλών γονιδίων (Lai & Booth 1990). Παρ' όλα αυτά, οι Li, Neuffer & Williams (1995) ανέφεραν σταθερά επίπεδα του mRNA του c-fos σε οστεοσαρκωματικά κύτταρα, από τα οποία έλειπε το μιτοχονδριακό DNA, προκαλώντας έτσι χρόνια μείωση της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Αντίθετα, σε μια μεταγενέστερη μελέτη από το ίδιο εργαστήριο, στην οποία έγχυσαν ροτενόνη (έναν αναστολέα της αναπνευστικής αλυσίδας) στον πρόσθιο κνημιαίο κουνελιών (Neuffer 1999), τα επίπεδα mRNA του c-fos αυξήθηκαν κατά περίπου 5 φορές συγκριτικά με τα επίπεδα ηρεμίας. Όταν όμως ο ηλεκτρικός ερεθισμός διάρκειας 4 ωρών συνοδεύτηκε από έγχυση ρετονόνης, δεν υπήρξε πρόσθετη αύξηση, υποδηλώνοντας ότι η ηλεκτρική διέγερση αποτελεί ένα μέγιστο ερέθισμα για την επαγωγή του συγκεκριμένου IEG.

Στον ασκούμενο μυ μπορεί να συσσωρευτεί γαλακτικό οξύ, με αυτόν τον τρόπο να αυξηθεί η ωσμωτικότητα και ο κυτταρικός όγκος και κατά συνέπεια να προκληθεί κυτταρική διόγκωση (Saltin, Sjøgaard, Strange & Juel 1987). Η κυτταρική διόγκωση μπορεί να προκαλέσει αλλαγές στην έκφραση πολλών γονιδίων, μεταξύ αυτών και του c-fos (Lang et al. 1998). Πραγματικά, διόγκωση μυϊκών κυττάρων της καρδιάς in vitro λόγω χαμηλής ωσμωτικότητας του μέσου καλλιέργειας, συγκριτικά με αυτήν στο εσωτερικό των κυττάρων, προκάλεσε αύξηση του mRNA του c-fos (Sadoshima, Qiu, Morgan & Izumo 1996).

Αρκετοί ερευνητές έχουν προκαλέσει συστολή σε μυϊκά κύτταρα in vitro διεγείροντάς τα ηλεκτρικά (Chahine, Walke & Goldman 1992· Dusterhoft & Pette 1990), στην προσπάθεια τους να απομονώσουν την επίδραση της ηλεκτρικής δραστηριότητας στη γονιδιακή έκφραση (Kubisch et al. 1993). Οι Xia, Buja & McMillin (1998) και οι Xia et al. (1997) χρησιμοποιώντας καρδιακά μυϊκά κύτταρα βρήκαν αύξηση του mRNA του c-fos

μετά από ηλεκτρικό τους ερεθισμό. Ωστόσο, η αύξηση αυτή δε γνωρίζουμε αν προήλθε από τον ηλεκτρικό ερεθισμό ή από τη μηχανικό στρες που προκαλεί η επακόλουθη μυϊκή συστολή. Προσπαθώντας να απαντήσουν αυτό ακριβώς το ερώτημα οι Kubisch et al. (1993) χρησιμοποίησαν έναν ηλεκτρομηχανικό αποζεύκτη ασβεστίου και, προκαλώντας πλήρη αναστολή της συστολής μυϊκών κυττάρων της καρδιάς, δε βρήκαν αλλαγές στην έκφραση του c-fos μετά από ηλεκτρική δραστηριοποίηση. Οι συγγραφείς συμπέραναν ότι η μυϊκή συστολή και όχι η ηλεκτρική διέγερση είναι το ερέθισμα που προκαλεί αλλαγές στην έκφραση του πρωτοογκογονιδίου.

Τα αποτελέσματα από τη διάταση μυϊκών κυττάρων (σε ειδικά τρυβλία με επικάλυψη από ελαστική σιλικόνη) χρησιμοποιούνται συχνά στη διερεύνηση των πιθανών μηχανισμών που συνδέουν την άσκηση με τις αλλαγές στη γονιδιακή έκφραση. Η συσχέτιση μεταξύ των ευρημάτων της κυτταρικής διάτασης και της άσκησης στηρίζεται στο κοινό στοιχείο που υπάρχει μεταξύ των δύο πειραματικών μοντέλων: τη μηχανική επιβάρυνση (Baar et al. 1999). Πραγματικά, τα μυϊκά κύτταρα (και όχι μόνο αυτά) ανταποκρίνονται στα μηχανικά ερεθίσματα μέσω αλλαγών στην έκφραση πολλών γονιδίων (Goldsprink 1999). Έτσι, η συγκέντρωση του mRNA του c-fos βρέθηκε αυξημένη (περίπου κατά 20 φορές συγκριτικά με τα επίπεδα ηρεμίας) μετά από διάταση καρδιακών κυττάρων, ενώ η αύξηση ήταν ευθέως ανάλογη του βαθμού διάτασης (Komuro & Yazaki 1993). Παρόμοια αποτελέσματα έχουν αναφερθεί και σε άλλες μελέτες που έχουν χρησιμοποιήσει συναφή πειραματικό σχεδιασμό (Sadoshima & Izumo 1997; Sadoshima & Izumo 1996). Γενικά, οι περισσότερες έρευνες έχουν χρησιμοποιήσει καρδιακά κύτταρα σε καλλιέργεια, λόγω της κλινικής σημασίας που έχει η αποδεδειγμένη συσχέτιση μεταξύ του αυξημένου καρδιακού φορτίου και της υπερτροφίας του μυοκαρδίου (Sadoshima & Izumo 1997).

Αντίθετα, δε βρέθηκαν εργασίες που να χρησιμοποιήσαν σκελετικά μυϊκά κύτταρα. Αύξηση του mRNA του c-fos αναφέρθηκε και από τους Pavalko et al. (1998) χρησιμοποιώντας διαφορετικό πειραματικό μοντέλο επιβάρυνσης (ρέον υγρό πάνω

από την επιφάνεια των κυττάρων) σε οστεοβλαστικά κύτταρα. Επίσης, οι Grembowicz et al. (1999) ανέφεραν ότι η διάρρηξη της κυτταρικής μεμβράνης με βελόνα ήταν ικανή να προκαλέσει αύξηση της c-Fos. Οι ίδιοι συγγραφείς πρότειναν την υπόθεση ότι η διάρρηξη της κυτταρικής μεμβράνης επιτρέπει την είσοδο φυσιολογικά μη εισερχόμενων μορίων στο κυτταρόπλασμα με αποτέλεσμα τη διέγερση άγνωστων μέχρι στιγμής σηματοδοτικών οδών.

Μελέτες σε πειραματόζωα με τροποποίηση συσταλτικής δραστηριότητας που δε μιμούνται ικανοποιητικά την ανθρώπινη σωματική δραστηριότητα

Αφήνοντας τις μελέτες που χρησιμοποίησαν καλλιέργειες κυττάρων, παρακάτω θα αναλυθούν ευρήματα από έρευνες που χρησιμοποίησαν πειραματόζωα (πίνακας) και ορισμένες φορές *in vitro* μοντέλα μυϊκής συστολής (δηλαδή αφαίρεση ενός μυός και πρόκληση συστολής με τη βοήθεια ηλεκτροδίων).

Ίσως η πρώτη προσπάθεια διερεύνησης της επίδρασης της τροποποιημένης συσταλτικής δραστηριότητας στην έκφραση του c-fos έγινε από τους Bessereau, Fontaine & Changeux (1990), αφαιρώντας το ισχιακό νεύρο και μελετώντας την επίδραση της απονεύρωσης (ένα μοντέλο που προκαλεί μειωμένη νευρομυϊκή δραστηριότητα) στον υποκνημίδιο μυ μυών. Η ανταπόκριση του mRNA του c-fos παρουσίασε τρεις φάσεις: μετά από 1,5 και 3 h υπήρξε αύξηση, 6 h και 1 ημέρα μετά επιστροφή στα επίπεδα ηρεμίας, ενώ 2 και 8 ημέρες μετά την απονεύρωση παρουσιάστηκε πάλι αύξηση. Ακολούθησε η εργασία του Weis (1994), η οποία έδειξε ότι η αύξηση του mRNA του c-fos που αναφέρθηκε από τους Bessereau et al. (1990) ακολουθείται από αύξηση της c-Fos. Στη μελέτη αυτή όμως, η απονεύρωση εφαρμόστηκε στο διάφραγμα επιμύων.

Ο ίδιος ερευνητής (Weis 1994), με τη μέθοδο της ανοσοϊστοχημείας,³ εντόπισε την πρωτεΐνη στους πυρήνες των μυϊκών ινών. Παρόλα αυτά, η αξιολόγηση των αλλαγών που συμβαίνουν ως αποτέλεσμα της απονεύρωσης παρουσιάζει αρκετά προβλήματα.

Αν και ο χειρισμός αυτός εξαλείφει τη νευρομυϊκή δραστηριότητα, δεν αποκλείει απαραίτητα το μηχανικό φορτίο που δέχεται ο μυς, για παράδειγμα λόγω της βαρύτητας (Pette & Staron 1997). Επίσης, ο ινιδισμός που συνοδεύει την απονεύρωση μπορεί για κάποιο χρονικό διάστημα να επηρεάσει τις κύριες επιδράσεις της (Pette & Staron 1997).

Οι Yegama, Umemoto & Senba (1996) μελέτησαν σε επίμυες την επίδραση της ανάρτησης των οπισθίων άκρων επιμύων (ένα μοντέλο που επίσης επιφέρει μείωση της νευρομυϊκής δραστηριότητας) στη συγκέντρωση του mRNA του c-fos και της c-Fos στο μυοκάρδιο και στις λείες μυϊκές ίνες των στεφανιαίων αρτηριών. Ανάρτηση των οπισθίων άκρων για 30 min προκάλεσε αύξηση του mRNA του c-fos, ενώ μετά από 2 h οι αυξήσεις ήταν φανερές και σε πρωτεϊνικό επίπεδο και στους δύο ιστούς. Ανάρτηση των οπισθίων άκρων επιμύων χρησιμοποίησαν και οι Wittwer, Desplanches, Horpeler & Billeter (2000), μελετώντας όμως την επίδραση της υποκινησίας στην έκφραση εκατοντάδων γονιδίων (με τη χρησιμοποίηση γονιδιακών chips) στον υποκνημίδιο μυ. Βρέθηκε ότι το mRNA του c-fos αυξήθηκε 2-4 φορές συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου.

Πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι η έντονη, ασυνήθιστη και ιδιαίτερα η έκκεντρη άσκηση καταστρέφει τη συνοχή της κυτταρικής μεμβράνης και της εξωκυτταρικής ουσίας (Clarkson & Sayers 1999). Έτσι, οι επιδράσεις της μυϊκής καταστροφής στην κυτταρική σηματοδότηση μπορεί να σχετίζονται άμεσα με τις επιδράσεις της άσκησης. Οι Kami, Noguchi & Senba (1995) προκάλεσαν μυϊκό τραυματισμό αφήνοντας έναν κύλινδρο αλουμινίου βάρους 640 g να πέσει πάνω στο γαστροκνήμιο μυ επιμύων. Το mRNA του c-fos αυξήθηκε 3, 6 και 24 h μετά τον τραυματισμό στους πυρήνες των μυϊκών ινών και των δορυφορικών κυττάρων.

Στις αρχές της προηγούμενης δεκαετίας πολλοί ερευνητές προσπάθησαν να αποδείξουν ότι η αυξημένη έκφραση του c-fos (αλλά και άλλων πρωτοογκογονιδίων, όπως του c-jun, του c-myc και του ski) αποτελεί ένα από τα αρχικά στάδια

προσαρμογής των σκελετικών μυών σε ερεθίσματα που αποδεδειγμένα προκαλούν υπερτροφία, π.χ. διάταση ή αφαίρεση συνεργών μυών (Dawes, Cox, Park, Nga & Goldspink 1996· Goldspink et al. 1995· Osbaldeston et al. 1995· Tsika & Gao 1996· Whitelaw & Hesketh 1992b).

Οι Whitelaw & Hesketh (1992b) προκάλεσαν υπερτροφία στον υποκνημίδιο και στον πελματιαίο μυ επίμυος είτε αφαιρώντας το γαστροκνήμιο μυ (συνεργός μυς) είτε χορηγώντας κλενβουτερόλη, έναν αγωνιστή των β-αδρενεργικών υποδοχέων. Δεν παρουσιάστηκε αύξηση του mRNA του c-fos στον πελματιαίο μυ σε καμία χρονική στιγμή μετά την αφαίρεση του γαστροκνημίου (3-48 h), ενώ το ίδιο συνέβη και μετά τη χορήγηση κλενβουτερόλης. Αντίθετα, οι Tsika & Gao (1996) χρησιμοποιώντας παρόμοιο μοντέλο μηχανικής επιβάρυνσης (αφαίρεση του γαστροκνημίου και του υποκνημιδίου μυός) και μελετώντας τον πελματικό μυ, ανέφεραν αύξηση του mRNA του c-fos 1 και 3 h μετά τη φόρτιση.

Ένα άλλο μοντέλο αυξημένης μηχανικής επιβάρυνσης είναι η διάταση σκελετικών μυών *in vivo*. Η διάταση πετυχαίνεται με δύο τρόπους: με ακινητοποίηση ενός μέλους και του προς μελέτη μυός σε επιμηκυμένη θέση (Lieber 1992) ή με εμφύτευση ειδικού διογκωτικού υλικού (σιλικόνης, Dawes et al. 1996). Το μοντέλο αυτό προξενεί απότομες και μεγάλες αλλαγές στην έκφραση πολλών γονιδίων συστατικών πρωτεϊνών και κατά συνέπεια προκαλεί έντονη μυϊκή υπερτροφία (Goldspink et al. 1992). Συνεπώς, και αυτό το μοντέλο έχει χρησιμοποιηθεί στην προσπάθεια διερεύνησης των σηματοδοτικών οδών που οδηγούν στην αύξηση του περιεχομένου των μυών σε πρωτεΐνες και φαίνεται λογικό τα αποτελέσματα των σχετικών ερευνών να έχουν κάποια εφαρμογή στις επιδράσεις της άσκησης.

Οι Dawes et al. (1996) μελέτησαν την επίδραση της διάτασης (και με τους δύο τρόπους που περιγράφηκαν παραπάνω) στον πλατύ ραχιαίο μυ κουνελιών. Από τα αποτελέσματα φάνηκε ότι διάταση τουλάχιστον για 1 h ήταν απαραίτητη για να

επιτευχθεί η μέγιστη επαγωγή του mRNA του c-fos, ενώ επιπλέον παρουσιάστηκε συσχέτιση μεταξύ του βαθμού διάτασης και της έκφρασης του c-fos. Ωστόσο, μέτρηση της c-Fos δεν έγινε.

Μια λίγο διαφορετική μεθοδολογική προσέγγιση με ενδιαφέροντα αποτελέσματα παρουσιάστηκε από τον Goldspink και τους συνεργάτες του (1995). Η ερευνητική αυτή ομάδα συνδύασε τη διάταση με ηλεκτρικό ερεθισμό χαμηλής συχνότητας (10 Hz, συχνότητα που δέχεται φυσιολογικά ένας αργός μυς, Harridge 1996) και μελέτησε την επίδραση διάτασης, ηλεκτρικού ερεθισμού και συνδυασμού των δύο στα επίπεδα του mRNA του c-fos στο μακρό εκτείνοντα τους δακτύλους μυ κουνελιών. Η διάταση προκάλεσε μέγιστη αύξηση του mRNA του c-fos 1 h μετά την επιβάρυνση (75 φορές πάνω από τα επίπεδα ηρεμίας) και ο ηλεκτρικός ερεθισμός 4,5 με 6 h μετά (20 φορές πάνω από τα επίπεδα ηρεμίας). Ο συνδυασμός των δύο χειρισμών προκάλεσε τη μεγαλύτερη επαγωγή (140 φορές πάνω από τα επίπεδα ηρεμίας), ενώ επιπλέον προκάλεσε την πιο γρήγορη αύξηση (μόλις 15 min μετά την έναρξη της φόρτισης, Goldspink et al. 1995). Από το ίδιο εργαστήριο έχει αναφερθεί ότι ο συνδυασμός διάτασης-ηλεκτρικού ερεθισμού προκάλεσε πιο γρήγορη μετατροπή των μυϊκών ινών ταχείας συστολής σε βραδείας συγκριτικά με τον ηλεκτρικό ερεθισμό μόνο του, υποδηλώνοντας εμμέσως εμπλοκή του c-fos στη μετατροπή αυτή (Goldspink, Eastern, Winterburn, Williams & Goldspink 1991).

Σε μια άλλη εργασία από το ίδιο εργαστήριο οι Osbaldeston et al. (1995) μελέτησαν την επίδραση διάτασης ή ηλεκτρικού ερεθισμού χαμηλής συχνότητας του πλατέος ραχιαίου μυός κουνελιών στα επίπεδα της c-Fos προσπαθώντας παράλληλα να εντοπίσουν τη θέση της πρωτεΐνης. Η μέγιστη αύξηση της c-Fos και με τους δύο χειρισμούς επήλθε μετά από 3-8 h επιβάρυνσης. Μετά τη διάταση, αντίσωμα κατά της c-Fos επισημασμένο με μία υπεροξειδάση αποκάλυψε συσσώρευση της πρωτεΐνης στους πυρήνες των μυϊκών ινών και των ενδιάμεσων κυττάρων. Αντίθετα, μετά τον ηλεκτρικό ερεθισμό η c-Fos εντοπίστηκε κυρίως στους πυρήνες των ενδιάμεσων

κυττάρων. Επιπλέον, η αύξηση του mRNA του γονιδίου συνοδεύτηκε από αύξηση της πρωτεΐνης. Σε μια τρίτη μελέτη από το ίδιο εργαστήριο (Dawes, Lee, Cox, Nga & Goldspink 1995) αναφέρθηκε ότι ηλεκτρικός ερεθισμός του ίδιου μυός με μικρότερη συχνότητα (2 Hz) προκάλεσε παρόμοια επαγωγή του c-fos σε επίπεδο mRNA συγκριτικά με τα 10 Hz που χρησιμοποίησαν οι Osbaldeston et al. (1995).

Πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι η αυξημένη συσταλτική δραστηριότητα λόγω άσκησης προκαλεί αλλαγές ποιοτικά παρόμοιες αλλά ποσοτικά χαμηλότερες από το χρόνιο ηλεκτρικό ερεθισμό χαμηλής συχνότητας (Kraus, Torgan & Taylor 1994; Pette & Vrbova 1997). Για αυτόν το λόγο, η ηλεκτρική διέγερση είναι ένα μοντέλο πρόκλησης μυϊκής συστολής ιδιαίτερα δημοφιλές στους ερευνητές που μελετούν τις αλλαγές που προκαλεί η τροποποιημένη συσταλτική δραστηριότητα στη γονιδιακή έκφραση. Οι Inoue, Fushiki, Kano, Moritani & Sugimoto (1991) μελέτησαν την επίδραση ηλεκτρικού ερεθισμού υψηλής συχνότητας (100 Hz) στην έκφραση του mRNA του c-fos στο γαστροκνήμιο μυ επιμύων. Αναφέρθηκε αύξηση του mRNA του c-fos μετά από μόλις 4 s ηλεκτρικού ερεθισμού. Τα επίπεδα παραμείνανε υψηλά επί 2 h και επέστρεψαν στα πριν την επιβάρυνση επίπεδα μετά από 6 h. Οι Michel, Ordway, Richardson & Williams (1994) μελέτησαν την επίδραση χρόνιου ηλεκτρικού ερεθισμού χαμηλής συχνότητας διάρκειας από 45 min μέχρι 21 ημέρες, στην έκφραση του c-fos σε επίπεδο mRNA και πρωτεΐνης στον πρόσθιο κνημιαίο μυ κουνελιών. Το c-fos επάχθηκε και στα δύο επίπεδα μέσα στις πρώτες 24 h. Ο μεγαλύτερος σε διάρκεια ερεθισμός συνοδεύτηκε από μια δεύτερη παρατεταμένη αύξηση της c-Fos χωρίς, περιέργως, αντίστοιχη αύξηση του mRNA του c-fos. Ανοσοαντιδραστικότητα της c-Fos εκδηλώθηκε μέσα στους πυρήνες των μυϊκών ινών και των αγγειακών κυττάρων στην αρχή (1η ημέρα) και στο τέλος (21η ημέρα) της επιβάρυνσης, αναδεικνύοντας τη c-Fos ως ένα πιθανό πρώιμο κυτταρικό σήμα προσαρμογής του σκελετικού μυός στην τροποποίηση της συσταλτικής δραστηριότητας.

Οι Aronson, Dufresne & Goodyear (1997a) μελέτησαν την επίδραση του χρόνιου

ηλεκτρικού ερεθισμού υψηλής συχνότητας (100 Hz) στην έκφραση του mRNA του c-fos στο γαστροκνήμιο μυ επιμύων. Μετά από 15 min ηλεκτρικής διέγερσης του ισχιακού νεύρου, η έκφραση του mRNA του c-fos είχε αυξηθεί κατά 20 φορές συγκριτικά με το ετερόπλευρο οπίσθιο άκρο που δε διεγέρθηκε και χρησιμοποιήθηκε για σύγκριση.

Οι Neuffer, Ordway & Williams (1998) προσπάθησαν να ελέγξουν την υπόθεση ότι οι αλλαγές στη γονιδιακή έκφραση μετά από αυξημένη συσταλτική δραστηριότητα προκαλούνται κυρίως κατά τη διάρκεια της αποκατάστασης. Έτσι, ερέθισαν ηλεκτρικά (8 Hz) τον πρόσθιο κνημιαίο μυ επιμύων, 8 h ανά ημέρα για 1-14 ημέρες. Την πρώτη ημέρα, το mRNA του c-fos αυξήθηκε 2 h μετά το τέλος του ερεθισμού και ακολούθησε γρήγορη μείωση και επιστροφή στα επίπεδα ηρεμίας μέσα σε 8 h αποκατάστασης. Για να διαπιστώσουν αν κάτι ανάλογο συμβαίνει μετά από ηλεκτρική διέγερση μεγαλύτερης διάρκειας, ανάλυσαν το mRNA του c-fos μετά από 14 ημέρες ηλεκτρικού ερεθισμού. Η έκφραση του γονιδίου σε επίπεδο mRNA βρέθηκε αυξημένη στις 2 και 4 h μετά τη διακοπή της διέγερσης επιστρέφοντας στα επίπεδα ηρεμίας πριν τον ερεθισμό μετά από 24 h αποκατάστασης. Είναι ενδιαφέρον ότι δεν αναφέρθηκαν αλλαγές στα επίπεδα mRNA του c-fos (Neuffer et al. 1998). Οι Sherwood et al. (1999), χρησιμοποιώντας ίδιο πρωτόκολλο με προγενέστερη μελέτη τους (Aronson et al. 1997a) αλλά αυτήν τη φορά αναλύοντας μείγμα μυών των οπισθίων άκρων (αποτελούμενο από το δικέφαλο μηριαίο, το γαστροκνήμιο και τον υποκνημίδιο), μελέτησαν την επίδραση της ηλεκτρικής διέγερσης υψηλής συχνότητας (100 Hz) στην έκφραση του c-fos. Τα αποτελέσματα ήταν παρόμοια: βρέθηκε αύξηση του mRNA του c-fos, κατά περίπου 25 φορές συγκριτικά με τα επίπεδα ηρεμίας, αμέσως μετά από 15, 30 και 60 min ηλεκτρικής διέγερσης (Sherwood et al. 1999).

Ωστόσο, οι προσαρμογές που προκαλεί στο σκελετικό μυ ο ηλεκτρικός ερεθισμός αποκλείουν τις γενικευμένες ορμονικές επιδράσεις της άσκησης (Nieto, Diaz-Laviada, Malpartida, Galve-Roperh & Haro 1997). Επιπλέον, σε αντίθεση με το συχνά συνεχές ερέθισμα της ηλεκτρικής διέγερσης, οι περίοδοι αυξημένης συσταλτικής

δραστηριότητας λόγω της προπόνησης απέχουν περίπου 24 h μεταξύ τους (Kraus et al. 1994). Επιπρόσθετα, ο ηλεκτρικός ερεθισμός προκαλεί στρατολόγηση όλων των μυϊκών ινών, σε αντίθεση με την άσκηση, που προκαλεί στρατολόγηση με ιεραρχικό τρόπο, ενώ, τέλος, περιλαμβάνει και μεταφορά του βάρους του υποκειμένου, παράγοντες που μπορούν να επηρεάσουν την έκφραση πολλών γονιδίων (O'Neill, Zheng, Anderson, Dohm & Houmard 1999).

Μελέτες σε πειραματόζωα με τροποποίηση συσταλτικής δραστηριότητας που μιμούνται ικανοποιητικά την ανθρώπινη σωματική δραστηριότητα, και σε ανθρώπους⁴. Βρέθηκαν τρεις μελέτες που έχουν χρησιμοποιήσει μοντέλα, τα οποία μιμούνται ικανοποιητικά ή αποτελούν μέρος της ανθρώπινης σωματικής δραστηριότητας, και έχουν ερευνήσει την επίδρασή τους στην έκφραση του c-fos (Dufresne et al. 2001· Murakami, Shimomura, Yoshimura, Sokabe & Fujitsuka 1998· Puntschart et al. 1998).

Οι Dufresne et al. (2001) ανέφεραν δεκαπενταπλασιασμό του mRNA του c-fos σε μείγμα μυών των οπισθίων άκρων μυών αμέσως μετά από τρέξιμο διάρκειας 60 min σε δαπεδοεργόμετρο. Οι Puntschart et al. (1998) μελέτησαν την επίδραση άσκησης διάρκειας 30 min σε δαπεδοεργόμετρο στα επίπεδα mRNA και πρωτεΐνης του c-fos στον έξω πλατύ μηριαίο μυ αγύμναστων ανδρών και γυναικών. Τα επίπεδα του mRNA του c-fos αυξήθηκαν κατά 20, 16 και 3,5 φορές, 4, 30 και 180 min μετά το τέλος της άσκησης, αντίστοιχα. Η συγκέντρωση της c-Fos αυξήθηκε κατά 2,4 φορές στα 4 min και κατά 14 φορές στα 30 min, ενώ δεν ήταν σημαντικά διαφορετική 3 h μετά το τέλος της επιβάρυνσης, συγκριτικά με τα επίπεδα πριν την άσκηση. Τέλος, οι Murakami et al. (1998) ερεύνησαν την επίδραση άσκησης διάρκειας 90 min σε δαπεδοεργόμετρο στα επίπεδα του mRNA του c-fos στον υποκνημίδιο μυ επιμύων. Η ιδιαιτερότητα αυτής της έρευνας έγκειται στο ότι σύγκρινε την έκφραση του γονιδίου ανάμεσα σε αγύμναστα και γυμνασμένα επί 5 ημέρες πειραματόζωα. Στους αγύμναστους επίμυες τα επίπεδα του mRNA του c-fos αυξήθηκαν σημαντικά 0,5-6 h μετά την άσκηση και επέστρεψαν στα αρχικά τους επίπεδα μετά από 24 h. Αντίθετα η συγκέντρωση του mRNA του c-fos

των γυμνασμένων επιμύων παρουσίασε μη σημαντικές διακυμάνσεις μετά την άσκηση. Ωστόσο, δεν έγινε μέτρηση της c-Fos.

Γενικά, επειδή το γονίδιο c-fos φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στον έλεγχο της έκφρασης γονιδίων που κωδικοποιούν μυϊκές και άλλες πρωτεΐνες, η εξερεύνηση των αλλαγών που επιφέρει η άσκηση στην έκφραση του παραπάνω γονιδίου αποκτά αυξημένο ενδιαφέρον. Από την αναζήτηση της βιβλιογραφίας δε βρέθηκε καμία μελέτη που να έχει ερευνήσει την επίδραση άσκησης (σε άνθρωπο ή σε πειραματόζωα αρκεί να μιμείται την ανθρώπινη σωματική δραστηριότητα) στα επίπεδα της c-Fos σε μύες γυμνασμένων υποκειμένων. Η μέτρηση των πρωτεϊνών είναι απαραίτητη, επειδή δεν υπάρχει πάντοτε αντιστοιχία μεταξύ των επιπέδων mRNA και του ρυθμού πρωτεϊνοσύνθεσης (Booth & Thomason 1991) και επειδή η c-Fos, όχι το mRNA, είναι αυτή που μπορεί να επηρεάσει τη γονιδιακή έκφραση. Δεδομένου, τέλος, ότι η άσκηση σε προπονημένα υποκείμενα δεν αύξησε το mRNA του c-fos, σε αντίθεση με τα απροπύνητα (Murakami et al. 1998), παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον η διερεύνηση του αν κάτι ανάλογο ισχύει σε πρωτεϊνικό επίπεδο. Είναι αξιοσημείωτο ότι δύο ερευνητικές ομάδες έχουν προτείνει τη μελέτη της επίδρασης οξείας άσκησης σε προπονημένα υποκείμενα στην έκφραση του c-fos (Puntschart et al. 1998) και μελέτη της έκφρασης του c-fos σε επίπεδο πρωτεΐνης (Murakami et al. 1998).

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΕΥΝΑΣ

Σκοποί της παρούσας έρευνας ήταν:

- i) Η μελέτη της επίδρασης οξείας άσκησης αντοχής σε δαπεδοεργόμετρο στα επίπεδα c-Fos στο μακρό εκτείνοντα τους δακτύλους μυ των οπισθίων άκρων επιμύων.
- ii) Η μελέτη της επίδρασης πενθήμερης προπόνησης αντοχής στα επίπεδα της c-Fos.
- iii) Η μελέτη της επίδρασης οξείας άσκησης αντοχής, μετά από πενθήμερη προπόνηση, στα επίπεδα της c-Fos.

ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

Πειραματόζωα

Η έρευνα πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τις διατάξεις του Π.Δ. 160/91 «περί προστασίας των ζώων που χρησιμοποιούνται για πειραματικούς ή άλλους επιστημονικούς σκοπούς, σε συμμόρφωση με την Οδηγία 86/609/ΕΟΚ του Συμβουλίου». Χρησιμοποιήθηκαν 50 ενήλικες άρρενες επίμυες της φυλής Wistar ηλικίας 8-10 εβδομάδων και βάρους 220–250 g. Οι επίμυες διαβιούσαν ανά 5 σε κλουβιά, σε θερμοκρασία 22 °C, σε σχετική υγρασία 50–60 % και με κύκλο φωτός-σκότους 12:12 h. Υπήρχε ελεύθερη πρόσβαση σε τυπική εργαστηριακή τροφή για επίμυες και νερό βρύσης.

Δαπεδοεργόμετρο

Χρησιμοποιήθηκε ένα μηχανοκίνητο δαπεδοεργόμετρο ειδικά κατασκευασμένο για επίμυες, με πέντε διαδρόμους διαστάσεων 80 cm κατά μήκος, 12 cm κατά πλάτος και 12 cm κατά ύψος. Η ταχύτητα μπορούσε να προσαρμοσθεί από 1 έως 50 m/min με διαβάθμιση 1 m/min. Κατά τη διάρκεια της άσκησης, όταν ένας επίμυς αδυνατούσε ή αρνούταν να ακολουθήσει την κίνηση του δαπεδοεργόμετρου, παρασυρόταν σε ένα μεταλλικό πλέγμα πίσω από τον κινούμενο ιμάντα, μέσω του οποίου δέχονταν ρεύμα μικρής έντασης.

Πρωτόκολλο άσκησης

Όλες οι δοκιμασίες γίνονταν την ίδια ώρα της ημέρας (12 μ.). Οι επίμυες χωρίστηκαν σε δύο ισάριθμες ομάδες, αγύμναστων και γυμνασμένων. Από την πρώτη ομάδα, πέντε θανατώθηκαν χωρίς να ασκηθούν. Οι υπόλοιποι είκοσι έτρεξαν για 45 min στο δαπεδοεργόμετρο, με ταχύτητα 20 m/min και μηδενική κλίση. Πέντε από αυτούς θανατώθηκαν αμέσως μετά το τέλος της άσκησης, πέντε 3 h αργότερα, πέντε 6 h μετά το τέλος της άσκησης και πέντε 12 h μετά το τέλος της δοκιμασίας. Μετά την άσκηση τα πειραματόζωα είχαν ελεύθερη πρόσβαση σε τροφή και νερό. Η δεύτερη ομάδα

ασκήθηκε όπως παραπάνω μία φορά την ημέρα για 5 συνεχείς ημέρες. Την έκτη ημέρα επαναλήφθηκε ακριβώς ο χειρισμός της πρώτης ομάδας, δηλαδή 5 επίμυες θανατώθηκαν χωρίς να ασκηθούν, 5 θανατώθηκαν αμέσως μετά το τέλος της άσκησης, πέντε 3 h αργότερα, πέντε 6 h μετά το τέλος της άσκησης και πέντε 12 h μετά το τέλος της δοκιμασίας. Μετά την άσκηση τα πειραματόζωα είχαν ελεύθερη πρόσβαση σε τροφή και νερό. Τα ζώα θανατώθηκαν με έκθεση σε αιθέρα επί 3-4 min.

Αφαίρεση μυών

Αμέσως μετά τη θανάτωση κάθε ζώου, αφαιρέθηκε ο μακρός εκτείνων τους δακτύλους μυς από το δεξί οπίσθιο άκρο, τοποθετήθηκε σε ειδικό κρυσταλλικό δοχείο, ψύχθηκε σε υγρό άζωτο για 24 h και αποθηκεύτηκε στους -80°C μέχρι τη χρησιμοποίησή του.

Απομόνωση ολικής πρωτεΐνης

Η απομόνωση της ολικής πρωτεΐνης ξεκινάει με τη λύση του ιστού (στην περίπτωσή μας του μυϊκού) και την απελευθέρωσή της από το εσωτερικό των κυττάρων. Αρχικά, κάθε μυς κονιορτοποιήθηκε με γουδί και γουδοχέρι μέσα σε υγρό άζωτο και τοποθετήθηκε σε φιαλίδιο Eppendorf. Σε κάθε φιαλίδιο προστέθηκαν 750 μL ρυθμιστικού διαλύματος RIPA (Radioimmunoprecipitation Assay) που περιείχε 0,5 % δεοξυχολικό νάτριο, 1 % Nonidet P40 και 0,1 % δωδεκανοθειικό νάτριο (SDS) σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού νατρίου (10 mmol/L φωσφορικό νάτριο, 138 mmol/L χλωριούχο νάτριο, 2,7 mmol/L χλωριούχο κάλιο, pH 7,4) με σκοπό τη διάρρηξη των κυττάρων. Με τη λύση της ακεραιότητάς τους, πρωτεϊνολυτικά ένζυμα που βρίσκονταν προσεκτικά αποθηκευμένα μέσα στα άθικτα κύτταρα, απελευθερώνονται, για παράδειγμα από τα λυσοσωμάτια, και ξεκινούν την αποδόμηση των πρωτεϊνών (Walker 2000). Για να επιβραδύνουμε την πρωτεϊνόλυση, όλες οι διαδικασίες εκτελέστηκαν στους 4°C , ενώ στο ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού νατρίου προστέθηκαν οι εξής αναστολείς πρωτεϊνολύσης και φωσφατασών: 10 $\mu\text{L}/\text{mL}$ ορθοβαναδικό νάτριο (συγκέντρωσης 10 mmol/L), 30 $\mu\text{L}/\text{mL}$ απροτινίνη (συγκέντρωσης 1 mg/mL) και 10 $\mu\text{L}/\text{mL}$ φαινυλομεθυλοσουλφονυλοφθο-ρίδιο (συγκέντρωσης 10

mg/mL). Ακολούθησε ανάδευση στον κυκλομείκτη για 20 s και παραμονή στους 4 °C για 20 min. Το ομογενοποίημα περάστηκε 10 φορές μέσα από τη βελόνα σύριγγας με διαδοχικές αναρροφήσεις και εκροφήσεις, τοποθετήθηκε για άλλα 20 min στους 4 °C, περάστηκε άλλες 10 φορές μέσα από τη βελόνα και φυγοκεντρήθηκε στα 12.000 x g για 15 min στους 4 °C. Το υπερκείμενο υγρό μεταφέρθηκε σε καινούργιο φιαλίδιο Eppendorf και αποθηκεύτηκε στους -80 °C.

Προσδιορισμός πρωτεΐνης

Πριν προχωρήσουμε στο διαχωρισμό των πρωτεϊνών είναι απαραίτητο να προσδιορίσουμε τη συγκέντρωση πρωτεΐνης στα δείγματά μας. Για τη μέτρηση της πρωτεΐνης σε κάθε δείγμα χρησιμοποιήθηκε η χρωματομετρική μέθοδος του Bradford (1976). Η μέθοδος βασίζεται στην πρόσδεση της χρώσης κυανού της κουμάσης στην πρωτεΐνη του δείγματος, με αποτέλεσμα τη δημιουργία σύμπλοκου πρωτεΐνης-χρώσης που εμφανίζει μέγιστη απορρόφηση στα 595 nm (Sapan, Lundblad & Price 1999). Ο προσδιορισμός πραγματοποιήθηκε σε μικροπλακίδια που χρησιμοποιούνται για ανοσοπροσδιορισμούς. Παρασκευάστηκαν 5 πρότυπα διαλύματα βόειας αλβουμίνης του ορού με συγκεντρώσεις 0,05, 0,1, 0,25, 0,375 και 0,5 mg/mL νερού. Λόγω της υψηλής συγκέντρωσης πρωτεΐνης στα δείγματα (υψηλότερης από τη μέγιστη τιμή της καμπύλης αναφοράς), έγινε αραιώση 1:20 με ρυθμιστικό διάλυμα RIPA και τοποθετήθηκαν 10 μL σε κάθε βοθρίο μικροπλακιδίου εις διπλούν. Σε κάθε βοθρίο (είτε περιείχε πρότυπο διάλυμα είτε δείγμα) τοποθετήθηκαν 200 μL αραιωμένης 1:5 με απιοντισμένο νερό χρωστικής Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad, Hercules, USA) που είχε διηθηθεί για την αφαίρεση σωματιδίων χρωστικής που θα μπορούσαν να αυξήσουν την απορρόφηση. Οι μετρήσεις της απορρόφησης έγιναν σε φωτόμετρο Anthos 2001 (Salzburg, Austria) στα 595 nm. Οι συγκεντρώσεις που προέκυψαν πολλαπλασιάστηκαν με το συντελεστή αραιώσης για να δώσουν τη συγκέντρωση πρωτεΐνης στα αρχικά δείγματα.

Προετοιμασία δειγμάτων για ηλεκτροφόρηση

Η απαιτούμενη ποσότητα ολικής πρωτεΐνης για κάθε ανάλυση ήταν 30 μg . Κατάλληλοι όγκοι από τα δείγματα πρωτεΐνης τοποθετήθηκαν σε φιαλίδια Eppendorf και συμπληρώθηκαν, αν χρειαζόταν, μέχρι τα 10 μL με ρυθμιστικό διάλυμα RIPA. Σε άλλο φιαλίδιο τοποθετήθηκαν 10 μL από το μείγμα έγχρωμων πρότυπων μοριακών βαρών Kaleidoscope Prestained Standards (Bio-Rad). Σε όλα τα φιαλίδια προστέθηκαν 5 μL ρυθμιστικού διαλύματος δείγματος (250 mmol/L τρις·HCl, pH 6,8, 10 % SDS, 50 % γλυκερόλη, 6,25 % 2-μερκαπτοαιθανόλη και 0,06 % κυανούν της βρωμοφαινόλης). Στο ρυθμιστικό διάλυμα δείγματος το τρις·HCl είναι το ρυθμιστικό άλας, το SDS προκαλεί αποδιάταξη των πρωτεϊνών και τους προσδίδει ένα ισχυρό αρνητικό φορτίο, ενώ η 2-μερκαπτοαιθανόλη προκαλεί αποδιάταξη των πρωτεϊνών διασπώντας τους δισουλφιδικούς δεσμούς των πρωτεϊνών (Dryer & Lata 1989). Η γλυκερόλη καθιστά το δείγμα πυκνότερο και αποτρέπει την ανάμειξή του με το ρυθμιστικό διάλυμα της ηλεκτροφόρησης, ενώ η χρώση μάς επιτρέπει να ακολουθήσουμε την εξέλιξη της ηλεκτροφόρησης, επειδή ταξιδεύει ταχύτερα από οποιαδήποτε άλλη ουσία του δείγματος (Mathews, Van Holde & Ahern 2000). Στο μείγμα προτύπων τοποθετήθηκε ρυθμιστικό διάλυμα δείγματος χωρίς κυανούν της βρωμοφαινόλης για να ξεχωρίζουν καλύτερα τα χρώματα κάθε ζώνης. Στη συνέχεια, τα διαλύματα θερμάνθηκαν στους 95 $^{\circ}\text{C}$ για 5 min.

Ηλεκτροφόρηση

Η ηλεκτροφόρηση παρουσία SDS είναι μια από τις πιο διαδεδομένες τεχνικές διαχωρισμού πρωτεϊνών στη βιοχημεία. Στηρίζεται στο ομοιόμορφο αρνητικό φορτίο που αποκτούν οι πρωτεΐνες όταν σχηματίζουν σύμπλοκο με το SDS, το οποίο καλύπτει τις διαφορές φορτίου μεταξύ των πρωτεϊνών. Συνεπώς, εφαρμόζοντας ηλεκτρικό πεδίο, κάθε πρωτεΐνη του δείγματος μετακινείται προς το θετικό πόλο με ταχύτητα σχετιζόμενη αρνητικά με τη μοριακή της μάζα μέσα σε μία γέλη πολυακρυλαμιδίου (Ream & Field 1999).

Χρησιμοποιήθηκαν προκατασκευασμένες γέλες Page-One (με διαβάθμιση περιεκτικό-

τητας πολυακρυλαμιδίου 10-20 % (Owl Separation Systems, Portsmouth, USA). Σε γέλες με το συγκεκριμένο εύρος περιεκτικότητας μπορούν να διαχωριστούν πρωτεΐνες μοριακής μάζας από 15 μέχρι 100 kDa. Τα 15 μ L δείγματος, όπως παρασκευάστηκαν παραπάνω, φορτώθηκαν ανά 10 (ένα δείγμα από κάθε πεντάδα ζώων που είχαν υποστεί τον ίδιο χειρισμό) στα βοθρία μιας γέλης, ενώ ως έλεγχος σε κάθε γέλη φορτώθηκε ένα κοινό δείγμα και το μείγμα πρότυπων μοριακών βαρών στις ίδιες ποσότητες. Οι δύο δεξαμενές της συσκευής της ηλεκτροφόρησης πληρώθηκαν με ρυθμιστικό διάλυμα τρεξίματος (τρεις·HCl 20 mmol/L, γλυκίνη 320 mmol/L και SDS 70 mmol/L). Η ηλεκτροφόρηση εκτελέστηκε σε συσκευή P8DS (Owl Separation Systems) με σταθερή τάση 100 V (ένταση 25-30 mA) και τερματίστηκε όταν το κυανούν της βρωμοφαινόλης έφτασε σε απόσταση 1 cm από την κάτω άκρη της γέλης.

Στην προσπάθεια να παρουσιαστεί μια όσο το δυνατόν αντιπροσωπευτικότερη εικόνα (δηλαδή αποτέλεσμα), τρέξαμε μια γέλη, στην κάθε θέση δείγματος της οποίας είχαν τοποθετηθεί 30 μ g μείγματος πρωτεΐνης από κάθε πεντάδα ζώων που είχαν υποστεί τον ίδιο χειρισμό. Τα μείγματα παρασκευάστηκαν αναμειγνύοντας 6 mg πρωτεΐνης από κάθε ζώο. Με τον τρόπο αυτό εξασφαλίστηκαν όμοιες συνθήκες τρεξίματος, στύπωσης, επώασης με τα αντισώματα και εμφάνισης για κάθε πεντάδα.

Ανοσοσύπωση και εμφάνιση

Με το τέλος της ηλεκτροφόρησης, οι πρωτεΐνες βρίσκονται διαχωρισμένες μέσα στη γέλη πολυακρυλαμιδίου. Η γέλη έχει συνήθως πάχος μόλις 1 mm και είναι ιδιαίτερα εύθραυστη, ενώ οι πρωτεΐνες σύντομα αρχίζουν να διαχέονται μέσα στη γέλη. Γι' αυτό οι διαχωρισμένες πρωτεΐνες μεταφέρονται σε μια μεμβράνη από ένα ανθεκτικότερο υλικό. Για τη μεταφορά των πρωτεϊνών από τη γέλη στη μεμβράνη εκμεταλλευόμαστε πάλι το αρνητικό φορτίο τους. Ρεύμα περνάει εγκάρσια στη γέλη και προκαλεί τη μετακίνηση των πρωτεϊνών στη μεμβράνη. Έπειτα, η μεμβράνη εμβαπτίζεται σε διάλυμα βόειας αλβουμίνης του ορού, η οποία συνδέεται με όλες τις ελεύθερες υδρόφοβες δεσμεύουσες περιοχές. Στη συνέχεια η μεμβράνη εμβαπτίζεται σε διάλυμα

που περιέχει αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης που μας ενδιαφέρει. Για να μπορέσουμε να δούμε την αλληλεπίδραση αντισώματος-αντιγόνου, το στύπωμα (η μεμβράνη δηλαδή μαζί με τις μεταφερμένες πρωτεΐνες) επωάζεται σε διάλυμα που περιέχει ένα δεύτερο αντίσωμα έναντι του πρώτου αντισώματος, συζευγμένο συνήθως με μια υπεροξειδάση. Το ένζυμο οξειδώνει τη λουμινόλη (υπόστρωμα που προστίθεται) και παράγει φως, η εκπομπή του οποίου μπορεί να ανιχνευθεί με την έκθεση του στυπώματος σε ένα φωτογραφικό φιλμ (Wilson & Walker 2000).

Σύμφωνα με την παραπάνω θεωρητική προσέγγιση, μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης, κάθε γέλη εμβαπτίστηκε για 30 min σε ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς (20 % μεθανόλη, 25 mmol/L τρις-HCl, 190 mmol/L γλυκίνη, pH 7,1). Χρησιμοποιήθηκε η μεμβράνη διφθοριδίου του πυλυβινυλιδενίου Immobilon-P (Millipore, Austin, USA), η οποία εμβαπτίστηκε για 2 s σε μεθανόλη, για 2 min σε νερό και για 10 min σε ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς. Στυπόχαρτα 3MM Papers (Sigma, St Louis, USA) και ειδικά σφουγγαράκια εμβαπτίστηκαν στιγμιαία μόνο στο ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς. Για τη μεταφορά των πρωτεϊνών από τη γέλη στη μεμβράνη χρησιμοποιήθηκε η συσκευή στύπωσης Mini Trans-Blot Cell (Bio-Rad). Η τάση καθορίστηκε στα 100 V (ένταση 250-350 mA), ενώ η μεταφορά διάρκεσε 60 min.

Μετά το τέλος της στύπωσης, η μεμβράνη εμβαπτίστηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού νατρίου (80 mmol/L μονόξινο φωσφορικό νάτριο, 20 mmol/L δισόξινοφωσφορικό νάτριο και 100 mmol/L χλωριούχο νάτριο, pH 7,5) που περιείχε 0,1 % Tween-20 και 5 % βόεια αλβουμίνη για τουλάχιστον 60 min. Η μεμβράνη επώαστηκε με το c-fos (Ab-2) για 60 min, ένα πολυκλωνικό αντίσωμα κουνελιού έναντι της c-Fos (Oncogene Research Products, Cambridge, England), που αναγνωρίζει την αλληλουχία αμινοξέων 4-17, σε αραιώση 1:2500 για 60 min. Ακολούθησε επώαση με πολυκλωνικό αντίσωμα γαϊδάρου έναντι του αντισώματος κουνελιού σε αραιώση 1:5000, επισημασμένο με υπεροξειδάση του ραπανακίου (Amersham, Buckinghamshire, England).

Το στύπωμα εμφανίστηκε με τη μέθοδο της χημειοφωταύγειας και με τη χρήση του συνόλου ανιχνευτικών διαλυμάτων Super Signal (West Pico (Pierce, Illinois, USA). Οι μεμβράνες εκτέθηκαν στο φιλμ Hyperfilm(ECL((Amersham) για 1-20 min ανάλογα με την ένταση του σήματος. Η ποσοτική ανάλυση των ζωνών (η ένταση των οποίων αντιστοιχεί στην ποσότητα της πρωτεΐνης) που εμφανίστηκαν πάνω στο φιλμ έγινε φωτογραφίζοντας το φιλμ με κάμερα DC 120 (Kodak, New York, USA) σε εμφανιστήριο πάγκου. Η ανάλυση των φωτογραφιών έγινε με το πρόγραμμα Gel Analyzer (Biosure, Αθήνα, Ελλάδα). Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν συγκριτικά με την τιμή που παρουσίασε το κοινό δείγμα που χρησιμοποιήθηκε ως έλεγχος σε όλες τις γέλες (Cusi et al. 2000· Wojtaszewski, Lynge, Jakobsen, Goodyear & Richter 1999).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Τα αποτελέσματα των 5 γελών, όπου αναλύθηκαν τα επιμέρους δείγματα, ήταν αρκετά διαφορετικά μεταξύ τους. Αυτό οφείλεται κυρίως στις μεγάλες διαφορές στην ένταση της ζώνης της c-Fos στο δείγμα ελέγχου στις επιμέρους γέλες, που είχε ως αποτέλεσμα την αλλοίωση των τιμών όλων των δειγμάτων των συγκεκριμένων γελών. Ωστόσο, αξίζει να σημειωθεί ότι η τάση που παρουσιάστηκε σε κάθε γέλη συμφωνεί, σε γενικές γραμμές, με την τάση που παρουσιάστηκε στη γέλη με τα μείγματα. Έτσι, προτιμήθηκε να παρουσιαστούν και να αναλυθούν τα αποτελέσματα από την τελευταία (σχήματα 3 και 4). Επιπλέον, τα αποτελέσματα της γέλης με τα μείγματα επιβεβαιώθηκαν από την παρόμοια εικόνα που παρουσίασε το «τρέξιμο» μιας δεύτερης γέλης με τα ίδια δείγματα.

Η συγκέντρωση της c-Fos στο μακρό εκτείνοντα τους δακτύλους μυ των απροπόνητων επιμύων ακολούθησε μια διφασική πορεία μετά την άσκηση, εμφανίζοντας μείωση στα 15 min, στις 3 h και στις 6 h και αύξηση στις 12 h. Παρόμοια εικόνα παρουσίασε η ομάδα των προπονημένων επιμύων, εκδηλώνοντας μείωση στα 15 min και στις 3 h και αύξηση στις 6 και 12 h μετά την άσκηση. Αξίζει να σημειωθεί ότι τα επίπεδα ηρεμίας των πειραματόζωνων μετά την πενθήμερη άσκηση ήταν κατά 55 % υψηλότερα από τα

αντίστοιχα επίπεδα των απροπόνητων επιμύων. Επιπλέον, τα επίπεδα της πρωτεΐνης στους προπονημένους επίμυες ήταν υψηλότερα από τα αντίστοιχα επίπεδα των απροπόνητων σε όλα τα χρονικά σημεία μετά την άσκηση. Είναι, τέλος, ενδιαφέρον ότι και οι δύο ομάδες παρουσίασαν τα υψηλότερα επίπεδα c-Fos (25-51 % υψηλότερα από τα επίπεδα πριν την άσκηση) 12 h μετά την άσκηση.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η διερεύνηση της επίδρασης οξείας άσκησης αντοχής στα επίπεδα της c-Fos σε προπονημένους και απροπόνητους επίμυες. Απ' όσο γνωρίζουμε, αυτή είναι η πρώτη προσπάθεια μελέτης της ανταπόκρισης της c-Fos στην άσκηση σε προπονημένα υποκείμενα. Επιπλέον, αποτελεί τη μοναδική γνωστή έρευνα που παρακολούθησε την έκφραση του συγκεκριμένου γονιδίου σε πρωτεϊνικό επίπεδο σε τέσσερα χρονικά σημεία κατά τη διάρκεια της αποκατάστασης από άσκηση. Πρόσφατες παρατηρήσεις, μάλιστα, υποδεικνύουν ότι απαιτείται παραπάνω από ένα χρονικό σημείο προσδιορισμού της συγκέντρωσης ενός συγκεκριμένου mRNA για να επιβεβαιωθεί η μεταβολή της μετά από οξεία άσκηση (Booth, Tseng, Flück & Carson 1998). Είναι, λοιπόν, πιθανό κάτι ανάλογο να ισχύει και για τα επίπεδα μιας πρωτεΐνης.

Οι αρσενικοί επίμυες της φυλής Wistar έχουν μέγιστη πρόσληψη οξυγόνου (VO_{2max}) περίπου $65 \text{ ml} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, ενώ στην ταχύτητα των 20 m/min και στη μηδενική κλίση που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη ασκούσαν σε ένταση που αντιστοιχούσε στο 55-60 % της VO_{2max} τους (Bedford, Tipton, Wilson, Orpliger & Gisolfi 1979).

Το πρωτόκολλο άσκησης που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη είναι τροποποίηση εκείνου που πρωτότυπα παρουσιάστηκε από τους Eliakim, Moromisato, Moromisato & Cooper (1997a) και είναι ικανό να προκαλέσει πλήθος προσαρμογών. Οι ίδιοι συγγραφείς ανέφεραν αυξημένο μέγιστο χρόνο άσκησης κατά 54 % και βαρύτερους μύες των οπισθίων άκρων κατά 16 % για τους προπονημένους συγκριτικά με τους απροπόνητους επίμυες. Οι Goodyear, Giorgino, Balon, Condorrelli & Smith

(1995), χρησιμοποιώντας ένα παρόμοιο πρωτόκολλο, σε ό,τι αφορά την ένταση (20 m/min, θετική κλίση 10 %), ανέφεραν μείωση του γλυκογόνου του υποκνημιδίου μυός επίμοος αμέσως μετά από 30 min άσκησης, υποδηλώνοντας την ικανότητα της συγκεκριμένης επιβάρυνσης να επιφέρει μεταβολικές προσαρμογές. Παρόμοιο πρωτόκολλο άσκησης έχει χρησιμοποιηθεί από αρκετούς ερευνητές (Chibalin et al. 2000· Eliakim et al. 1997b· Murakami et al. 1998).

Παρ' ότι πολλές μελέτες έχουν ερευνήσει την επίδραση της τροποποιημένης συσταλτικής δραστηριότητας στην έκφραση του c-fos, ορισμένοι ερευνητές έχουν υποθέσει ότι η αυξημένη έκφραση του γονιδίου (και γενικότερα των IEG) μπορεί να αποτελεί απλά μια ανταπόκριση στο στρες και όχι κάποιο σήμα που συνδέει την τροποποιημένη συσταλτική δραστηριότητα με κάποιες φαινοτυπικές προσαρμογές (Schneider, Sultan & Pette 1999). Στην παρούσα μελέτη, ωστόσο, τα επίπεδα ηρεμίας (24 h μετά από άσκηση) της c-Fos ύστερα από πενθήμερη προπόνηση βρέθηκαν αυξημένα στο σκελετικό μυ επιμύων, εμπλέκοντας την πρωτεΐνη στα πρώιμα στάδια προσαρμογών που συμβαίνουν μετά από άσκηση αντοχής.

Τα επίπεδα της c-Fos ακολούθησαν και στις δύο ομάδες μια παρόμοια διφασική πορεία μετά την άσκηση, εμφανίζοντας αρχικά πτώση και στη συνέχεια αύξηση 6-12 h (ανάλογα με την ομάδα) μετά την άσκηση και φτάνοντας σε επίπεδα υψηλότερα από τα αντίστοιχα ηρεμίας κάθε ομάδας. Η αρχική πτώση και η ακόλουθη αύξηση της c-Fos είναι δύσκολο να ερμηνευτεί, αφού δεδομένα σχετικά με την κινητική πρωτεϊνών κατά τη διάρκεια της αποκατάστασης είναι λιγοστά στη βιβλιογραφία. Η πλειονότητα των μελετών έχει προσδιορίσει τις συγκεντρώσεις διάφορων πρωτεϊνών αμέσως μετά την εκάστοτε επιβάρυνση (ενδεικτικά, Chibalin et al. 2000· Freyssenet, Connor, Takahashi & Hood 1999· Goodyear, Chang, Sherwood, Dufresne & Moller 1996· Michel et al. 1994). Σε ό,τι αφορά την επίδραση αποκλειστικά άσκησης στη c-Fos, καταφέραμε να εντοπίσουμε μία μόνο μελέτη (Puntschart et al. 1998), στην οποία η τελευταία μυϊκή βιοψία από τον έξω πλατύ μυ ανθρώπων πάρθηκε μόλις 3 h μετά από άσκηση σε

δαπεδοεργόμετρο. Στη μελέτη αυτή αναφέρθηκε αύξηση της c-Fos κατά 2,4 φορές στο 4ο min, κατά 14 φορές στο 30ό min και κατά 3,5 φορές στις 3 h μετά την άσκηση. Δηλαδή, δε βρέθηκε μείωση της c-Fos μετά την επιβάρυνση, όπως βρέθηκε στην παρούσα μελέτη. Παρ' όλα αυτά, στη βιβλιογραφία έχουν αναφερθεί περιπτώσεις, όπου μετά από τροποποίηση της συσταλτικής δραστηριότητας βρέθηκαν αρχικά μειώσεις ή μη σημαντικές αλλαγές πρωτεϊνών και αύξηση σε κάποια ύστερη χρονική στιγμή κατά τη διάρκεια της αποκατάστασης (Chen, Serfass & Apple, 2000· Neuffer & Dohm 1993· Puntschart, Vogt, Widmer, Hoppeler & Billeter 1996· Tumminia et al. 1998).

Ειδικότερα, οι Tumminia et al. (1998), φορτίζοντας με μηχανικό τρόπο οφθαλμικά μυϊκά κύτταρα, ανέφεραν μείωση στα επίπεδα της c-Fos μέχρι και 60 % μέσα σε 2 min μετά την επιβάρυνση και επιστροφή στα επίπεδα ηρεμίας ή ακόμα και πάνω από αυτά στο 15ο και 30ό min μετά την επιβάρυνση. Οι Chen et al. (2000) μέτρησαν τη συγκέντρωση δύο ισοενζύμων, της κυτταροπλασματικής κρεατινικής κινάσης και της μιτοχονδριακής κρεατινικής κινάσης και βρήκαν μείωση της τάξης του 6-11 % αμέσως μετά από άσκηση, και επιστροφή στα επίπεδα ηρεμίας μετά από 3 και 48 h. Οι Neuffer & Dohm (1993) ανέφεραν αμέσως μετά την άσκηση μικρή μείωση του μεταφορέα γλυκόζης 4 σε σκελετικό μυ των οπισθίων άκρων επίμυος, ενώ κατά τη διάρκεια της αποκατάστασης παρουσιάστηκε αύξηση της τάξης του 20 %. Τέλος, οι Puntschart et al. (1996) βρήκαν σταθερά επίπεδα της πρωτεΐνης θερμικού σοκ με μοριακή μάζα 70 kDa στον έξω πλατύ μυ ανθρώπων αμέσως μετά από τρέξιμο σε δαπεδοεργόμετρο, ενώ κατά τη διάρκεια της αποκατάστασης αυτά αυξήθηκαν κατά 80 %.

Ενισχύοντας τα παραπάνω δεδομένα, ο Thomason (1998) ανέφερε ότι οξεία άσκηση αντοχής σε απροπόνητους επίμυες προκάλεσε μείωση της πρωτεϊνοσύνθεσης κατά 35-80 % στη διάρκεια και αμέσως μετά από άσκηση. Ωστόσο, η μείωση αυτή συνήθως διαρκεί λίγο και η πρωτεϊνοσύνθεση επιστρέφει ή ξεπερνά τα επίπεδα ηρεμίας (Thomason 1998).

Σε ότι αφορά την αύξηση της c-Fos στα προπονημένα ζώα, τα ευρήματα της παρούσας

μελέτης βρίσκονται σε συμφωνία με αποτελέσματα που παρουσίασαν οι Michel et al. (1994). Η ερευνητική αυτή ομάδα μελέτησε την επίδραση αδιάκοπου ηλεκτρικού ερεθισμού χαμηλής συχνότητας στον πρόσθιο κνημιαίο μυ κουνελιών και ανέφερε αύξηση της c-Fos μέσα στις πρώτες 24 h, έπειτα πτώση, και από την 3η ως την 21η ημέρα διαρκή αύξηση συγκριτικά με τα επίπεδα της ομάδας ελέγχου. Αύξηση σε επίπεδο mRNA δεν υπήρξε παρά μόνο μετά από 4 και 8 h ηλεκτρικής διέγερσης, υποδηλώνοντας ότι η αύξηση της c-Fos μετά τις πρώτες ώρες συμβαίνει μέσω μεταφραστικών ή/και μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων. Σε συμφωνία με την παραπάνω μελέτη, οι Murakami et al. (1998) ανέφεραν ότι πενθήμερη προπόνηση σε δαπεδοεργόμετρο δε μετάβαλε τα επίπεδα mRNA του c-fos στον υποκνημίδιο μυ επιμύων.

Η μελέτη των Osbaldeston et al. (1995) παρουσίασε παρόμοια αποτελέσματα με αυτά των Michel et al. (1994), αν και μελέτησε την επίδραση διάτασης, ηλεκτρικού ερεθισμού ή συνδυασμού τους μόνο τις πρώτες 24 h. Αναλυτικά, σε ό,τι αφορά τις επιδράσεις του ηλεκτρικού ερεθισμού, αναφέρθηκαν σημαντικές αυξήσεις στο mRNA του c-fos μετά από 3, 4,5 και 6 h ερεθισμού και επιστροφή στα επίπεδα ηρεμίας μετά από 8, 12 και 24 h. Αντίθετα, σε επίπεδο πρωτεΐνης οι αυξήσεις ήταν έκδηλες μόνο μετά από 8 h ερεθισμού.

Οι Murakami et al. (1998) χρησιμοποιώντας παρόμοιο πειραματικό σχεδιασμό με της παρούσας μελέτης ανέφεραν αύξηση του mRNA του c-fos μετά από άσκηση στους απροπόνητους επίμους και όχι στους προπονημένους για 5 ημέρες. Για να συμβιβαστεί αυτό το εύρημα με τα δικά μας αποτελέσματα αλλά και εκείνα των Michel et al. (1994), πρέπει να υποθέσουμε ότι μετά τις πρώτες 24 h η αύξηση της c-Fos επέρχεται λόγω μεγαλύτερης αποδοτικότητας της μετάφρασης ή/και των μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων.

Συγκριτικά με τη μελέτη των Puntschart et al. (1998), η αύξηση της c-Fos στην παρούσα

μελέτη μπορεί να χαρακτηριστεί μικρή, αφού οι παραπάνω ερευνητές ανέφεραν δεκατετραπλασιασμό της c-Fos στον έξω πλατύ μυ ανθρώπων 30 min μετά το τέλος της άσκησης. Η μικρότερη αύξηση της c-Fos στη μελέτη μας μπορεί να οφείλεται στο διαφορετικό είδος που χρησιμοποιήθηκε (άνθρωπος έναντι επίμυος) και στο διαφορετικό μυ (πλατύς πλευρικός έναντι μακρού εκτείνοντα τους δακτύλους).

Σε ό,τι αφορά τον τελευταίο παράγοντα, πολλοί ερευνητές έχουν ασχοληθεί με την επίδραση της άσκησης στην έκφραση γονιδίων σε μύες και έχουν αναφέρει διαφορετικές ανταποκρίσεις ανάλογα με τον εξεταζόμενο μυ (ενδεικτικά, Chen et al. 2000· Gonzalez, Hernando & Manso 2000· Hollander et al. 1999· Mattson, Ross, Kilgore & Musch 2000· Samelman 2000). Δύο από τις κύριες αιτίες γι' αυτές τις διαφορές είναι η διαφορετική συμμετοχή τους κατά τη διάρκεια του τρεξίματος (Bigard, Mateo, Sanchez, Serrurier & Ventura-Clapier 2000) και η διαφορετική σύσταση σε τύπους μυϊκών ινών (Booth & Tseng 1993· Wretman, Widegren, Lionikas, Westerblad & Henriksson 2000).

Σχετικά με τη συμμετοχή του στην κίνηση, ο μακρός εκτείνων τους δακτύλους μυς (που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη), επειδή εκτελεί τη ραχιαία κάμψη της ποδοκνημικής άρθρωσης και επειδή συμμετέχει στη μετακίνηση των κάτω άκρων μόνο κατά τη διάρκεια της αιώρησης, ενεργοποιείται λίγο κατά τη διάρκεια του τρεξίματος στο δαπεδοεργομέτρο (Bigard et al. 2000).

Σε ό,τι αφορά τη σύσταση σε μυϊκές ίνες του μακρού εκτείνοντα τους δακτύλους αρσενικών ενήλικων επιμύων της φυλής Wistar, οι Jaschinski, Schuler, Peuker & Pette (1998), χρησιμοποιώντας ανάλυση ηλεκτροφόρησης των βαριών αλυσίδων της μυοσίνης, ανέφεραν ότι αποτελείται κατά 4,8 % από μυϊκές ίνες τύπου I, κατά 12,5 % από IIa, κατά 31,6 % από IIc και κατά 51,1 % από IIb (είναι δηλαδή ένας γρήγορος μυς). Επιπλέον, είναι γνωστό ότι κατά τη διάρκεια μιας άσκησης μέτριας έντασης (όπως αυτή που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη) ενεργοποιούνται κυρίως οι μυϊκές ίνες

βραδείας συστολής, ενώ οι μυϊκές ίνες ταχείας συστολής αυξάνουν τη συμμετοχή τους όσο αυξάνεται η ένταση της επιβάρυνσης (Samelman, Shiry & Cameron 2000). Συνολικά, λοιπόν, φαίνεται πιθανό ο συγκεκριμένος μυς, λόγω της μικρής συμμετοχής του στην κίνηση κατά τη διάρκεια του τρεξίματος, να παρουσίασε τιμές χαμηλότερες από αυτές που θα μπορούσε να επιτύχει ένας άλλος μυς (π.χ. ο υποκνημίδιος).

Παρ' όλα αυτά, πρέπει να τονιστεί ότι οι συγκρίσεις μεταξύ των μελετών που έχουν χρησιμοποιήσει άσκηση δεν είναι εύκολες, γιατί οι διαφορές μεταξύ τους δεν περιορίζονται συνήθως στο μυ που αναλύθηκε. Οι περισσότερες διαφέρουν σε έναν ή περισσότερους από τους παρακάτω παράγοντες: είδος, φυλή, φύλο, ηλικία και βάρος του πειραματόζωου, είδος τρεξίματος (σε θετική, αρνητική ή μηδενική κλίση), ένταση και διάρκεια της επιβάρυνσης.

Επιπλέον, σημαντικός παράγοντας διαφοροποίησης μεταξύ των μελετών είναι, όπως φάνηκε και από την παρούσα μελέτη, ο αριθμός των δειγμάτων που λαμβάνονται μετά την άσκηση. Η κινητική της c-Fos κατέδειξε πόσο ριψοκίνδυνο είναι να εξάγουμε συμπεράσματα βασιζόμενοι σε ένα μόνο δείγμα. Για παράδειγμα, αν συλλεγόταν ένα μόνο δείγμα αμέσως μετά την άσκηση, θα συμπεραίναμε ότι το συγκεκριμένο πρωτόκολλο άσκησης μειώνει τη c-Fos, συμπέρασμα που ανατράπηκε στις 6 h (στους προπονημένους) και 12 h (και στις δύο ομάδες) μετά την επιβάρυνση. Συνεπώς, η συγκεκριμένη εξέλιξη της πρωτεΐνης καθιστά ακόμα πιο δύσκολες τις συγκρίσεις, αφού οι περισσότεροι ερευνητές έχουν συλλέξει ένα μόνο δείγμα (σχεδόν πάντα αμέσως μετά την επιβάρυνση).

Ποια μόρια, σε προηγούμενα του c-fos επίπεδα στο σηματοδοτικό καταρράχτη, προκάλεσαν την αύξηση του; Οι ενεργοποιούμενες από μιτογόνα πρωτεϊνικές κινάσες (MAPK) έχουν υποδειχθεί πρόσφατα από πληθώρα μελετών ως πιθανοί κυτταρικοί σηματοδοτικοί κρίκοι που συνδέουν την άσκηση ή την τροποποιημένη συσταλτική δραστηριότητα με αλλαγές στη γονιδιακή έκφραση και βιοχημικές προσαρμογές στο

συστελλόμενο σκελετικό μυ (Aronson et al. 1997b· Cusi et al. 2000· Goodyear et al. 1996· Hayashi et al. 1999b· Krook et al. 2000· Osman et al. 2000· Ryder et al. 2000· Widegren et al. 1998· Wojtaszewski et al. 1999· Wretman et al. 2000). Μέχρι σήμερα έχουν ανακαλυφθεί σε κύτταρα θηλαστικών 10 μέλη της οικογένειας MAPK (Widegren, Wretman, Lionikas, Hedin & Henriksson 2000). Δύο από αυτά, οι ρυθμιζόμενες από εξωκυτταρικά σήματα κινάσες 1 και 2 (ERK1 και ERK2), μπορούν να μετακινηθούν στον πυρήνα και να ενεργοποιήσουν πολλά γονίδια, μεταξύ των οποίων και το c-fos (Widegren et al. 2000). Έτσι, η διερεύνηση της επίδρασης αυξημένης συσταλτικής δραστηριότητας στην έκφραση αυτών των ενζύμων αποκτά ιδιαίτερο ενδιαφέρον, δεδομένου ότι διαφοροποιημένη έκφρασή τους έχει ως αποτέλεσμα, τις περισσότερες φορές, μεταβολή της συγκέντρωσης της c-Fos.

Οι μελέτες που ασχολήθηκαν με την επίδραση της τροποποιημένης συσταλτικής δραστηριότητας (προκαλώντας συστολή σε μυϊκά παρασκευάσματα *in vitro*) στα επίπεδα των ERK1 και ERK2 (Hayashi et al. 1999b· Ryder et al. 2000· Wojtaszewski et al. 1999· Wretman et al. 2000), ανέφεραν αύξηση της φωσφορυλίωσης (η οποία προκαλεί ενεργοποίηση) και των δύο ενζύμων κατά 1,5-3 φορές συγκριτικά με τα επίπεδα ηρεμίας. Οι Sakamoto, Hirshman, Iguchi & Goodyear (2000), διεγείροντας με ρεύμα υψηλής συχνότητας το περονιαίο νεύρο, ανέφεραν αύξηση της συγκέντρωσης των φωσφορυλιωμένων πρωτεϊνών ERK1 και ERK2 κατά 3-5 φορές συγκριτικά με τα επίπεδα ηρεμίας στο μακρό εκτείνονται τους δακτύλους και στον πρόσθιο κνημιαίο μυ επιμύων. Σύμφωνα με τους ίδιους συγγραφείς, η αύξηση συνέβη στα μυϊκά αλλά και στα μη μυϊκά κύτταρα του μυϊκού ιστού. Επιπλέον, οι συγκεκριμένες κινάσες ανιχνεύθηκαν στο κυτταρόπλασμα και στον πυρήνα των μυϊκών ινών, γεγονός που τις εμπλέκει στις προσαρμογές που συμβαίνουν στο σκελετικό μυ ως ανταπόκριση στην αυξημένη συσταλτική δραστηριότητα.

Μελέτες που χρησιμοποίησαν άσκηση ως ερέθισμα σε επίμυες (Goodyear et al. 1996) και ανθρώπους (Aronson et al. 1997b· Osman et al. 2000· Widegren et al. 2000·

Widegren et al. 1998) ανέφεραν αυξήσεις των ERK1 και ERK2 από 2 (στους επίμυες) μέχρι περίπου 40 φορές (στους ανθρώπους) συγκριτικά με τα επίπεδα πριν την άσκηση. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχει η μελέτη των Yu et al. (2001), οι οποίοι συγκρίνοντας τα επίπεδα των ERK1 και ERK2 μεταξύ απροπόνητων ατόμων και αθλητών αντοχής, ανέφεραν περίπου 2 φορές υψηλότερα επίπεδα στους τελευταίους. Ωστόσο, οι Osman et al. (2000) δε βρήκαν αύξηση των φωσφορυλιωμένων ERK1 και ERK2 μετά από 30 min άσκησης, αλλά βρήκαν όταν η άσκηση διάρκεσε 60 min, αναδεικνύοντας τη σημασία της διάρκειας της επιβάρυνσης στην αλλαγή της συγκέντρωσης αυτών των ενζύμων και πιθανά της c-Fos. Επιπλέον, οι Widegren et al. (2000), μελετώντας την επίδραση άσκησης στο 40 και 75 % της VO₂max για 30 min, ανέφεραν αύξηση της συγκέντρωσης των φωσφορυλιωμένων ERK1 και ERK2 στον έξω πλατύ μυ ανθρώπου περίπου κατά 12 και 40 φορές, αντίστοιχα, επιβεβαιώνοντας την υπόθεση ότι η φωσφορυλίωση αυτών των σηματοδοτικών ενζύμων ως ανταπόκριση στην άσκηση αυξάνεται ανάλογα με την ένταση της φόρτισης. Από τις παραπάνω μελέτες φαίνεται ότι η αυξημένη νευρομυϊκή δραστηριότητα προκαλεί αύξηση των ενεργοποιημένων μορφών των ERK1 και ERK2, γεγονός που τις εμπλέκει στη ρύθμιση της έκφρασης του c-fos.

Άλλο ένα σηματοδοτικό μόριο, το οποίο αποδεδειγμένα επηρεάζει την έκφραση του c-fos, είναι ο μεταγραφικός παράγοντας Elk-1 (Lewis, Shapiro & Ahn 1998). Αν και δεν έχει μελετηθεί η ανταπόκρισή του σε άσκηση, πρόσφατα οι Babu, Lalli, Sussman, Sadoshima & Periasamy (2000) προκάλεσαν υπερτροφία σε καρδιακά κύτταρα χορηγώντας φαινυλεφρίνη (έναν πολύ εκλεκτικό αγωνιστή των α1-αδρενεργικών υποδοχέων) και ανέφεραν αύξηση της φωσφορυλιωμένης Elk-1 στον πυρήνα, ενώ αντίθετα δεν παρουσιάστηκε αύξηση όταν χορηγήθηκαν αναστολείς των ERK1 και ERK2, ενοχοποιώντας τις MAPK για την αύξηση της συγκέντρωσης του παραπάνω μεταγραφικού παράγοντα.

Στον επαγωγέα του c-fos υπάρχει, όπως αναφέρθηκε (σ. 4), η αλληλουχία βάσεων SRE

που καταλαμβάνεται από την πρωτεΐνη SRF (Thomson et al. 1999). Σειρά μελετών από το εργαστήριο του F.W. Booth έχουν δείξει ότι η συγκέντρωση του mRNA και της πρωτεΐνης του SRF αυξάνεται μετά από υπερφόρτωση σκελετικού μυός επίμυος (Gordon, Flück & Booth 2001), κότας (Carson & Booth 1999) και κόκορα (Flück, Carson, Schwartz & Booth 1999). Πιθανά, λοιπόν, μέρος της αύξησης της c-Fos να προκλήθηκε από την αύξηση του παραπάνω μεταγραφικού παράγοντα.

Αντίθετα, η πρωτεΐνη CREB (σ. 4), δε βρέθηκε διαφοροποιημένη μετά από άσκηση ανθρώπων σε δύο μελέτες (Widegren et al. 2000· Widegren et al. 1998). Ωστόσο, στη δεύτερη μελέτη (Widegren et al. 1998) αναφέρθηκε αύξηση της πρωτεΐνης μόνο στο άκρο που δε συμμετείχε στην ποδηλάτηση στους 4 από τους 5 συμμετέχοντες, αφήνοντας ανοιχτό το ενδεχόμενο η έκφραση της CREB να επηρεάζεται από κάποιους μη τοπικούς παράγοντες (π.χ. κάποια ορμόνη).

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης δείχνουν ότι ένα φυσιολογικό ερέθισμα (τρέξιμο σε δαπεδοεργόμετρο) επάγει την έκφραση του c-fos σε πρωτεϊνικό επίπεδο στο μακρό εκτείνοντα τους δακτύλους μυ επίμυος. Ωστόσο, εκτός από την κινητική δραστηριότητα, και το στρες μπορεί να προκάλεσε αυτή την ανταπόκριση.

Αν και είναι δύσκολο να ξεχωρίσει κανείς το βαθμό επίδρασης των δύο παραπάνω παραγόντων, οι Liste, Guerra, Caruncho & Labandeira-Garcia (1997) ανέφεραν ότι επίμυες που είχαν προπονηθεί επί 6 ημέρες (20 min/ημέρα) με σκοπό να μειωθεί το στρες πριν από μια οξεία άσκηση αντοχής στο δαπεδοεργόμετρο, δεν έδειξαν σημαντική μείωση της επαγωγής του c-fos σε πρωτεϊνικό επίπεδο σε κύτταρα του ραβδωτού σώματος του εγκεφάλου συγκριτικά με τους απροπόνητους επίμυες. Επιπλέον, οι ίδιοι ερευνητές ανέφεραν ότι επίμυες που υποβλήθηκαν σε δοκιμασία φόβου και θανατώθηκαν αμέσως μετά παρουσίασαν μικρή αύξηση της c-Fos. Συνεπώς, τα παραπάνω αποτελέσματα συνηγορούν με την άποψη ότι μάλλον η κινητική δραστηριότητα και λιγότερο το στρες είναι η αιτία της αύξησης της c-Fos.

Ποια είναι η φυσιολογική σημασία της αύξησης της c-Fos; Απάντηση στο παραπάνω ερώτημα δεν είναι εύκολο να δοθεί. Οι προσπάθειες που έχουν γίνει μέχρι σήμερα με σκοπό να προσδιορίσουν την επίδραση της c-Fos στην έκφραση άλλων γονιδίων βασίζονται σε περιγραφικές παρατηρήσεις. Ακόμα πιο θολή εικόνα υπάρχει σε ό,τι αφορά το ρόλο της πρωτεΐνης στην ανταπόκριση σε ασκησιογενή σήματα. Οι περισσότερες μελέτες προσπαθούν να αποδώσουν στην πρωτεΐνη ρόλους στηριζόμενες στη χρονική αλληλουχία ενδοκυτταρικών γεγονότων.

Χαρακτηριστικότερο παράδειγμα αποτελεί η μελέτη των Xia et al. (1997), όπου ερεθίζοντας με ηλεκτρικό τρόπο καρδιακά μυϊκά κύτταρα προσπάθησαν να συνδέσουν την παραγωγή δραστικών ειδών οξυγόνου (παράγονται σε αυξημένες ποσότητες κατά την άσκηση) με την αυξημένη έκφραση του c-fos και την επακόλουθη αύξηση της συγκέντρωσης του κυτοχρώματος c. Παρ' όλα αυτά, όπως σχολίασαν και οι Baar et al. (1999) σε πρόσφατη ανασκόπησή τους, η παραπάνω χρονική αλληλουχία δεν μπορεί σε καμία περίπτωση να αποδείξει παρά μόνο να υποδείξει μηχανισμό.

Συμπερασματικά, από τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης φάνηκε ότι οξεία άσκηση αντοχής επέφερε αρχικά μείωση και ύστερα αύξηση της c-Fos σε αγύμναστους και γυμνασμένους επίμυες, ενώ οι επίμυες που γυμνάστηκαν για 5 ημέρες παρουσίασαν υψηλότερα επίπεδα ηρεμίας c-Fos από τα αντίστοιχα επίπεδα των αγύμναστων. Ειδικά το τελευταίο εύρημα εμπλέκει τη c-Fos στις διαδικασίες που συμβαίνουν από τα πρώτα στάδια προσαρμογών ως ανταπόκριση σε άσκηση αντοχής στο σκελετικό μυ.

Προτάσεις

Σε μια επόμενη μελέτη θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ομάδες ελέγχου σε κάθε χρονικό σημείο δειγματοληψίας μετά την άσκηση, πρωτόκολλο με το οποίο θα μπορούσε να αποκλειστεί η ημερήσια διακύμανση των επιπέδων της c-Fos, αφού,

σύμφωνα με τους Carutto & Guido (2000) και Novak, Smale & Nunez (2000), σε νευρικά κύτταρα υπήρχαν μεγάλες ημερήσιες διακυμάνσεις της c-Fos.

Η έκφραση του c-fos, όπως και κάθε άλλου γονιδίου, υπόκειται σε προ-μεταφραστικό, μεταφραστικό και μετα-μεταφραστικό έλεγχο. Μελλοντικά, θα ήταν ενδιαφέρον να μελετηθούν οι μεταβολές στα σημεία ελέγχου που προκάλεσαν την αύξηση της c-Fos. Αυτό θα μπορούσε να γίνει μετρώντας τη συγκέντρωση και τη σταθερότητα του mRNA του c-fos (προ-μεταφραστικός έλεγχος), καθώς και τη σταθερότητα της c-Fos (μετα-μεταφραστικός έλεγχος). Επιπλέον, θα ήταν ενδιαφέρουσα η χρησιμοποίηση αναστολέων (π.χ. έναντι κάποιας MAPK) με σκοπό τη διαλεύκανση μέρους των ενδοκυτταρικών σηματοδοτικών οδών που μεσολαβούν στην αύξηση της συγκέντρωσης της c-Fos μετά από άσκηση.

Τέλος, όπως ίσως έγινε φανερό, οι μελέτες που έχουν ασχοληθεί με την επίδραση της άσκησης στην έκφραση του c-fos, αλλά και γενικά στην έκφραση των μορίων που απαρτίζουν τις ενδοκυτταρικές σηματοδοτικές οδούς, είναι ελάχιστες. Η μεταφορά αποτελεσμάτων και η εξαγωγή συμπερασμάτων για την ανθρώπινη σωματική δραστηριότητα από μοντέλα που δεν τη μμούνται ικανοποιητικά είναι παρακινδυνευμένη. Έτσι, είναι απαραίτητο να γίνουν περισσότερες σχετικές μελέτες που θα χρησιμοποιούν ανθρώπους ή, αν χρησιμοποιούν πειραματόζωα, η άσκηση να μιμείται ικανοποιητικά την ανθρώπινη σωματική δραστηριότητα.

Σημειώσεις

1. Κατά συνθήκη, ένα γονίδιο γράφεται με πλάγιους χαρακτήρες, π.χ. fos, ενώ η παραγόμενη πρωτεΐνη δηλώνεται με το αρχικό γράμμα κεφαλαίο και με κανονικούς χαρακτήρες, π.χ. Fos.
2. Η σκελετική α-ακτίνη αποτελεί την αποκλειστική ισομορφή της ακτίνης, της κύριας πρωτεΐνης των λεπτών νηματίων, στις ενήλικες μυϊκές ίνες (Pette 1998).
3. Με τις μεθόδους της ανοσοϊστοχημείας και της ανοσοκυτταροχημείας μπορεί κάποιος να εντοπίσει στο οπτικό μικροσκόπιο τη θέση και αδρά την ποσότητα ενός αντιγόνου (στην περίπτωση μας του c-Fos) σε ιστούς και σε κύτταρα, αντίστοιχα. Επειδή η c-Fos είναι μεταγραφικός παράγοντας και ως τέτοιος εκτελεί την αποστολή της στον πυρήνα, είναι σημαντικό να γνωρίζουμε αν αυξήθηκε η ποσότητά της στο χώρο δράσης της.
4. Σύμφωνα με τους Booth & Thomason (1991), παραδείγματα ανθρώπινης σωματικής δραστηριότητας είναι το τρέξιμο, η κολύμβηση, η ποδηλασία και η χρησιμοποίηση αντιστάσεων. Μοντέλα σε ζώα που μιμούνται την ανθρώπινη σωματική δραστηριότητα είναι το τρέξιμο σε δαπεδοεργόμετρο ή σε ρόδα τρεξίματος και μοντέλα, όπου άσκηση με αντιστάσεις παρέχεται για 1-2 h/ημέρα ακολουθούμενη από αποκατάσταση για το υπόλοιπο της ημέρας.
5. Πολλοί ερευνητές (ενδεικτικά, Aronson et al. 1997b· Widegren et al. 2000· Widegren et al. 1998), στην προσπάθειά τους να απομονώσουν τις τοπικές από τις γενικευμένες επιδράσεις της άσκησης, χρησιμοποιούν ένα πρωτόκολλο άσκησης (συνήθως ποδηλάτηση), όπου ο εξεταζόμενος χρησιμοποιεί μόνο το ένα μέλος. Έτσι, συλλέγοντας μυϊκές βιοψίες και από τα δύο μέλη, μπορούν να εκτιμήσουν τις τυχόν γενικευμένες επιδράσεις της άσκησης.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Angel, P. & Karin, M. (1991). The role of *jun*, *fos* and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1072, 129-157.
- Aronson, D., Boppart, M.D., Dufresne, S.D., Fielding, R.A. & Goodyear, L.J. (1998). Exercise stimulates c-Jun NH₂ kinase activity and c-Jun transcriptional activity in human skeletal muscle. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 251, 106-110.
- Aronson, D., Dufresne, S.D. & Goodyear, L.J. (1997a). Contractile activity stimulates the c-Jun NH-terminal kinase pathway in rat skeletal muscle. *Journal of Biological Chemistry*, 272, 25636-25640.
- Aronson, D., Violan, M.A., Dufresne, S.D., Zangen, D., Fielding, R.A. & Goodyear, L.J. (1997b). Exercise stimulates the mitogen-activated protein kinase pathway in human skeletal muscle. *Journal of Clinical Investigation*, 99, 1251-1257.
- Baar, K., Blough, E., Dineen, B. & Esser, K. (1999). Transcriptional regulation in response to exercise. *Exercise and Sport Science Reviews*, 27, 333-379.
- Babu, G.J., Lalli, J.M., Sussman, M.A., Sadoshima, J. & Periasamy, M. (2000). Phosphorylation of elk-1 by MEK/ERK pathway is necessary for *c-fos* gene activation during cardiac myocyte hypertrophy. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 32, 1447-1457.
- Bedford, T.G., Tipton, C.M., Wilson, N.C., Oppliger, R.A. & Gisolfi, C.V. (1979). Maximum oxygen consumption of rats and its changes with various experimental procedures. *Journal of Applied Physiology: Respiratory, Environmental and Exercise Physiology*, 47, 1278-1283.
- Bessereau, J.L., Fontaine, B. & Changeux, J.P. (1990). Denervation of mouse skeletal muscle differentially affects the expression of the *jun* and *fos* protooncogenes. *New Biologist*, 2, 375-383.
- Bigard, A.X., Mateo, P., Sanchez, H., Serrurier, B. & Ventura-Clapier, R. (2000). Lack of coordinated changes in metabolic enzymes and myosin heavy chain isoforms in regenerated muscles of trained rats. *Journal of Muscle Research and Cell Motility*, 21, 269-278.

- Bishopric, N.H., Jayasena, V. & Webster, K.A. (1992). Positive regulation of the skeletal alpha-actin gene by Fos and Jun in cardiac myocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 267, 25535-25540.
- Bito, H., Deisseroth, K. & Tsien, R.W. (1996). CREB phosphorylation and dephosphorylation: a Ca⁺²-and stimulus duration-dependent switch for hippocampal gene expression. *Cell*, 87, 1203-1214.
- Blume, A., Herdegen, T. & Unger, T. (1999). Angiotensin peptides and inducible transcription factors. *Journal of Molecular Medicine*, 77, 339-357.
- Booth, F.W. & Baldwin, K.M. (1996). Muscle plasticity: energy demand and supply processes. In L.B. Rowell & J.T. Shepherd (Eds.), *Handbook of Physiology, Section 12: Regulation and Integration of Multiple Systems* (pp. 1075-1123). New York: Oxford University Press.
- Booth, F.W. & Thomason R.B. (1991). Molecular and cellular adaptation of muscle in response to exercise: perspectives of various models. *Physiological Reviews*, 75, 541-585.
- Booth, F.W. & Tseng, B.S. (1993). Olympic goal: molecular and cellular approaches to understanding muscle adaptation. *News in Physiological Sciences*, 8, 165-169.
- Booth, F.W., Tseng, B.S., Flück, M. & Carson, J.A. (1998). Molecular and cellular adaptation of muscle in response to physical training. *Acta Physiologica Scandinavica*, 162, 343-350.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
- Brown, W.E., Salmons, S. & Whalen, R.G. (1983). The sequential replacement of myosin subunit isoforms during muscle type transformation induced by long term electrical stimulation. *Journal of Biological Chemistry*, 258, 14686-14692.
- Caputto, B.L. & Guido, M.E. (2000). Immediate early gene expression within the visual system: light and circadian regulation in the retina and the suprachiasmatic nucleus. *Neurochemical Research*, 25, 153-162.

- Carson, J.A. & Booth, F.W. (1999). Serum response factor mRNA induction in the hypertrophying chicken patagialis muscle. *Journal of Applied Physiology*, 86, 377-382.
- Chahine, K., Walke, W. & Goldman, D. (1992). A 102 base pair sequence of the nicotinic acetylcholine receptor delta-subunit gene confers regulation by muscle electrical activity. *Development*, 115, 213-219.
- Chen, Y., Serfass, R.C. & Apple, F.S. (2000). Alterations in the expression and activity of creatine kinase-M and mitochondrial creatine kinase subunits in skeletal muscle following prolonged intense exercise in rats. *European Journal of Applied Physiology*, 81, 114-119.
- Chibalin, A.V., Yu, M., Ryder, J.W., Song, X.M., Galuska, D., Krook, A., Wallberg-Henriksson, H. & Zierath, J.R. (2000). Exercise-induced changes in expression and activity of proteins involved in insulin signal transduction in skeletal muscle: Differential effects on insulin-receptor substrates 1 and 2. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 97, 38-43.
- Clarkson, P.M. & Sayers, S.P. (1999). Etiology of exercise-induced muscle damage. *Canadian Journal of Applied Physiology*, 24, 234-248.
- Cohen, D.M. (1997). Mitogen-activated protein kinase cascades and the signalling of hyperosmotic stress to immediate early genes. *Comparative Biochemistry and Physiology. A: Comparative Physiology*, 117, 291-299.
- Curran, T., Miller, A.D., Zokas, L. & Verma, I.M. (1984). Viral and cellular fos proteins: a comparative analysis. *Cell*, 36, 259-268.
- Cusi, K., Maezono, K., Osman, A., Pendergrass, M., Patti, M.E., Pratipanawat, T., DeFronzo R.A., Kahn, C.R. & Mandarino, L.J. (2000). Insulin resistance differentially affects the PI 3-kinase- and MAP kinase-mediated signalling in human muscle. *Journal of Clinical Investigation*, 105, 311-320.
- Dawes, N.J., Cox, V.M., Park, K.S., Nga, H. & Goldspink, D.F. (1996). The induction of *c-fos* and *c-jun* in the stretched latissimus dorsi muscle of the rabbit: responses to duration, degree and re-application of the stretch stimulus. *Experimental Physiology*, 81, 329-339.

- Dawes, N.J., Lee, D.M., Cox, V.M., Nga, H. & Goldspink, D.F. (1995). The effect of various stretch and electrical stimulation regimes on proto-oncogene induction in skeletal muscle. *Biochemical Society Transactions*, 23, 327S.
- Dryer, R.L. & Lata, G.F. (1989). *Experimental Biochemistry*. Oxford: Oxford University Press.
- Dufresne, S.D., Bjorbaek, C., El-Haschimi, K., Zhao, Y., Aschenbach, W.G., Moller, D.E. & Goodyear, L.J. (2001). Altered extracellular signal-regulated kinase signaling and glycogen metabolism in skeletal muscle from p90 ribosomal S6 kinase 2 knockout mice. *Molecular and Cellular Biology*, 21, 81-87.
- Dusterhoft, S. & Pette, D. (1990). Effects of electrically induced contractile activity on cultured embryonic chick breast muscle cells. *Differentiation*, 44, 178-184.
- Eliakim, A., Moromisato, M.Y., Moromisato, D.Y. & Cooper, D.M. (1997a). Functional and muscle size response to 5 days of treadmill training in young rats. *Pediatric Exercise Science*, 9, 324-330.
- Eliakim, A., Moromisato, M., Moromisato, D., Brasel, J.A. Roberts, C. & Cooper, D.M. (1997b). Increase in muscle IGF-I protein but not IGF-I mRNA after 5 days of endurance training in young rats. *American Journal of Physiology*, 273, R1557-R1561.
- Flück, M., Carson, J.A., Schwartz, R.J. & Booth, F.W. (1999). SRF protein is upregulated during stretch-induced hypertrophy of rooster ALD muscle. *Journal of Applied Physiology*, 86, 1793-1799.
- Freyssenet, D., Connor, M.K., Takahashi, M. & Hood, D.A. (1999). Cytochrome *c* transcriptional activation and mRNA stability during contractile activity in skeletal muscle. *American Journal of Physiology*, 277, E26-E32.
- Gentz, R., Rauscher, F., Josephs, S. & Curran, T. (1989). Parallel association of Fos and Jun leucine zippers juxtapose DNA binding domains. *Science*, 55, 1695-1699.
- Gess, B., Wolf, K., Pfeifer, M., Riegger, A.J. & Kurtz, A. (1997). In vivo carbon monoxide exposure and hypoxic hypoxia stimulate immediate-early gene expression. *Pflügers Archiv—European Journal of Physiology*, 434, 568-574.

- Goldspink, D.F., Cox, V.M., Smith, S.K., Eaves, L.A., Osbaldeston, N.J., Lee, D.M. & Mantle, D. (1995). Muscle growth in response to mechanical stimuli, *American Journal of Physiology*, 268, E288-E297.
- Goldspink, D.F., Eastern, J., Winterburn, S.K., Williams, P.E. & Goldspink, G.E. (1991). The role of passive stretch and repetitive electrical stimulation in preventing skeletal muscle atrophy while reprogramming gene expression to improve fatigue resistance. *Journal of Cardiac Surgery*, 6, 218-224.
- Goldspink, G. (1999). Changes in muscle mass and phenotype and expression of autocrine and systemic growth factors by muscle in response to stretch and overload. *Journal of Anatomy*, 194, 323-334.
- Goldspink, G., Scutt, A., Loughna, P.T., Wells, D.J., Jaenicke, T. & Gerlach, G.F. (1992). Gene expression in skeletal muscle in response to stretch and force generation. *American Journal of Physiology*, 262, R356-R363.
- Gonzalez, B., Hernando, R. & Manso, R. (2000). Stress proteins of 70 kDa in chronically exercised skeletal muscle. *Pflügers Archiv–European Journal of Physiology*, 440, 42-49.
- Goodyear, L.J., Chang, P.Y., Sherwood, S.D., Dufresne, S.D. & Moller, D.E. (1996). Effects of exercise and insulin on mitogen-activated protein kinase signaling pathways in rat skeletal muscle. *American Journal of Physiology*, 271, E403-E408.
- Goodyear, L.J., Giorgino, F., Balon, T.W., Condorelli, G. & Smith, R.J. (1995). Effects of contractile activity on tyrosine phosphoproteins and phosphatidylinositol 3-kinase activity in rat skeletal muscle. *American Journal of Physiology*, 268, E987-E995.
- Gordon, S.E., Flück, M. & Booth, F.W. (2001). Selected contribution: Skeletal muscle focal adhesion kinase, paxillin, and serum response factor are loading dependent. *Journal of Applied Physiology*, 90, 1174-1183.
- Green, H.J., Dusterhoft, S., Dux, L. & Pette, D. (1992). Metabolite patterns related to exhaustion, recovery and transformation of chronically stimulated rabbit fast-twitch muscle. *Pflügers Archiv–European Journal of Physiology*, 420, 359-366.
- Harridge, S.D.R. (1996). The muscle contractile system and its adaptation to training. In P. Marconnet, B. Saltin, P. Komi & J. Poortmans (Eds.), *Human Muscular Function During Dynamic Exercise*, (pp. 82-94). Basel: Karger.

- Hayashi, T., Dufresne, S.D., Aronson, D., Sherwood, D.J., Hirshman, M.F., Boppart, M.D., Fielding, R.A. & Goodyear, L.J. (1999a). Intracellular signalling pathways in contracting skeletal muscle. In M. Hargreaves & M. Thompson (Eds.), *Biochemistry of Exercise X*, (pp. 19-34). Champaign, IL: Human Kinetics.
- Hayashi, T., Hirshman, M.F., Dufresne, S.D. & Goodyear, L.J. (1999b). Skeletal muscle contractile activity in vitro stimulates mitogen-activated protein kinase signaling. *American Journal of Physiology*, 277, C701-C707.
- Hollander, J., Fiebig, R., Gore, M., Bejma, J., Ookawara, T., Ohno, H. & Ji, L.L. (1999). Superoxide dismutase gene expression in skeletal muscle: fiber-specific adaptation to endurance training. *American Journal of Physiology*, 277, R856-R862.
- Hughes, P. & Dragunow, M. (1995). Induction of immediate-early genes and the control of neurotransmitter-regulated gene expression within the nervous system. *Pharmacological Reviews*, 47, 133-178.
- Inoue, K., Fushiki, T., Kano, T., Moritani, T. & Sugimoto, E. (1991). *Expression of a protooncogene and androgen receptors in skeletal muscle during exercise*. Proceedings of the 8th International Conference in Biochemistry of Exercise, Nagoya.
- Iwaki, K., Sukhatme, V.P., Shubeita, H.E. & Chien, K.R. (1990). Alpha- and beta-adrenergic stimulation induces distinct patterns of immediate early gene expression in neonatal rat myocardial cells. *fos/jun* expression is associated with sarcomere assembly; Egr-1 induction is primarily an alpha 1-mediated response. *Journal of Biological Chemistry*, 265, 13809-13817.
- Jaschinski, F., Schuler, M., Peuker, H. & Pette, D. (1998). Changes in myosin heavy chain mRNA and protein isoforms of rat muscle during forced contractile activity. *American Journal of Physiology*, 274, C365-C370.
- Kami, K., Noguchi, K. & Senba, E. (1995). Localization of myogenin, *c-fos*, *c-jun*, and muscle-specific gene mRNAs in regenerating rat skeletal muscle. *Cell and Tissue Research*, 280, 11-19.
- Komuro, I. & Yazaki Y. (1993). Control of cardiac gene expression by mechanical stress. *Annual Review of Physiology*, 55, 55-75.

- Kovacic-Milivojevic, B. & Gardner, D.G. (1992). Divergent regulation of the human atrial natriuretic peptide gene by *c-jun* and *c-fos*. *Molecular and Cellular Biology*, 12, 292-301.
- Kraus, W.E., Torgan, C.E. & Taylor, D.A. (1994). Skeletal muscle adaptation to chronic low-frequency motor nerve stimulation. *Exercise and Sport Science Reviews*, 22, 313-360.
- Krook, A., Widegren, U., Jiang, X.J., Henriksson, J., Wallberg-Henriksson, H., Alessi, D. & Zierath, J.R. (2000). Effects of exercise on mitogen- and stress-activated kinase signal transduction in human skeletal muscle. *American Journal of Physiology*, 279, R1716-R1721.
- Kubisch, C., Wollnik, B., Maas, A., Meyer, R., Vetter, H. & Neyses, L. (1993). Immediate-early gene induction by repetitive mechanical but not electrical activity in adult rat cardiomyocytes. *FEBS Letters*, 335, 37-40.
- Lai, M.M. & Booth, F.W. (1990). Cytochrome *c* mRNA and alpha-actin mRNA in muscles of rats fed beta-GPA. *Journal of Applied Physiology*, 69, 843-848.
- Lang, F., Busch, G.L. Ritter, M., Völki, H., Waldegger, S., Gulbins, E. & Häussinger, D. (1998). Functional significance of cell volume regulatory mechanisms. *Physiological Reviews*, 78, 247-306.
- Leonard, D.A., Rajaram, N. & Kerppola, T.K. (1997). Structural basis of DNA bending and oriented heterodimer binding by the basic leucine zipper domains of Fos and Jun. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 13, 4913-4918.
- Lew, A.M., Glogauer, M. & McCulloch, C.A.G. (1999). Specific inhibition of skeletal α -actin gene transcription by applied mechanical forces through integrins and actin. *Biochemical Journal*, 341, 647-653.
- Lewis, T.S., Shapiro, P.S. & Ahn, N.G. (1998). Signal transduction through MAP kinase cascades. *Advances in Cancer Research*, 74, 49-139.
- Li, K.P., Neuffer, P.D. & Williams, R.S. (1995). Nuclear responses to depletion of mitochondrial DNA in human cells. *American Journal of Physiology*, 269, C1265-C1270.
- Lieber, R.L. (1992). *Skeletal Muscle Structure and Function. Implications for Rehabilitation and Sports Medicine*. Philadelphia: Williams & Wilkins.

- Liste, I., Guerra, M.J., Caruncho, H.J. & Labandeira-Garcia, J.L. (1997). Treadmill running induces striatal Fos expression via NMDA glutamate and dopamine receptors. *Experimental Brain Research*, 115, 458-469.
- Mathews, C.K., Van Holde, K.E. & Ahern, K.G. (2000). *Biochemistry*. San Francisco: Addison Wesley Longman.
- Mattson, J.P., Ross, C.R., Kilgore, L. & Musch, T.I. (2000). Induction of mitochondrial stress proteins following treadmill running. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 32, 365-369.
- Michel, J.B., Ordway, J.A., Richardson, J.A. & Williams, R.S. (1994). Biphasic induction of immediate early gene expression accompanies activity-dependent angiogenesis and myofiber remodeling of rabbit skeletal muscle. *Journal of Clinical Investigation*, 94, 277-285.
- Morgan, J.I. & Curran, T. (1995). Immediate-early genes: ten years on. *Trends in Neurosciences*, 18, 66-67.
- Murakami, T., Shimomura, Y., Yoshimura, A., Sokabe, M. & Fujitsuka, N. (1998). Induction of nuclear respiratory factor-1 expression by an acute bout of exercise in rat muscle. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1381, 113-122.
- Neufer, P.D. (1999). Contractile activity and skeletal muscle gene expression. In M. Hargreaves & M. Thompson (Eds.), *Biochemistry of Exercise X* (pp. 291-300). Champaign, IL: Human Kinetics.
- Neufer, P.D. & Dohm, G.L. (1993). Exercise induces a transient increase in transcription of the GLUT-4 gene in skeletal muscle. *American Journal of Physiology*, 265, C1597-C1603.
- Nieto, J.L., Diaz-Laviada, I., Malpartida, J.M., Galve-Roperh, I. & Haro, A. (1997). Adaptations of the β -adrenoceptor-adenylyl cyclase system in rat skeletal muscle to endurance physical training. *Pflügers Archiv–European Journal of Physiology*, 434, 809-814.
- Novak, C.M., Smale, L. & Nunez, A.A. (2000). Rhythms in Fos expression in brain areas related to the sleep-wake cycle in the diurnal *Arvicanthis niloticus*. *American Journal of Physiology*, 278, R1267-R1274.

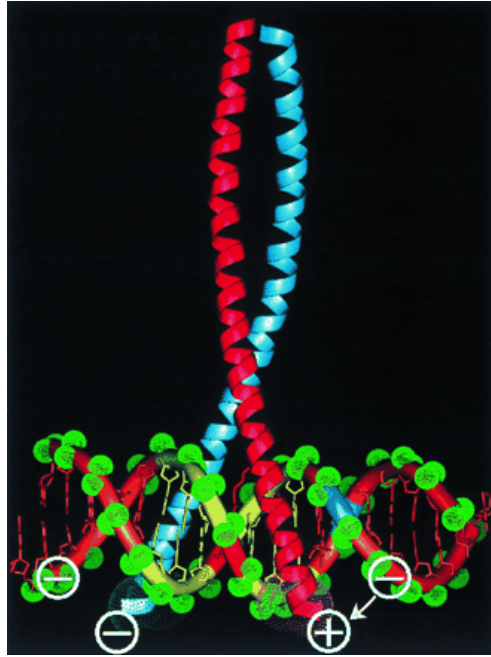
- O'Neill, D.S., Zheng, D., Anderson, W.K., Dohm, G.L. & Houmard, J.A. (1999). Effect of endurance exercise on myosin heavy chain gene regulation in human skeletal muscle. *American Journal of Physiology*, 276, R414-R419.
- Osbaldeston, N.J., Lee, D.M., Cox, J.E., Hesketh, J.F., Morison, G.E., Blair, G.E. & Goldspink, D.F. (1995). The temporal and cellular expression of *c-fos* and *c-jun* in mechanically stimulated rabbit latissimus dorsi muscle. *Biochemical Journal*, 308, 465-471.
- Osman, A.A., Pendergrass, M., Koval, J., Maezono, K., Cusi, K., Pratipanawatr, T. & Mandarino, L.J. (2000). Regulation of MAP kinase pathway activity in vivo in human skeletal muscle. *American Journal of Physiology*, 278, E992-E999.
- Paradis, P., MacLellan, W.R., Belaguli, N.S., Schwartz, R.J. & Schneider, M.D. (1996). Serum response factor mediates AP-1-dependent induction of the skeletal alpha-actin promoter in ventricular myocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 271, 10827-10833.
- Pavalko, F.M., Chen, N.X., Turner, C.H., Burr, D.B., Atkinson, S., Hsieh, Y., Qiu J. & Duncan, R.L. (1998). Fluid shear-induced mechanical signaling in MC3T3-E1 osteoblasts requires cytoskeleton-integrin interactions. *American Journal of Physiology*, 275, C1591-C1601.
- Pette, D. (1998). Training effects on the contractile apparatus. *Acta Physiologica Scandinavica*, 162, 367-376.
- Pette, D. & Staron, R.S. (1997). Mammalian skeletal muscle fiber type transitions. *International Review of Cytology*, 170, 143-223.
- Puntschart, A., Vogt, M., Widmer, H.R., Hoppeler, H. & Billeter, R. (1996). Hsp70 expression in human skeletal muscle after exercise. *Acta Physiologica Scandinavica*, 157, 411-417.
- Puntschart, A., Wey, E., Jostarndt, K., Vogt, M., Wittwer, M., Widmer, H.R., Hoppeler, H. & Billeter, R. (1998). Expression of *fos* and *jun* genes in human skeletal muscle after exercise. *American Journal of Physiology*, 274, C129-C137.
- Ream, W. & Field, K.G. (1999). *Molecular Biology Techniques. An Intensive Laboratory Course*. San Diego: Academic Press.

- Rosenzweig, A., Halazonetis, T.D., Seidman, J.G. & Seidman, C.E. (1991). Proximal regulatory domains of rat atrial natriuretic factor gene. *Circulation*, 84, 1256-1265.
- Ryder, J.W., Fahlman, R., Wallberg-Henriksson, H., Alessi, D.R., Krook, A. & Zierath, J.R. (2000). Effect of contraction on mitogen-activated protein kinase signal transduction in skeletal muscle. Involvement of the mitogen- and stress-activated protein kinase 1. *Journal of Biological Chemistry*, 275, 1457-1462.
- Ryuto, M., Ono, M., Izumi, H., Yoshida, S., Weich, H.A., Kohno, K. & Kuwano, M. (1996). Induction of vascular endothelial growth factor by tumor necrosis factor alpha in human glioma cells. Possible roles of SP-1. *Journal of Biological Chemistry*, 271, 28220-28228.
- Sadoshima, J. & Izumo, S. (1997). The cellular and molecular response of cardiac myocytes to mechanical stress. *Annual Review of Physiology*, 59, 551-571.
- Sadoshima, J. & Izumo, S. (1996). Mechanical stretch rapidly activates multiple signal transduction pathways in cardiac myocytes: potential involvement of an autocrine/paracrine mechanism. *EMBO Journal*, 12, 1681-1692.
- Sadoshima, J., Qiu, Z.H., Morgan, J.P. & Izumo, S. (1996). Tyrosine kinase activation is an immediate and essential step in hypotonic cell swelling-induced ERK activation and *c-fos* gene expression in cardiac myocytes. *EMBO Journal*, 15, 5535-5546.
- Sakamoto, K., Hirshman, M.F., Iguchi, T. & Goodyear, L.J. (2000). Contraction-induced phosphorylation of ERK and its downstream substrate Elk-1 in rat skeletal muscle. *Journal of Aging and Physical Activity*, 8, 261-262.
- Saltin, B., Sjøgaard, G., Strange, S. & Juel, C. (1987). Redistribution of K⁺ in the human body during muscular exercise: its role to maintain whole body homeostasis. In K. Shiraki & M.K. Yousef (Eds.), *Man in Stressful Environments: Thermal and Work Physiology* (pp. 247-267). Springfield, IL: Thomas.
- Samelman, T.R. (2000). Heat shock protein expression is increased in cardiac and skeletal muscles of Fischer 344 rats after endurance training. *Experimental Physiology*, 85, 97-102.
- Samelman, T.R., Shiry, L.J. & Cameron, D.F. (2000). Endurance training increases the expression of mitochondrial and nuclear encoded cytochrome c oxidase subunits and heat shock proteins in rat skeletal muscle. *European Journal of Applied Physiology*, 83, 22-27.

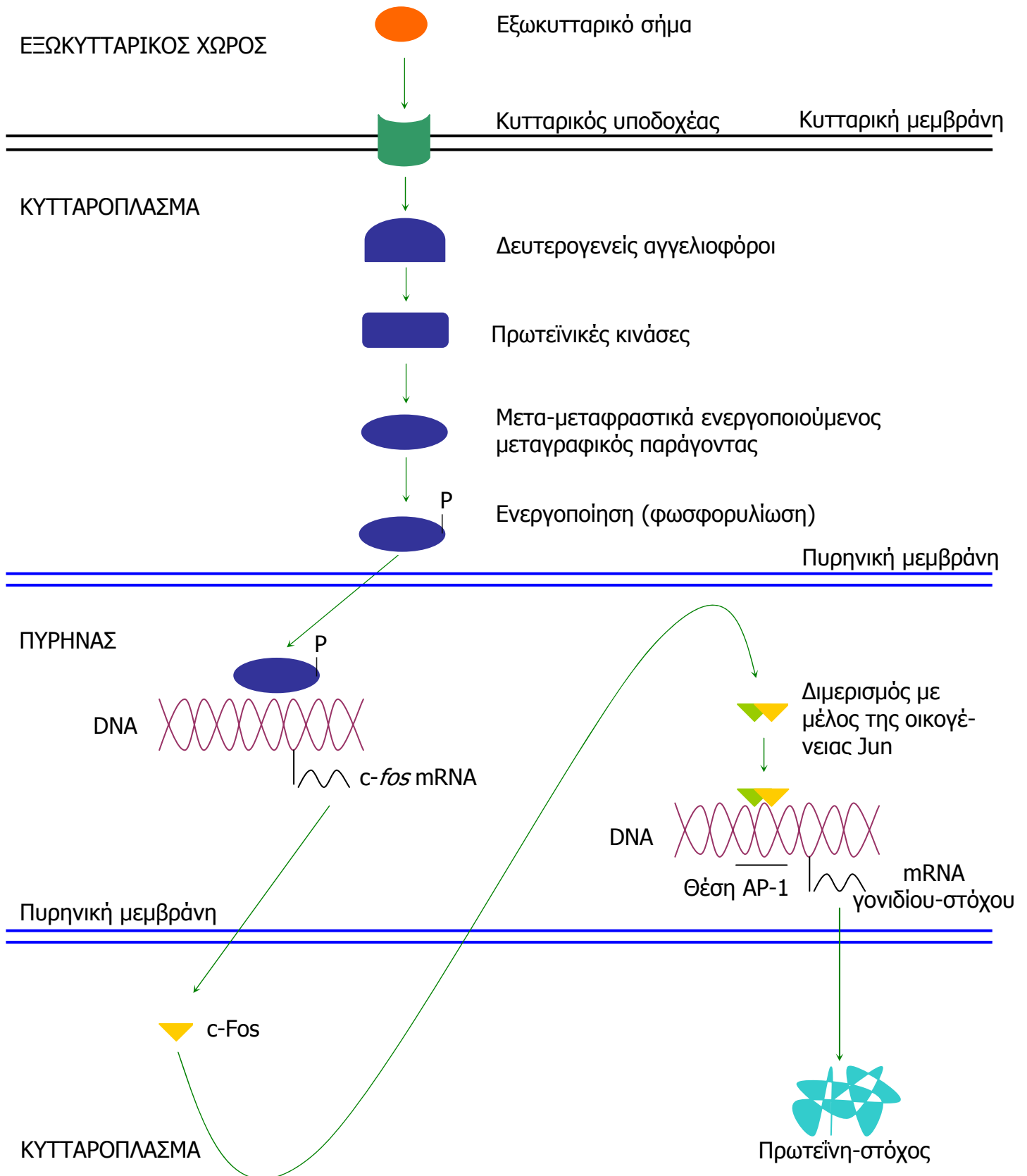
- Sapan, C.V., Lundblad, R.L. & Price, N.C. (1999). Colorimetric protein assay techniques. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 29, 99-108.
- Schneider, A.G., Sultan, K.R. & Pette, D. (1999). Muscle LIM protein: expressed in slow muscle and induced in fast muscle by enhanced contractile activity. *American Journal of Physiology*, 276, C900-C906.
- Sherwood, D.J., Dufresne, S.D., Markuns, J.F., Cheatham, B., Moller, D.E., Aronson, D. & Goodyear, L.J. (1999). Differential regulation of MAP kinase, p70^{S6K}, and Akt by contraction and insulin in rat skeletal muscle. *American Journal of Physiology*, 276, E870-E878.
- Short, M.L., Huang, D., Milkowski, D.M., Short, S., Kunstman, K., Soong, C.J. & Jungmann, R.A. (1994). Analysis of the rat lactate dehydrogenase A subunit gene promoter/regulatory region. *Biochemical Journal*, 304, 391-398.
- Sleight, R.G. & Lieberman, M.A. (1998). Signal Transduction. In N. Sperlakis (Ed.), *Cell Physiology Source Book* (pp. 119-131). New York: Academic Press.
- Thomason, D.B. (1998). Translational control of gene expression in muscle. *Exercise and Sport Science Reviews*, 26, 165-190.
- Thomson, S., Mahadevan, L.C. & Clayton, A.L. (1999). MAP kinase-mediated signaling to nucleosomes and immediate-early gene induction. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 10, 205-214.
- Tsika, R.W. & Gao, L. (1996). Metabolic and contractile protein adaptations in response to increased mechanical loading. In R.J. Maughan & S.M. Shirreffs (Eds.), *Biochemistry of Exercise IX* (pp. 206-215). Champaign, IL: Human Kinetics.
- Tumminia, S.J., Mitton, K.P., Arora, J., Zelenka, P., Epstein, D.L. & Russell, P. (1998). Mechanical stretch alters the actin cytoskeletal network and signal transduction in human trabecular meshwork cells. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 39, 1361-1371.
- Walker, J. (2000). Protein structure, purification and characterisation. In K. Wilson & J. Walker (Eds.). *Principles and Techniques of Practical Biochemistry*. (pp. 312-356). Cambridge: Cambridge University Press.
- Weis, J. (1994). Jun, Fos, MyoD1, and myogenin proteins are increased in skeletal muscle fiber nuclei after denervation. *Acta Neuropathologica*, 87, 63-70.

- Whitelaw, P.F. & Hesketh, J.E. (1992a). The role of cellular oncogenes in myogenesis and muscle cell hypertrophy. *International Journal of Biochemistry*, 24, 193-203.
- Whitelaw, P.F. & Hesketh, J.E. (1992b). Expression of *c-myc* and *c-fos* in rat skeletal muscle. Evidence for increased level of *c-myc* mRNA during hypertrophy. *Biochemical Journal*, 281, 143-147.
- Widegren, U., Wretman, C., Lionikas, A., Hedin, G. & Henriksson, J. (2000). Influence of exercise intensity on ERK/MAP kinase signalling in human skeletal muscle. *Pflügers Archiv–European Journal of Physiology*, 441, 317-322.
- Widegren, U., Xin, J.J., Krook, A., Chibalin, A.V., Björnholm, M., Tally, M., Roth, R.A., Henriksson, J., Wallberg-Henriksson, H. & Zeirath, J.R. (1998). Divergent effects of exercise on metabolic and mitogenic signaling pathways in human skeletal muscle. *FASEB Journal*, 12, 1379-1389.
- Williams, R.S., Garcia-Moll, M., Mellor, J., Salmons, S. & Harlan, W. (1987). Adaptation of skeletal muscle to increased contractile activity. Expression of nuclear genes encoding mitochondrial proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 262, 2764-2767.
- Williams, R.S. & Neuffer, P.D. (1996). Regulation of gene expression in skeletal muscle by contractile activity. In L.B. Rowell & J.T. Shepherd (Eds.), *Handbook of Physiology, Section 12: Regulation and Integration of Multiple Systems* (pp. 1124-1150). New York: Oxford University Press.
- Williams, R.S., Salmons, S., Newsholme, E.A., Kaufman, R.E. & Mellor, J. (1986). Regulation of nuclear and mitochondrial gene expression by contractile activity in skeletal muscle. *Journal of Biological Chemistry*, 261, 376-380.
- Wittwer, M., Desplanches, D., Hoppeler, H. & Billeter, R. (2000). *Gene expression in hypokinesia induced muscle atrophy*. Proceedings of the 5th Annual Congress of the European College of Sports Science, Jyväskylä.
- Wojtaszewski, J.F.P., Lynge, J., Jakobsen, A.B., Goodyear, L.J. & Richter, E.A. (1999). Differential regulation of MAP kinase by contraction and insulin in skeletal muscle: metabolic implications. *American Journal of Physiology*, 277, E724-E732.
- Wretman, C., Widegren, U., Lionikas, A., Westerblad, H. & Henriksson, J. (2000). Differential activation of mitogen-activated protein kinase signalling pathways by isometric contractions in isolated slow- and fast-twitch rat skeletal muscle. *Acta Physiologica Scandinavica*, 170, 45-49.

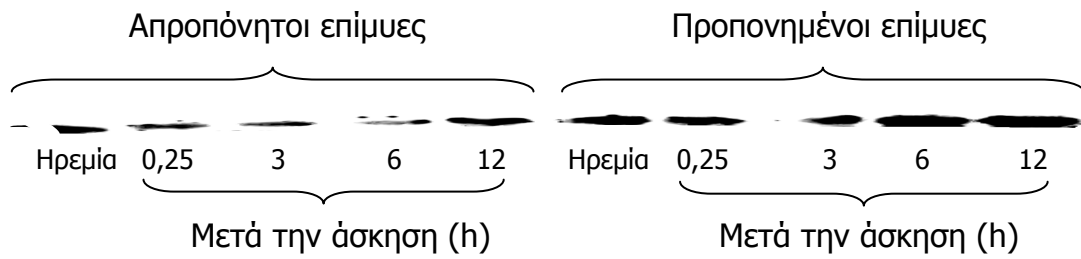
- Xia, Y., Buja, L.M. & McMillin, J.B. (1998). Activation of the cytochrome *c* gene by electrical stimulation in neonatal rat cardiac myocytes. Role of NRF-1 and c-Jun. *Journal of Biological Chemistry*, 273, 12593-12598.
- Xia, Y., Buja, L.M., Scarpulla, R.C. & McMillin, J.B. (1997). Electrical stimulation of neonatal cardiomyocytes results in the sequential activation of nuclear genes governing mitochondrial proliferation and differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 94, 11399-11404.
- Yeyama, T., Umemoto, S. & Senba, E. (1996). Immobilization stress induces c-Fos and c-Jun immediate-early genes expression in the heart. *Life Sciences*, 59, 339-347.
- Yu, M., Blomstrand, E., Chibalin, A.V., Wallberg-Henriksson, H., Zierath, J.R. & Krook, A. (2001). Exercise-associated differences in an array of proteins involved in signal transduction and glucose transport. *Journal of Applied Physiology*, 90, 29-34.
- Zubay, G.L. (1998). *Biochemistry*. Dubuque: McGraw-Hill.



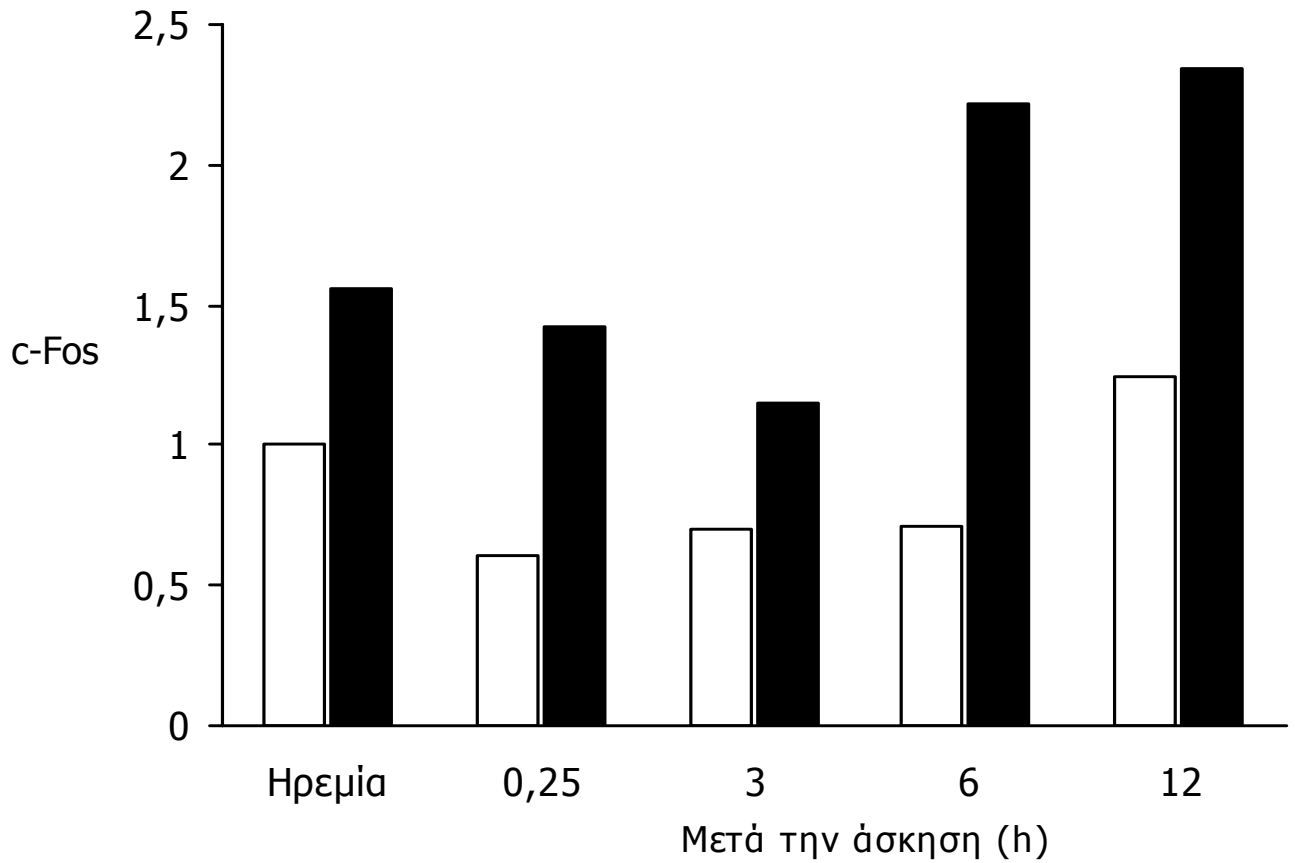
Σχήμα 1. Απεικόνιση του διμερούς που σχηματίζει μέλος της οικογένειας Fos (κόκκινη ταινία) με μέλος της οικογένειας Jun (γαλάζια ταινία), απαρτίζοντας το μεταγραφικό παράγοντα AP-1. Στο σχήμα παρουσιάζεται η αλληλεπίδραση του AP-1 με το DNA ενός γονιδίου-στόχου (από Leonard, Rajaram & Kerppola 1997).



Σχήμα 2. Ανασκόπηση της σηματοδοτικής οδού από την πρόσδεση του μηνύτορα στον κυτταρικό υποδοχέα μέχρι την πρόσδεση του μεταγραφικού παράγοντα AP-1 στο DNA του γονιδίου-στόχου και την παραγωγή της πρωτεΐνης. Για χάρη της απλότητας έχουν παραλειφθεί ορισμένα στάδια. (Τροποποιημένο από Blume et al. 1999, Booth & Baldwin 1996 και Hughes & Dragunow 1995)



Σχήμα 3. Επίδραση της άσκησης στο δαπεδοεργόμετρο επί 45 min στα επίπεδα της c-Fos σε απροπόνητους και προπονημένους επί 5 ημέρες επίμυες. Κάθε ζώνη αντιστοιχεί σε μείγμα ίσων ποσοτήτων ολικής πρωτεΐνης από 5 πειραματόζωα.



Σχήμα 4. Επίδραση της άσκησης στα επίπεδα της c-Fos στο μακρύ εκτείνοντα τα δάκτυλα μυ απροπόνητων (λευκές ράβδοι) και προπονημένων επί 5 ημέρες (μαύρες ράβδοι) επιμύων. Κάθε ράβδος αντιστοιχεί σε μείγμα ίσων ποσοτήτων ολικής πρωτεΐνης από 5 πειραματόζωα. Στην οπτική πυκνότητα του σήματος της πεντάδας που θανατώθηκε χωρίς καμία παρέμβαση δόθηκε αυθαίρετα η τιμή της μονάδας (Lew, Glogauer & McCulloch 1999).

Πίνακας. Ανταπόκριση του *c-fos* σε τροποποίηση της συσταλτικής δραστηριότητας του σκελετικού μυός *in vivo*

Είδος επιβάρυνσης	Είδος ζώου	Μυς	Διάρκεια επιβάρυνσης	Μεταβολή mRNA	Μεταβολή πρωτεΐνης	Αναφορά
Ανάρτηση οπίσθιων άκρων	Επίμυς	Υποκνημίδιος	14 ημέρες	↑ ¹	— ²	Wittwer et al. 2000
Απονεύρωση	Μυς	Υποκνημίδιος	1,5 h - 8 ημέρες	↑/↔ ³	—	Bessereau et al. 1990
Απονεύρωση	Επίμυς	Διαφραγματικός	1,5 h - 8 ημέρες	—	↑	Weis 1994
Αφαίρεση συνεργών μυών	Μυς	Υποκνημίδιος και πελματικός	3 - 48 h	↑	—	Whitelaw & Hesketh 1992
Αφαίρεση συνεργών μυών	Μυς	Πελματικός	1 - 48 h	↑/↔	—	Tsika & Gao 1996
Διάταση	Κουνέλι	Μακρύς εκτεινών τα δάκτυλα	3 ημέρες	↑ 1 h	—	Goldspink et al. 1995
Διάταση	Κουνέλι	Πλατύς ραχιαίος	25 min - 24 h	↑/↔	↑	Osbaldeston et al. 1995
Διάταση	Κουνέλι	Πλατύς ραχιαίος	5 min - 6 h	↑/↔	—	Dawes et al. 1996
Διάταση/Ηλεκτρικός ερεθισμός	Κουνέλι	Μακρύς εκτεινών τα δάκτυλα	12 h	↑/↔	—	Goldspink et al. 1995
Διάταση/Ηλεκτρικός ερεθισμός	Κουνέλι	Πλατύς ραχιαίος	25 min - 24 h	↑/↔	—	Osbaldeston et al. 1995
Ηλεκτρικός ερεθισμός	Επίμυς	Γαστροκνήμιος	1 min/2 ημέρες για 1 - 14 ημέρες	↑/↔	—	Inoue et al. 1991
Ηλεκτρικός ερεθισμός	Κουνέλι	Πρόσθιος κνημιαίος	45 min - 21 ημέρες	↑/↔	↑/↔	Michel et al. 1994

Ο πίνακας συνεχίζεται

Πίνακας. (συνέχεια)

Είδος επιβάρυνσης	Είδος ζώου	Μυς	Διάρκεια επιβάρυνσης	Μεταβολή mRNA	Μεταβολή πρωτεΐνης	Αναφορά
Ηλεκτρικός ερεθισμός	Κουνέλι	Μακρύς εκτεινών τα δάκτυλα	12 h	¹ ↑/↔	—	Goldspink et al. 1995
Ηλεκτρικός ερεθισμός	Κουνέλι	Πλατύς ραχιαίος	25 min - 24 h	¹ ↑/↔	² ↑	Osbaldeston et al. 1995
Ηλεκτρικός ερεθισμός	Επίμυς	Γαστροκνήμιος	15 min	¹ ↑	—	Aronson et al. 1997
Ηλεκτρικός ερεθισμός	Κουνέλι	Πρόσθιος κνημιαίος	8 h	¹ ↑/↔	—	Neufer et al. 1998
Ηλεκτρικός ερεθισμός	Κουνέλι	Πρόσθιος κνημιαίος	8 h/ημέρα για 7 ημέρες	¹ ↑/↔	—	Neufer et al. 1998
Ηλεκτρικός ερεθισμός	Κουνέλι	Πρόσθιος κνημιαίος	8 h/ημέρα για 14 ημέρες	¹ ↑/↔	—	Neufer et al. 1998
Ηλεκτρικός ερεθισμός	Επίμυς	Μίγμα μυών των οπίσθιων άκρων	15 s - 1 h	¹ ↑/↔	—	Sherwood et al. 1999
Τρέξιμο στο δαπεδοεργόμετρο	Άνθρωπος	Έξω πλατύς μηριαίος	30 min	¹ ↑	² ↑	Puntschart et al. 1998
Τρέξιμο στο δαπεδοεργόμετρο	Επίμυς	Υποκνημίδιος	1,5 h - 6 ημέρες	¹ ↑/↔	—	Murakami et al. 1998
Τρέξιμο στο δαπεδοεργόμετρο	Επίμυς	Μίγμα μυών των οπίσθιων άκρων	1 - 1,5 h	¹ ↑	—	Dufresne et al. 2001

¹↑ Αύξηση, ²— Δε μετρήθηκε, ³↔ Μη μεταβολή