

Received: 2012.06.18
Accepted: 2013.04.15
Published: 2013.08.05

Kinaza białkowa aktywowana przez AMP (AMPK) jako cel terapeutyczny

AMP-activated protein kinase (AMPK) as therapeutic target

Elżbieta Sarnowska¹, Anna Balcerak¹, Marta Olszyna-Serementa², Daria Kotlarek^{1,3}, Tomasz J. Sarnowski^{4*}, Janusz A. Siedlecki^{1*}

¹ Zakład Onkologii Molekularnej i Translacyjnej, Centrum Onkologii Instytutu im. Marii Skłodowskiej – Curie, Warszawa

² Zakład Teleradioterapii, Centrum Onkologii Instytutu im. Marii Skłodowskiej – Curie, Warszawa

³ Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego, Warszawa

⁴ Zakład Biosyntezy Białka, Instytut Biochemii i Biofizyki, Polskiej Akademii Nauk, Warszawa

* pozycja podzielona

Streszczenie

Kinaza białkowa aktywowana przez AMP (AMPK) jest głównym czujnikiem stanu metabolicznego, działającym zarówno na poziomie komórkowym jak i całego organizmu. Enzym ten jest heterotrimerem składającym się z trzech podjednostek: α (katalitycznej), β oraz γ (regulatorowej). Występuje zarówno w cytoplazmie jak i w jądrze komórkowym. AMPK jest aktywowana poprzez wzrastające stężenie AMP w czasie niedoboru energetycznego, co prowadzi do aktywacji szlaków katabolicznych oraz zahamowania procesów zużywających energię. Aktywność AMPK może być regulowana allosterycznie zarówno przez wiązanie się AMP do podjednostki regulatorowej γ , jak i przez fosforylację podjednostki katalitycznej α dokonywanej przez inne kinazy. Aktywna AMPK może efektywnie hamować szlak kinazy mTOR, enzymu nadmiernie aktywowanego w wielu typach nowotworów. Z kolei dezaktywację AMPK łączy się z cukrzycą typu 2, otyłością indukowaną dietą, powstawaniem insulinooporności i innymi chorobami metabolicznymi. Zmiany w aktywności AMPK obserwuje się również w stanie zapalnym. W ciągu ostatnich lat pojawiło się wiele doniesień literaturowych wskazujących, że zaburzenia w prawidłowym funkcjonowaniu AMPK mogą być przyczyną metabolicznego przeprogramowania w komórkach nowotworowych, znanego jako efekt Warburga. Dodatkowo, AMPK aktywowana jest podczas napromieniania komórek nowotworowych. Aktywacja AMPK prowadzi do zahamowania wzrostu, jednak umożliwia przetrwanie komórek w trudnych warunkach np. w stanie hipoksji lub niedoboru glukozy. Ze względu na jej główną rolę w utrzymaniu energetycznej homeostazy stanowi doskonały cel terapeutyczny. Wciąż jednak nie jest jednoznacznie stwierdzone czy korzystniejsza jest aktywacja AMPK, czy raczej zahamowanie jej aktywności.

Słowa kluczowe:

AMPK • LKB1 • kinaza mTOR • metabolizm • insulinooporność

Summary

AMP-activated protein kinase (AMPK) is one of the major energy sensor at both: cellular and whole body level. It exists as heterotrimer containing three subunits: the catalytic α subunit, β and regulatory γ . AMPK is localized both in the cytoplasm and in the nucleus. It is activated by increasing concentrations of AMP during the energy shortage, causing activation of catabolic pathways and inhibition of energy consuming processes. AMPK activity can be regulated allosterically: by binding AMP to a regulatory γ subunit, as well as by phosphorylation on Thr172 of the catalytic α subunit by other kinases. Activated AMPK can effectively inhibit the mTOR pathway which is hyperactive in many types of cancer. On the other hand AMPK inactivation associates with the type II diabetes, diet-induced obesity, insulin resistance and

Keywords:	the development of other metabolic disorders. The AMPK dysfunction is also observed in inflammation. It was discovered during last years that abnormalities in the AMPK function can induce the metabolic reprogramming in cancer cells known as the Warburg effect. Additionally, AMPK is activated during irradiation. Its activation leads to inhibition of growth. On the other hand, active AMPK enables cells to survive in difficult conditions such as hypoxia, or glucose deprivation. Because of its crucial role in maintaining of the energy homeostasis AMPK is an excellent therapeutic target. However, it still remains unknown what is better: to activate or inhibit the AMPK function. AMPK • LKB1 • mTOR kinase • metabolism • insulin resistance
Full-text PDF: Word count: Tables: Figures: References:	http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=1061403 4152 – 2 73
Adres autorów:	dr Tomasz Sarnowski, Instytut Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk, ul. Pawińskiego 5A, 02-106 Warszawa; tsarn@ibb.waw.pl; prof. dr hab. Janusz Siedlecki Centrum Onkologii ul. Roentgena 5, 02-871 Warszawa, jas@coi.waw.pl
Wykaz skrótów:	AICAR – 5-aminoimidazole-4-carboxamide, (AICA)-riboside, ATM – ataxia teleangiectasia mutated, CaMKKβ – calmodulin-dependent protein kinase kinase, FYN – kinaza tyrozynowa, LKB1 – liver kinase B1, LPS – lipopolisacharyd, PP2A, PP2C – fosfatazy, SESN1,2,3 – stress-responsive genes-sestryny, SIRT1 – deacetylaza zależna od NAD(+), TAK1 – transforming growth factor β-activated kinase 1, TZD – tiazolidynediony.

WSTĘP

Wzrost i rozwój organizmu zależy od dynamicznej kontroli jego stanu energetycznego. Jest on ściśle związany z dostępnością pożywienia. W ciągu ostatnich kilku lat naukowcy zidentyfikowali enzym będący głównym regulatorem homeostazy energetycznej zarówno na poziomie komórki jak i całego organizmu. Enzym ten zwany kinazą aktywowaną przez AMP (AMPK) jest ssaczym homologiem drożdżowej kinazy snf1, która pełni funkcję przełącznika w stanie stresu metabolicznego. Kinaza snf1 pozwala drożdżom na przetrwanie głodu wywołanego brakiem glukozy [67]. W warunkach gdy zaburzony jest stosunek ATP/AMP (np. podczas hipoksji, niedoboru pożywienia czy glukozy, a także w mięśniach podczas ćwiczeń) AMPK ulega aktywacji [22]. Dodatkowo kinaza ta integruje sygnały ze szlaków hormonalnych i metabolicznych utrzymując w komórce równowagę energetyczną m.in. poprzez kontrolę metabolizmu lipidów. Aktywacja AMPK prowadzi do zahamowania szlaków wiążących się z konsumpcją energii, takich jak: synteza kwasów tłuszczowych, synteza cholesterolu w wątrobie, sekrecja insuliny z komórek β trzustki. Jednak aktywna AMPK promuje i aktywuje szlaki oraz procesy kataboliczne prowadzące do wytwarzania ATP, takie jak np. pobieranie i utlenianie kwasów tłuszczowych w wielu tkankach, glikoliza w mięśniu sercowym czy powstawanie nowych mitochondriów w mięśniach. AMPK wpływa również na transkrypcję swoistych genów zaangażowanych w regulację

metabolizmu [63]. W związku z tym, że AMPK uczestniczy w regulacji homeostazy energetycznej nie tylko na poziomie komórkowym, lecz także na poziomie całego organizmu uważa się, że stanowi ona atrakcyjny cel terapeutyczny w leczeniu wielu chorób metabolicznych włączając otyłość, cukrzycę typu 2, a także choroby układu krążenia. Zaburzenia aktywności tego enzymu mogą być przyczyną rozwoju wielu chorób metabolicznych. Istnieją dane wskazujące na silną korelację między niskim poziomem aktywności AMPK, spowodowanym głównie przez nadmierną ilość pożywienia oraz/lub brak aktywności fizycznej, a zaburzeniami metabolicznymi wiążącymi się z opornością na insulinę i otyłością [49]. Spadek aktywności AMPK obserwuje się również w zaburzeniach metabolicznych związanych z wysokim ryzykiem wystąpienia choroby nowotworowej. Wiele doniesień naukowych wskazuje na związek między tą kinazą a kancerogenezą zarówno na poziomie molekularnym jak i na poziomie całego organizmu, jednak mechanizm bezpośredniego udziału AMPK w etiologii tych zaburzeń pozostaje nadal nieznany. Wydaje się, że zaangażowanie AMPK w regulację procesów, takich jak wzrost komórek, regulacja cyklu komórkowego oraz organizacja cytoszkieletu jest bardzo istotne w kontekście kancerogenezy [64]. Wszystkie te procesy wymagają dostarczenia dużych ilości energii. Oznacza to, że AMPK musi w nich odgrywać kluczową rolę. Sugeruje się nawet, że AMPK pełni rolę czujnika energetycznego pozwalającego na utrzymanie energetycznej homeostazy a szlak sygnałowy AMPK wydaje się

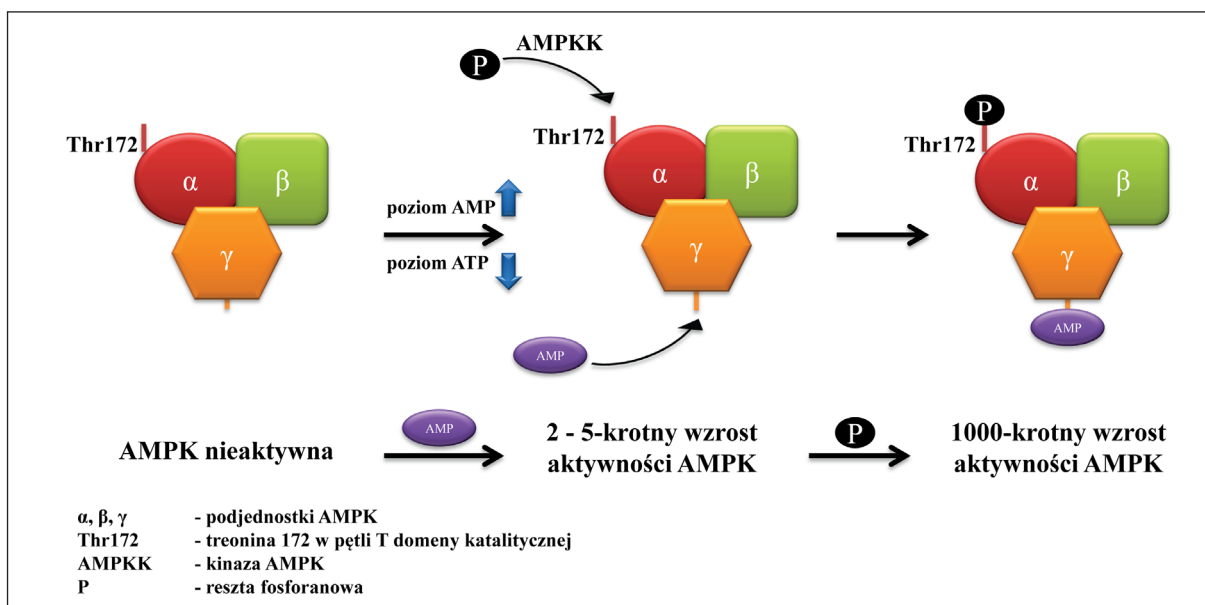
metabolicznym „punktem kontrolnym” w komórce prowadzącym do zahamowania wzrostu w przypadku obniżenia statusu energetycznego [20].

BUDOWA I REGULACJA AMPK

W komórkach AMPK występuje w postaci heterotrimeru, składającego się z trzech podjednostek α , β oraz γ w stosunku 1:1:1. Podjednostka katalityczna α zbudowana jest z serynowo-treoninowej domeny kinazowej, domeny odpowiedzialnej za autoinhibicję oraz domeny oddziałującej z podjednostkami β i γ [9]. Podjednostka γ zawiera motyw odpowiedzialny za wiązanie nukleotydów adeninowych, takich jak AMP i ATP. Główną rolę podjednostki β jest zapewnianie prawidłowej konformacji całego enzymu [68]. Każda z tych trzech podjednostek występuje u ssaków w kilku izoformach: podjednostki α i β mają po dwie izoformy ($\alpha 1$ i $\alpha 2$ oraz $\beta 1$ i $\beta 2$), natomiast podjednostka γ występuje w trzech izoformach ($\gamma 1$, $\gamma 2$ i $\gamma 3$). Dodatkowo, izoformy $\gamma 2$ i $\gamma 3$ występują w wariantach wynikających z alternatywnego składowania. Takie bogactwo izoform powoduje, że w organizmie teoretycznie może występować aż 12 klas heterotrimeru AMPK. Występowanie izoform podjednostek AMPK jest swoiste tkankowo. Ekspresję podjednostki katalitycznej $\alpha 1$ obserwuje się głównie w komórkach tłuszczowych (adipocytach), trzustce, płucach, śledzionie i nerkach, natomiast w mięśniach szkieletowych i mięśniu sercowym przeważa izoforma $\alpha 2$. Podjednostkę $\beta 1$ wykrywa się we wszystkich rodzajach tkanek, natomiast ekspresję izoformy $\beta 2$ obserwuje się głównie w mięśniach szkieletowych i sercu. Z kolei ekspresja genów kodujących podjednostki $\gamma 1$ i $\gamma 2$ jest powszechna, natomiast podjednostka $\gamma 3$ jest swoista dla mięśni aktywnych glikolitycznie. Zróżnicowanie na poziomie ekspresji oraz składu podjednostek w heterotrimerze AMPK może mieć

wpływ zarówno na swoistość danej kinazy, jak i decydować o charakterze przekazywania sygnału [6].

AMPK regulowana jest allosterycznie poprzez AMP [61]. Jego związanie się z podjednostką regulatorową γ prowadzi do 2-5-krotnego wzrostu aktywności kinazy [18]. Stopień stymulacji uzależniony jest od wariantów podjednostek, wchodzących w skład heterotrimeru AMPK. Największą aktywność po związaniu cząsteczki AMP wykazuje kinaza zawierająca podjednostki $\alpha 2$ i $\gamma 2$ [6]. Związanie AMP do podjednostki γ powoduje nie tylko allosteryczną aktywację enzymu, lecz także promuje fosforylację treoniny 172 znajdującej się w podjednostce α poprzez inne kinazy znajdujące się w szlaku powyżej AMPK. Prowadzi także do indukcji zmian konformacyjnych w domenie kinazowej. To z kolei chroni resztę treoninową przed defosforylacją, promując akumulację aktywnej, ufosforylowanej AMPK [47,59]. Badania przeprowadzone w ciągu ostatnich lat wykazały, że aktywność AMPK może być również regulowana przez ADP. Początkowo sądzono, że mechanizm aktywacji AMPK poprzez ADP jest analogiczny do poznanego dla AMP. Jednak wynikało to z zanieczyszczenia preparatu ADP cząsteczkami AMP, które powodowały artefaktową aktywację AMPK. Najnowsze badania wykazały jednak, że oczyszczony ADP nie powoduje aktywacji AMPK, jak to się dzieje w przypadku AMP, lecz chroni aktywną, ufosforylowaną uprzednio postać kinazy przed jej defosforylacją [43,69]. AMPK, podobnie jak inne kinazy białkowe, podlega autoregulacji, poprzez strukturalny element, który fizycznie blokuje miejsce katalityczne. Jest nim domena AID znajdująca się w podjednostce α . Analiza trójwymiarowej struktury białka wykazała, że bezpośredni kontakt między domeną AID i domeną katalityczną odgrywa istotną rolę w allosterycznej regulacji AMPK przez AMP.



Ryc. 1. Schemat wpływu zmian konformacyjnych w kompleksie AMPK zależnych od stosunku AMP/ATP na fosforylację Thr 172 przez kinazy znajdujące się w szlaku powyżej
AMPK – AMPKK (np. LKB1, TAK1, CaMKK)

Fosforylacja reszty treoninowej znajdującej się w pozycji 172 podjednostki α prowadzi do ponad 1000-krotnego wzrostu aktywności AMPK. Zwiększa to wrażliwość kinazy na niewielkie nawet zmiany statusu energetycznego komórki [59]. Poznane zostały również kinazy będące bezpośrednimi aktywatorami AMPK. Jedną z nich jest LKB1 (liver kinase B1). Gen kodujący tę kinazę zaliczany jest do klasy genów supresorowych. Mutacje w tym genie związane są z występowaniem zespołu Peutza-Jeghersa, objawiającego się m.in. predyspozycją do występowania nowotworów złośliwych. Początkowo uważano, że LKB1 jest ciągle aktywna i w żaden sposób nie jest regulowana przez AMP [36,51]. Ostatnie doniesienia wskazują jednak, że zarówno lokalizacja wewnątrzkomórkowa LKB1, jak i jej aktywność regulowana jest poprzez zależną od NAD(+) deacetylazę SIRT1. Promuje ona zależną od LKB1 stymulację AMPK przez bezpośrednią deacetylację LKB1, co z kolei wpływa na jej dystrybucję w komórce [29]. Lokalizacja komórkowa LKB1 zależna jest również od kinazy FYN. Fosforylacja LKB1 przez kinazę FYN prowadzi do zmiany jej umiejscowienia w komórce i promuje fosforylację AMPK, a co za tym idzie zwiększenie jej aktywności [71].

Kolejną kinazą aktywującą AMPK jest CaMKK β (calmodulin-dependent protein kinase kinase). Enzym ten fosforyluje AMPK w odpowiedzi na podwyższony poziom jonów Ca^{2+} w komórce, niezależnie od zmian w stosunku ATP/AMP [66]. W komórkach, w których brak jest LKB1 następowała aktywacja podjednostki α w AMPK po dodaniu związku o nazwie AICAR, który przekształcany jest do analogu AMP (ZMP) nie zaburzając stosunku ATP/AMP. Dane te sugerowały istnienie dodatkowej kinazy aktywującej AMPK niezależnie od LKB1. Okazało się, że jest nią kinaza ATM (ataxia teleangiectasia mutated) należąca do rodziny kinaz fosfatydyloinozitolowych (PI3 – kinazy) [60]. Kinaza ta bierze udział w naprawie DNA, kontroluje cykl komórkowy poprzez fosforylację i aktywację białek TP53, BRCA1, CHK2, P95/NBS1 w odpowiedzi na promieniowanie jonizujące (IR) indukujące dwuniciowe pęknięcia DNA [34,74]. Gen kodujący ATM podobnie jak gen kodujący LKB1 należy do rodziny genów supresorowych.

AMPK jest również fosforylowana przez TAK1 (transforming growth factor β -activated kinase 1) [70]. Brak jest jednak danych na temat funkcji fizjologicznej tej fosforylacji.

Oprócz treoniny 172 – głównego dla aktywności AMPK miejsca fosforylacji w podjednostce katalitycznej α zarówno podjednostki α jak i β mają więcej miejsc fosforylacji. Dla większości tych miejsc brak jest danych o roli jaką one odgrywają w mechanizmie aktywacji/hamowania aktywności AMPK. Ostatnie badania sugerują, że bezpośrednia fosforylacja seryny 487/491 podjednostki katalitycznej α powoduje zahamowanie aktywności AMPK w sercu [19].

Ważną funkcję w dezaktywacji aktywnej AMPK pełnią fosfatazy, które defosforylują resztę treoniny 172 pod-

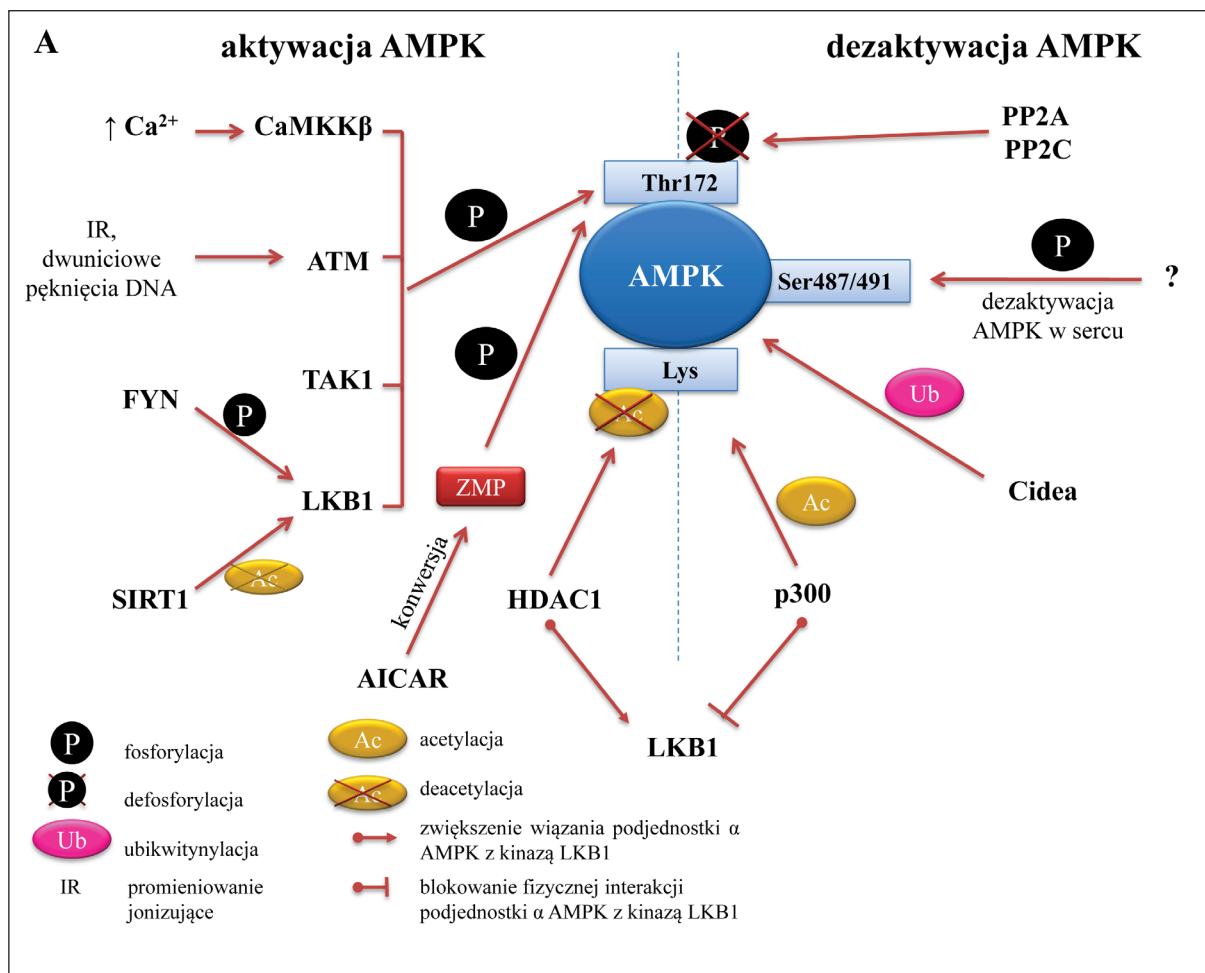
jednostki katalitycznej α . Za pomocą testów *in vitro* wykazano, że aktywna AMPK może być defosforylowana przez fosfatazy PP2A i PP2C [10], jednak mechanizm modulujący aktywność AMPK przez fosfatazy pozostaje wciąż niewyjaśniony. Z kolei ostatnie doniesienia wskazują na dodatkową regulację podjednostki katalitycznej AMPK poprzez acetylację i deacetylację reszt lizynowych. Acetylacja przez acetylazę p300 powoduje zablokowanie fizycznej interakcji podjednostki katalitycznej α w AMPK z LKB1, która fosforyluje i aktywuje AMPK. Natomiast deacetylacja przez deacetylazę HDAC1 powoduje zwiększenie wiązania się LKB1 z AMPK i fosforylację podjednostki katalitycznej α [35]. Dodatkowym mechanizmem regulującym stabilność AMPK jest jej degradacja w proteasomie, poprzez ubiquitylację zależną od kompleksu zawierającego białko Cidea [45].

FUNKCJA AMPK W REGULACJI METABOLIZMU

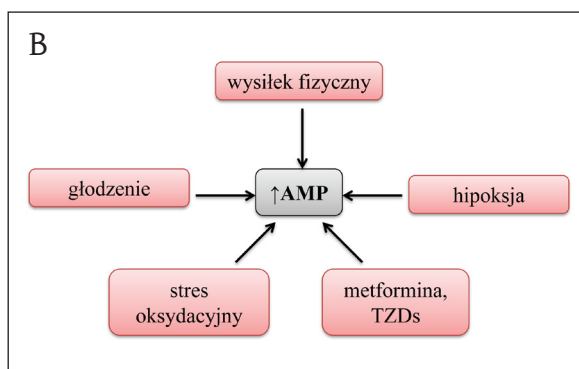
Korelację między aktywnością/dezaktywacją AMPK a chorobami metabolicznymi takimi jak cukrzyca typu 2 czy otyłość zaobserwowano już wiele lat temu. Zauważono, że u myszy będących na diecie wysokotłuszczowej następuje zmniejszenie zarówno poziomu fosforylacji jak również poziomu samej Ampk w mięśniach szkieletowych, sercu, wątrobie, śródbrzuszku aorty oraz w przysadce mózgowej [32,39]. Badania na myszach z mutacją w podjednostce katalitycznej $\alpha 2$ ujawniły, że inaktywacja Ampk spowodowana dietą wysokotłuszczową nie jest bezpośrednią przyczyną rozwijającej się u nich insulinooporności, jednak brak aktywnej AMPK przyczynia się do rozwoju znacznie ostrzejszej postaci tego schorzenia [13].

Aktywność AMPK regulowana jest negatywnie poprzez wysokie stężenie glukozy. Ostra hiperglikemia redukuje aktywność AMPK w mięśniach i wątrobie, a także w nerkach [27]. Przy wzroście poziomu glukozy ponad fizjologiczną normę następuje gwałtowny spadek aktywności AMPK, który skorelowany jest ze spadkiem fosforylacji treoniny 172 podjednostki katalitycznej α . Nie wydaje się jednak, aby spadek aktywności AMPK był wynikiem zmiany stosunku ATP/AMP, gdyż Itani i wsp. wykazali, że w mięśniach po inkubacji w roztworze o wysokim stężeniu glukozy stosunek ATP/AMP nie ulega zmianie [21]. Dane te sugerują istnienie innego mechanizmu regulacji AMPK w odpowiedzi na wysokie stężenie glukozy. Jednak Fan i wsp. wykazali, że w neuronach chwilowa zmiana stężenia glukozy moduluje zmiany w stosunku ATP/AMP, które wpływają na aktywność szlaku AMPK w podwzgórzu powodując uczucie głodu lub sytości [11]. Dodatkowo aktywność AMPK jest modulowana przez stężenie glikogenu [65] oraz dostępność aminokwasów [15].

W wielu pracach sugeruje się możliwość wzajemnej regulacji między szlakiem kinazy mTOR i AMPK – dwoma ważnymi szlakami odpowiedzialnymi za utrzymanie energetycznej homeostazy. Kinaza mTOR jest głównym czujnikiem poziomu ATP w komórce. Dodatkowo AMPK blokuje kinazę mTOR poprzez bezpośrednią fosforylację



Ryc. 2. Regulacja aktywności AMPK; A – czynniki wpływające na aktywację i dezaktywację AMPK



Ryc. 2. Regulacja aktywności AMPK; B – czynniki powodujące wzrost ilości AMP w komórce poprzez ograniczenie syntezy ATP lub jego gwałtowne zużycie

TSC2, a także fosforylację białka Raptor – podjednostki TSC2, do której wiąże się mTOR [17]. W czasie zwiększonego pobierania białka w wątrobie następuje „metaboliczna adaptacja” poprzez zwiększenie fosforylacji mTOR i obniżenie fosforylacji AMPK [7]. Podobnie dieta wysokobiałkowa prowadzi do obniżenia aktywności AMPK w podwzgórzu przy jednoczesnym zwiększeniu aktywności mTOR [48].

Aktywność AMPK odgrywa także główną rolę w pracy mięśnia sercowego. W czasie skurczu i rozkurczu występuje duże zapotrzebowanie energetyczne, a energia niezbędna do pracy serca pochodzi w 60-70% z utleniania kwasów tłuszczowych. Jest to związane z zahamowaniem poboru glukozy i preferowaniem cyklu Randle’a [46]. Jednak energia pochodząca z utleniania kwasów tłuszczowych w niedokrwionym mięśniu sercowym nie jest wystarczająca do przywrócenia przepływu krwi. Dlatego do utrzymania prawidłowej funkcji mięśnia sercowego korzystny wpływ ma insulina. Może ona spowodować zwiększenie zużycia glukozy przez mięsień sercowy poprzez aktywację glikolizy, przez zwiększenie ilości transportera glukozy GLUT4 w błonie cytoplazmatycznej i aktywację 6-fosfofrukto-2-kinazy [1]. Dodatkowo insulina ma bezpośredni wpływ na utlenianie kwasów tłuszczowych w prawidłowo natlenionym mięśniu sercowym. Proces ten zależny jest od inaktywacji AMPK [14]. Zaobserwowano, że insulina powoduje aktywację szlaku PKB/AKT w mięśniu sercowym, w związku z tym przeprowadzono badania mające na celu sprawdzenie, czy aktywacja PKB/AKT ma wpływ na dezaktywację AMPK. Okazało się, że w sercach myszy transgenicznych, które miały konstytutywnie aktywną kinazę Pkb/Akt, obserwowano znaczne obniżenie fosforylacji Ampk w porównaniu

z kontrolą, co sugeruje istotną rolę insuliny w obniżaniu aktywności Ampk poprzez szlak Pkb/Akt [26].

ROLA AMPK W CUKRZYCY TYPU 2 I W STANIE ZAPALNYM

Cukrzyca typu 2 jest jedną z tzw. chorób cywilizacyjnych. Nieleczona cukrzyca doprowadza do groźnych powikłań, takich jak makro- i mikroangiopatia, co z kolei 2-3-krotnie zwiększa ryzyko występowania chorób sercowo-naczyniowych, zawału oraz udaru. Jednym z najlepszych i powszechnie używanych leków w leczeniu cukrzycy typu 2, stosowanym od 1957 r., jest metformina – dimetylowa pochodna biguanidu [75]. Jednym z najważniejszych zaburzeń obserwowanych podczas rozwoju cukrzycy typu 2 jest hiperglikemia. Wynika ona zarówno z ograniczonego pobierania glukozy przez mięśnie jak też z nadprodukcji glukozy *de novo* w wątrobie. Podanie choremu metforminy powoduje aktywację AMPK prowadzącą do zahamowania wytwarzania glukozy w wątrobie, a także stymuluje translokację transportera glukozy GLUT4 do błony komórkowej w mięśniach szkieletowych [31]. Podobne działanie na lokalizację transportera GLUT4 w mięśniach mają tiazolidynediony (TZD), np. rosiglitazone stosowane od niedawna w terapii cukrzycy typu 2 umożliwiając zwiększone pobieranie glukozy. Podanie TZD powoduje bardzo szybką aktywację AMPK, której aktywność wzrasta już po 15 min od zastosowania leku. TZD z jednej strony stymulują wydzielanie adiponektyny (aktywatora AMPK) w mięśniach, której poziom znacznie spada w otyłości. Z drugiej strony TZD hamują też działanie łańcucha oddechowego powodując zwiększenie stężenia AMP – aktywatora AMPK [30]. Oznacza to, że TZD stymulują AMPK na dwa różne sposoby.

Wyniki uzyskane podczas przeprowadzonych ostatnio badań wskazują, że AMPK pełni ważną rolę w odpowiedzi na stan zapalny. Po podaniu czynnika indukującego odpowiedź zapalną w komórkach (LPS – lipopolisacharyd), obserwowano spadek aktywności AMPK. Przeciwnie podanie IL-10 i TGF- β , cytokin działających przeciwzapalnie, obserwuje się wzrost aktywności tej kinazy. Dodatkowo spadek ekspresji lub zahamowanie aktywności AMPK wywołane zadziałaniem czynnika indukującego odpowiedź zapalną powoduje zwiększone wydzielanie cytokin prozapalnych, takich jak: TNF- α , IL-6 oraz IL-1. Z kolei nadekspresja AMPK prowadziła do wzrostu ilości IL-10 [50]. Aktywacja AMPK przez AICAR lub obecność konstitutywnie aktywnej kinazy powodowała, że czynniki takie jak wolne kwasy tłuszczowe lub TNF- α nie aktywowały NF- κ B [4]. Sugeruje to, że aktywna AMPK jest ważnym czynnikiem hamującym stan zapalny i działa przeciwzapalnie.

Obniżenie aktywności AMPK obserwowane w cukrzycy i otyłości również może być powodem powstawania stanów zapalnych. Rozwijająca się u osób otyłych insulinooporność może promować rozwój cukrzycy typu 2, ale wrażliwość na insulinę wydaje się niezależna od ilości tkanki tłuszczowej [16]. Tę sprzeczność można wyjaśnić przez założenie, że insulinooporność zależna od otyło-

ści może być związana z chronicznym stanem zapalnym [37]. Rzeczywiście u otyłych pacjentów obserwuje się pobudzenie makrofagów, podobnie jak w stanie zapalnym. Charakteryzują się one podwyższonym poziomem ekspresji NF- κ B i TNF- α . Jak wykazano, TNF- α może również indukować insulinooporność [56]. Kolejnym potencjalnym wyjaśnieniem wspomnianej wyżej sprzeczności może być to, że u osób otyłych obserwuje się zwiększoną ilość estryfikacji i pobierania kwasów tłuszczowych, co prowadzi do nagromadzenia w tkankach bioaktywnych lipidów, takich jak: ceramidy, diacyloglicerole oraz acylo-CoA. Lipidy te biorą udział w aktywacji kinaz prozapalnych, np. PKC, IKK- β i JNK [54]. Dane przedstawione w pracy Steinberga i wsp. wydają się potwierdzać związek między aktywnością AMPK, stanem zapalnym i chorobami metabolicznymi. U myszy ob/ob (mysi model otyłości), obserwowano w mięśniach obniżoną aktywność Ampk, zahamowany proces utleniania kwasów tłuszczowych, zwiększoną ekspresję fosfatazy Pp2C i obniżoną wrażliwość na insulinę. U myszy ob/ob Tnfr-/-, zaburzenie ścieżki sygnałowej zależnej od Tnf chroniło przed zahamowaniem Ampk [59].

W otyłości podniesiony jest poziom krążących wolnych kwasów tłuszczowych, które aktywują szlak TLR4-NF- κ B, a następnie odpowiedź zapalną w adipocytach i makrofagach. To z kolei wpływa na rozwój insulinooporności w mięśniach szkieletowych [55]. Interesujące jest też to, że wyłączenie szlaku TLR4 chroni przed insulinoopornością wynikającą z diety wysokotłuszczowej poprzez redukcję stanu zapalnego. Dane te ściśle łączą ze sobą metabolizm i wrodzoną odpowiedź immunologiczną.

Dodatkowym czynnikiem hamującym aktywność AMPK w mięśniach szkieletowych jest rezystyna – cytokina wydzielana przez komórki tłuszczowe. Jej poziom u osób otyłych jest znacznie podniesiony. Powstawanie insulinooporności wywołanej rezystyną jest prawdopodobnie spowodowane akumulacją lipidów i ich mediatorów. Pojawienie się insulinooporności prowadzi do obniżenia poziomu adiponektyny, co z kolei indukuje obniżenie aktywności AMPK. AMPK jest ważnym czynnikiem w biogenezie mitochondriów długotrwała inaktywacja tej kinazy prowadzi do spadku liczby mitochondriów w mięśniach szkieletowych. Tego typu zjawisko obserwuje się u osób otyłych z rozwiniętą insulinoopornością. Podobny mechanizm zaobserwowano również w mięśniach sercowych. Szybki wzrost stężenia lipidów (5 h infuzji) lub dieta wysokotłuszczowa indukująca otyłość wpływały na zmniejszenie metabolizmu glukozy w kardiomiocytach i obniżenie fosforylacji AMPK w mięśniach sercowych [25]. Obserwowano także podwyższony poziom cytokin prozapalnych TNF- α i IL-6. Dalsze badania na myszach z wyciszonym genem IL-6 wykazały, że ta interleukina jest głównym komponentem w indukowanym dietą stanie zapalnym mięśnia sercowego. Przewlekła ekspozycja na IL-6 (co występuje w otyłości) promuje rozwój insulinooporności zarówno *in vitro* jak i *in vivo* [42]. W przeciwieństwie do tego w czasie intensywnych ćwiczeń następuje wyrzut IL-6 z mięśni szkieletowych

i aktywacja AMPK. Prowadzi to do zwiększonego poboru glukozy i 'uwrażliwienia' na insulinę na poziomie całego organizmu [24].

AMPK W UDARZE MÓZGU

Brak krwi i tlenu w czasie niedokrwiennego udaru mózgu prowadzi do zaburzenia w homeostazie jonowej, a następstwem tego jest obumieranie neuronów. Aby naprawić uszkodzenia i przywrócić równowagę w neuronach następuje aktywacja wielu procesów wysokoenergetycznych. Nadmierna aktywacja tych procesów może jednak spowodować całkowitą zapasć energetyczną i obumieranie komórek. Początkowo uważano, że aktywacja AMPK jest wynikiem odpowiedzi adaptacyjnej na niedokrwienie, hipoksję i niedobór glukozy. Jednak eksperymenty z wykorzystaniem inhibitorów AMPK, takich jak Coumpound C (działa bezpośrednio na AMPK) oraz inhibitor syntazy kwasów tłuszczowych C75 (hamuje AMPK pośrednio), miało działanie neuroprotekcyjne po udarze mózgu [40]. Dodatkowo u myszy pozbawionych podjednostki katalitycznej $\alpha 2$ w czasie udaru po podaniu inhibitora – Coumpound C nie zaobserwowano znaczącego efektu neuroprotekcyjnego. Te dane sugerują, że regulacja równowagi energetycznej w neuronach w czasie niedokrwiennego udaru mózgu może mieć istotne znaczenie terapeutyczne [33]. Wiele z przeprowadzonych badań potwierdziło korzystny wpływ farmakologicznej aktywacji AMPK na przepływ krwi w naczyniach obwodowych [2]. Jednym z proponowanych mechanizmów ochronnego działania AMPK jest aktywacja śródbłonkowej syntazy tlenu azotu (eNOS), która wpływa na wytwarzanie NO, głównej cząsteczki sygnałowej w układzie krwionośnym [76]. AMPK wzmacnia aktywność eNOS poprzez fosforylację, co z kolei promuje asocjację eNOS z białkiem szoku cieplnego HSP90 prowadząc do zwiększonego wytwarzania NO w śródbłonku. Dodatkowo, AMPK wpływa na angiogenezę wywołaną przez VEGF w obwodowym układzie krwionośnym [58]. Wyniki uzyskane podczas przeprowadzonych ostatnio badań wykazują zwiększoną aktywację AMPK i eNOS w komórkach śródbłonka w tętnicach mózgowych po ostrym krwotoku podopajęczynówkowym. Wydaje się, że AMPK wpływa korzystnie na układ krwionośny mózgu, poprzez wywołane za pośrednictwem aktywacji eNOS rozszerzenie naczyń krwionośnych lub indukowaną przez VEGF angiogenezę [44]. Jednak konsekwencje fizjologiczne wynikające z aktywacji AMPK po stresie związanym z niedotlenieniem w naczyniach mózgowych są bardzo słabo poznane i wciąż wymagają dodatkowych badań.

AKTYWNOŚĆ AMPK W KANCEROGENEZIE

W ostatnich latach ukazało się wiele doniesień wskazujących, że farmakologiczna stymulacja AMPK ma działanie przeciwnowotworowe. Dodatkowo, analizy epidemiologiczne wykazały, że stosowanie metforminy (powszechnie stosowany lek przeciwcukrzycowy) u pacjentów z cukrzycą typu 2 chorujących na nowotwory znacznie redukuje obciążenia wynikające z choroby nowotworo-

wej [12]. W oparciu o te dane zrodziła się koncepcja, że farmakologiczne aktywatory AMPK mogą być wykorzystane w zapobieganiu i terapii nowotworów. Ponieważ aktywacja szlaku LKB1-AMPK hamuje aktywność kinazy mTOR, nadaktywnej w wielu typach nowotworów wydaje się, że stosowanie aktywatorów AMPK jest uzasadnione, tym bardziej że dodatkowo obserwowano selektywną toksyczność metforminy na komórki nowotworowe, zawierające mutację inaktywującą w genie TP53 [3]. Jednak wiadomo, że aktywacja AMPK w różnych stadiach rozwoju nowotworu może promować przeżycie komórek nowotworowych. Wiele danych wskazuje, że zarówno powstające komórki nowotworowe, jak i komórki przetrzujące znajdują się w specyficznym mikrośrodowisku, gdzie narażone są na wiele czynników wywołujących stres, takich jak np. hipoksja, zakwaszenie, niedostatek glukozy i składników odżywczych. W przypadku niedoboru energetycznego lub w hipoksji, aktywacja AMPK zapobiega apoptozie, co udokumentowano na przykładzie komórek raka trzustki [23]. Dodatkowo, aktywacja AMPK spowodowana niskim poziomem tlenu jest głównym czynnikiem promującym wzrost guzów ksenograftowych [28]. Wydaje się więc możliwe, że aktywacja AMPK może w pewnych warunkach sprzyjać rozwojowi nowotworu. Na przykład komórki raka piersi unikają specyficznej śmierci komórkowej związanej z brakiem adhezji przez zwiększone pobieranie glukozy, który wyrównuje wewnątrzkomórkowy poziom ATP i redukuje poziom reaktywnych form tlenu. AMPK stymuluje pobieranie glukozy i może być zaangażowana w zdolność komórek nowotworowych do unikania śmierci komórkowej spowodowanej utratą połączenia z macierzą zewnątrzkomórkową. Wiadomo, że AMPK reguluje wiele szlaków metabolicznych możliwe, że enzym ten jest głównym elementem w procesie przeprogramowania metabolicznego (efekt Warburga) obserwowanego w nowotworach [62]. Niewątpliwie AMPK stanowi znakomity cel terapeutyczny. Badania przeprowadzone na liniach komórkowych czerniaka wykazały zmniejszoną aktywność AMPK [73]. Dodatkowo wykazano, że obniżona aktywność tej kinazy jest skorelowana z obecnością mutacji w genie kodującym inną kinazę – B-RAF. Mutacja punktowa w genie kodującym kinazę B-RAF występuje w około 6% wszystkich nowotworów i w 50-70% przypadków czerniaka i prowadzi do konstytutywnej aktywacji B-RAF. Dodatkowo wykazano, że LKB1 – główny aktywator AMPK jest fosforylowana przez kinazy znajdujące się w szlaku B-RAF. Ciągła fosforylacja LKB1 przez kinazę szlaku B-RAF prowadzi do zmniejszenia oddziaływania między LKB1-AMPK. To z kolei uniemożliwia fosforylację podjednostki katalitycznej AMPK przez LKB1 i jej aktywację. Dlatego, nawet w sytuacji niedoboru energetycznego w komórce (nadmiernej ilości AMP), AMPK nie może zostać zaktywowana, co w konsekwencji prowadzi do niekontrolowanego wzrostu [71]. Badania przeprowadzone na 19 liniach komórkowych czerniaka z użyciem metforminy – aktywatora AMPK i vemurafenibu (inhibitora kinazy B-RAF) w różnych kombinacjach wykazały, że metformina hamowała wzrost w 12 z 19 linii, niezależnie od obecności mutacji B-RAF. W przypadku

jednej z linii, która miała dodatkową mutację w genie N-RAS metformina promowała proliferację. Natomiast synergistyczny, antyproliferacyjny efekt obserwowano w 6 z 11 linii czerniaka z mutacją V600E w B-RAF po zastosowaniu kombinacji vemurafenib + metformina. W liniach z mutacją w genie B-RAF opornych na vemurafenib zaobserwowano antagonistyczny efekt. W siedmiu z ośmiu linii czerniaka, bez mutacji w genie B-RAF pojawił się marginalny synergistyczny antyproliferacyjny efekt po podaniu metforminy + vemurafenib [41]. Co ciekawe, przeciwne dane przedstawił zespół kierowany przez Maraisa. Badania przeprowadzone przez ten zespół wykazały, że linie czerniaka z mutacją V600E w B-RAF, które potraktowano metforminą charakteryzowały się zwiększonym wzrostem. W liniach tych zaobserwowano również, wzrost ilości białka VEGF-A [38].

ROLA AMPK W RADIOTERAPII

Jedną z podstawowych metod leczenia chorób nowotworowych jest radioterapia. Uważa się, że jej skuteczność jest zbliżona do skuteczności chirurgii w onkologii. Ze względu na ogromną rolę radioterapii w leczeniu choroby nowotworowej obecnie trwają intensywne badania nad podniesieniem jej skuteczności przez kojarzenie jej z metodami zwiększającymi radiowrażliwość komórek nowotworowych.

W odpowiedzi na uszkodzenie DNA spowodowane promieniowaniem jonizującym (IR) kinaza ATM ulega autofosforylacji i fosforyluje białka kompleksu naprawy dwuniciowych pęknięć DNA. W ostatnich latach udowodniono, że w różnych rodzajach komórek raka IR może też aktywować AMPK [51]. Dodatkowo IR zwiększa ekspresję sestrzyn (stress-responsive genes) – SESN1/2 i wpływa na syntezę białek. Wszystkie te zjawiska zachodzące w napromienianych komórkach mają za zadanie ułatwić naprawę uszkodzeń DNA lub – w przypadku braku takich możliwości – wywołać apoptozę. Sestryny (SESN1-3) są prawdopodobnie związane z regulacją metabolizmu i starzenia się poprzez modulację ścieżki AMPK-mTOR. SESN1/2 mogą współdziałać bezpośrednio z AMPK w odpowiedzi na czynniki stresogenne. Promieniowanie jonizujące, stosowane w radioterapii powoduje zwiększenie ekspresji sestrzyn i aktywację AMPK. W linii komórkowej raka piersi MCF7 wykazano, że napromieniane komórki charakteryzują się zwiększoną aktywnością AMPK, ale efekt ten jest atenuowany przez siRNA SESN2. Dodatkowo, podwyższony poziom SESN2 hamuje szlak sygnałowy mTOR aktywowany przez IR. Proces ten uwrażliwia komórki MCF7 na napromienianie poprzez mechanizm zależny od AMPK. Te dane sugerują, że przynajmniej w raku piersi SESN2 wpływa zarówno na podstawową, jak i zależną od IR aktywację AMPK, zwiększając radiowrażliwość tych komórek [52].

Hipoksja, głodzenie komórki i czynniki wzrostu również aktywują AMPK poprzez kinazę ATM. Sanli i wsp. napromieniali dawkami 2-8 Gy komórki raka prostaty, płuca i piersi, inkubowane wcześniej z inhibitorami ATM

i AMPK oraz z aktywatorem AMPK. Badania te wykazały, że promieniowanie jonizujące aktywuje AMPK niezależnie od LKB1. Proces ten jest blokowany przez inhibitor ATM. Inhibitory AMPK blokują również zależną od IR aktywację regulatorów cyklu komórkowego TP53 i p21, powodując zwiększoną oporność na promieniowanie. Z kolei po dodaniu metforminy zmniejsza się frakcja komórek przeżywających po napromienianiu. Retrospektywne analizy sugerują, że metformina może zwiększać odpowiedź komórek raka piersi na chemioterapię. Udowodniono również, że AMPK związana jest z punktami kontroli cyklu komórkowego zależnymi od IR i przeżyciem komórek klonogennych. Dzięki skojarzeniu metforminy z radioterapią, AMPK może się stać farmakologicznym celem służącym do wzmocnienia odpowiedzi komórek na napromienianie. W badaniu Sanli i wsp. po raz pierwszy zwrócono uwagę na związek regulacji AMPK z terapeutycznymi dawkami promieniowania jonizującego [53].

Song i wsp. badali wpływ metforminy na komórki o fenotypie komórek macierzystych raka poddane hipofrakcjonowanej radioterapii. Badania te wykazały, że zarówno dawki frakcyjne większe jak i konwencjonalne (1,8-2 Gy) są bardziej skuteczne w skojarzeniu z podawaniem metforminy [57].

Z kolei Zannella i wsp. opisali inne skutki wpływu AMPK na komórki poddane napromienianiu. Promieniowanie jonizujące indukuje fosforylację AMPK w mechanizmie zależnym od ATM [72]. Dodatkowo, aktywna AMPK jest konieczna do zahamowania kinazy mTOR i przełączenia metabolizmu w odpowiedzi na napromienianie. W komórkach, w których AMPK została wyciszona promieniowanie jonizujące zwiększa aktywność mTOR. Oznacza to, że napromienianie jest niekorzystne dla komórek, dlatego AMPK jest konieczna do ograniczenia aktywności metabolicznej. Po napromienianiu w komórkach pozbawionych AMPK nie zmniejsza się zużycie tlenu, mimo że zapasy glukozy są ograniczone. To sugeruje, że nieprawidłowa aktywacja punktów kontroli cyklu komórkowego, obniżenie proliferacji i wzmożona śmierć komórkowa w warunkach hipoglikemii jest związana z utratą kontroli metabolicznej pod wpływem IR w komórkach z brakiem AMPK. Zachowanie prawidłowej funkcji AMPK w komórkach poddanych napromienianiu może przeciwdziałać nadmiernej aktywacji mTOR i hamować ich wzrost.

PODSUMOWANIE

Przedstawione dane świadczą o tym, że AMPK pełni funkcję przełącznika metabolicznego działającego nie tylko na poziomie komórkowym, ale także na poziomie całego organizmu. W związku z tym, że AMPK odgrywa istotną rolę w regulacji metabolizmu, indukcji stanu zapalnego, a także w takich schorzeniach jak udar mózgu czy kancerogeneza stanowiąc ona może atrakcyjny cel terapeutyczny w leczeniu wielu schorzeń, w tym również nowotworów. Dodatkowo związek mię-

dzy funkcją AMPK, promieniowaniem jonizującym oraz potencjalna rola tego enzymu w zwiększaniu wrażliwości komórek nowotworowych na IR może w przyszłości pomóc w usprawnieniu leczenia tą metodą chorych

z nowotworami. Kwestią dyskusyjną pozostaje wciąż jednak czy lepsza jest aktywacja AMPK, a jeśli tak, to kiedy i w jakich chorobach, czy może więcej korzyści przyniesie hamowanie jej aktywności.

PIŚMIENNICTWO

- [1] Bertrand L., Horman S., Beauloye C., Vanoverschelde J.L.: Insulin signalling in the heart. *Cardiovasc. Res.*, 2008; 79: 238-248
- [2] Bradley E.A., Eringa E.C., Stehouwer C.D., Korstjens I., van Nieuw Amerongen G.P., Musters R., Sipkema P., Clark M.G., Rattigan S.: Activation of AMP-activated protein kinase by 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1- β -D-ribofuranoside in the muscle microcirculation increases nitric oxide synthesis and microvascular perfusion. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2010; 30: 1137-1142
- [3] Buzzai M., Jones R.G., Amaravadi R.K., Lum J.J., De Berardinis R.J., Zhao F., Viollet B., Thompson C.B.: Systemic treatment with the antidiabetic drug metformin selectively impairs p53-deficient tumor cell growth. *Cancer Res.*, 2007; 67: 6745-6752
- [4] Cacicedo J.M., Yagihashi N., Keaney J.F.Jr., Ruderman N.B., Ido Y.: AMPK inhibits fatty acid-induced increases in NF- κ B transactivation in cultured human umbilical vein endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2004; 324: 1204-1209
- [5] Canman C.E., Lim D.S., Cimprich K.A., Taya Y., Tamai K., Sakaguchi K., Appella E., Kastan M.B., Siliciano J.D.: Activation of the ATM kinase by ionizing radiation and phosphorylation of p53. *Science*, 1998; 281: 1677-1679
- [6] Cheung P.C., Salt I.P., Davies S.P., Hardie D.G., Carling D.: Characterization of AMP-activated protein kinase gamma-subunit isoforms and their role in AMP binding. *Biochem. J.*, 2000; 346: 659-669
- [7] Chotechuang N., Azzout-Marniche D., Bos C., Chaumontet C., Gausseres N., Steiler T., Gaudichon C., Tome D.: mTOR, AMPK, and GCN2 coordinate the adaptation of hepatic energy metabolic pathways in response to protein intake in the rat. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 2009; 297: E1313-E1323
- [8] Cortez D., Wang Y., Qin J., Elledge S.J.: Requirement of ATM-dependent phosphorylation of BRCA1 in the DNA damage response to double-strand breaks. *Science*, 1999; 286: 1162-1166
- [9] Crute B.E., Seefeld K., Gamble J., Kemp B.E., Witters L.A.: Functional domains of the alpha1 catalytic subunit of the AMP-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.*, 1998; 273: 35347-35354
- [10] Davies S.P., Helps N.R., Cohen P.T., Hardie D.G.: 5'-AMP inhibits dephosphorylation, as well as promoting phosphorylation, of the AMP-activated protein kinase. Studies using bacterially expressed human protein phosphatase-2C alpha and native bovine protein phosphatase-2AC. *FEBS Lett.*, 1995; 377: 421-425
- [11] Fan X., Ding Y., Brown S., Zhou L., Shaw M., Vella M.C., Cheng H., McNay E.C., Sherwin R.S., McCrimmon R.J.: Hypothalamic AMP-activated protein kinase activation with AICAR amplifies counterregulatory responses to hypoglycemia in a rodent model of type 1 diabetes. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 2009; 296: R1702-R1708
- [12] Fogarty S., Hardie D.G.: Development of protein kinase activators: AMPK as a target in metabolic disorders and cancer. *Biochim. Biophys. Acta*, 2010; 1804: 581-591
- [13] Fujii N., Ho R.C., Manabe Y., Jessen N., Toyoda T., Holland W.L., Summers S.A., Hirshman M.F., Goodyear L.J.: Ablation of AMP-activated protein kinase α 2 activity exacerbates insulin resistance induced by high-fat feeding of mice. *Diabetes*, 2008; 57: 2958-2966
- [14] Gamble J., Lopaschuk G.D.: Insulin inhibition of 5' adenosine monophosphate-activated protein kinase in the heart results in activation of acetyl coenzyme A carboxylase and inhibition of fatty acid oxidation. *Metabolism*, 1997; 46: 1270-1274
- [15] Gleason C.E., Lu D., Witters L.A., Newgard C.B., Birnbaum M.J.: The role of AMPK and mTOR in nutrient sensing in pancreatic β -cells. *J. Biol. Chem.*, 2007; 282: 10341-10351
- [16] Guilherme A., Virbasius J.V., Puri V., Czech M.P.: Adipocyte dysfunction linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, 2008; 9: 367-377
- [17] Gwinn D.M., Shackelford D.B., Egan D.F., Mihaylova M.M., Mery A., Vazquez D.S., Turk B.E., Shaw R.J.: AMPK phosphorylation of rapTOR mediates a metabolic checkpoint. *Mol. Cell.*, 2008; 30: 214-226
- [18] Hardie D.G., Salt I.P., Hawley S.A., Davies S.P.: AMP-activated protein kinase: an ultrasensitive system for monitoring cellular energy charge. *Biochem. J.*, 1999; 338: 717-722
- [19] Horman S., Vertommen D., Heath R., Neumann D., Mouton V., Woods A., Schlattner U., Wallimann T., Carling D., Hue L., Rider M.H.: Insulin antagonizes ischemia-induced Thr172 phosphorylation of AMP-activated protein kinase alpha-subunits in heart via hierarchical phosphorylation of Ser485/491. *J. Biol. Chem.*, 2006; 281: 5335-5340
- [20] Jones R.G., Plas D.R., Kubek S., Buzzai M., Mu J., Xu Y., Birnbaum M.J., Thompson C.B.: AMP-activated protein kinase induces a p53-dependent metabolic checkpoint. *Mol. Cell.*, 2005; 18: 283-293
- [21] Itani S.I., Saha A.K., Kurowski T.G., Coffin H.R., Tornheim K., Ruderman N.B.: Glucose autoregulates its uptake in skeletal muscle: involvement of AMP-activated protein kinase. *Diabetes*, 2003; 52: 1635-1640
- [22] Kahn B.B., Alquier T., Carling D., Hardie D.G.: AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism. *Cell. Metab.*, 2005; 1: 15-25
- [23] Kato K., Ogura T., Kishimoto A., Minegishi Y., Nakajima N., Miyazaki M., Esumi H.: Critical roles of AMP-activated protein kinase in constitutive tolerance of cancer cells to nutrient deprivation and tumor formation. *Oncogene*, 2002; 21: 6082-6090
- [24] Kelly M., Gauthier M.S., Saha A.K., Ruderman N.B.: Activation of AMP-activated protein kinase by interleukin-6 in rat skeletal muscle: association with changes in cAMP, energy state, and endogenous fuel mobilization. *Diabetes*, 2009; 58: 1953-1960
- [25] Ko H.J., Zhang Z., Jung D.Y., Jun J.Y., Ma Z., Jones K.E., Chan S.Y., Kim J.K.: Nutrient stress activates inflammation and reduces glucose metabolism by suppressing AMP-activated protein kinase in the heart. *Diabetes*, 2009; 58: 2536-2546
- [26] Kovacic S., Soltys C.L., Barr A.J., Shiojima I., Walsh K., Dyck J.R.: Akt activity negatively regulates phosphorylation of AMP-activated protein kinase in the heart. *J. Biol. Chem.*, 2003; 278: 39422-39427
- [27] Kraegen E.W., Saha A.K., Preston E., Wilks D., Hoy A.J., Cooney G.J., Ruderman N.B.: Increased malonyl-CoA and diacylglycerol content and reduced AMPK activity accompany insulin resistance induced by glucose infusion in muscle and liver of rats. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 2006; 290: E471-E479
- [28] Laderoute K.R., Amin K., Calaoagan J.M., Knapp M., Le T., Orduna J., Foretz M., Viollet B.: 5'-AMP-activated protein kinase (AMPK) is induced by low-oxygen and glucose deprivation conditions found in solid-tumor microenvironments. *Mol. Cell. Biol.*, 2006; 26: 5336-5347
- [29] Lan F., Cacicedo J.M., Ruderman N., Ido Y.: SIRT1 modulation of the acetylation status, cytosolic localization and activity of LKB1;

possible role in AMP-activated protein kinase activation. *J. Biol. Chem.*, 2008; 283: 27628-27635

[30] Lessard S.J., Chen Z.P., Watt M.J., Hashem M., Reid J.J., Febbraio M.A., Kemp B.E., Hawley J.A.: Chronic rosiglitazone treatment restores AMPK α 2 activity in insulin-resistant rat skeletal muscle. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 2006; 290: E251-E257

[31] Li J., Zeng Z., Viollet B., Ronnett G.V., McCullough L.D.: Neuroprotective effects of adenosine monophosphate-activated protein kinase inhibition and gene deletion in stroke. *Stroke*, 2007; 38: 2992-2999

[32] Lim D.S., Kim S.T., Xu B., Maser R.S., Lin J., Petrini J.H., Kastan M.B.: ATM phosphorylates p95/nbs1 in an S-phase checkpoint pathway. *Nature*, 2000; 404: 613-617

[33] Lin Y.Y., Kiihl S., Suhail Y., Liu S.Y., Chou Y.H., Kuang Z., Lu J.Y., Khor C.N., Lin C.L., Bader J.S., Irizarry R., Boeke J.D.: Functional dissection of lysine deacetylases reveals that HDAC1 and p300 regulate AMPK. *Nature*, 2012; 482: 251-255

[34] Lizcano J.M., Goransson O., Toth R., Deak M., Morrice N.A., Boudeau J., Hawley S.A., Udd L., Makela T.P., Hardie D.G., Alessi D.R.: LKB1 is a master kinase that activates 13 kinases of the AMPK subfamily, including MARK/PAR-1. *EMBO J.*, 2004; 23: 833-843

[35] Lumeng C.N., Deyoung S.M., Saltiel A.R.: Macrophages block insulin action in adipocytes by altering expression of signaling and glucose transport proteins. *Am. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 2007; 292: E166-E174

[36] Martin M.J., Hayward R., Viros A., Marais R.: Metformin accelerates the growth of BRAFV600E-driven melanoma by upregulating VEGF-A. *Cancer Discov.*, 2012; 2: 344-355

[37] Martin T.L., Alquier T., Asakura K., Furukawa N., Preitner F., Kahn B.B.: Diet-induced obesity alters AMP kinase activity in hypothalamus and skeletal muscle. *J. Biol. Chem.*, 2006; 281: 18933-18941

[38] McCullough L.D., Zeng Z., Li H., Landree L.E., McFadden J., Ronnett G.V.: Pharmacological inhibition of AMP-activated protein kinase provides neuroprotection in stroke. *J. Biol. Chem.*, 2005; 280: 20493-20502

[39] Niehr F., von Euw E., Attar N., Guo D., Matsunaga D., Sazegar H., Ng C., Glaspy J.A., Recio J.A., Lo R.S., Mischel P.S., Comin-Anduix B., Ribas A.: Combination therapy with vemurafenib (PLX4032/RG7204) and metformin in melanoma cell lines with distinct driver mutations. *J. Transl. Med.*, 2011; 9: 76

[40] Nieto-Vazquez I., Fernandez-Veledo S., de Alvaro C., Lorenzo M.: Dual role of interleukin-6 in regulating insulin sensitivity in murine skeletal muscle. *Diabetes*, 2008; 57: 3211-3221

[41] Oakhill J.S., Steel R., Chen Z.P., Scott J.W., Ling N., Tam S., Kemp B.E.: AMPK is a direct adenylate charge-regulated protein kinase. *Science*, 2011; 332: 1433-1435

[42] Osuka K., Watanabe Y., Usuda N., Atsuzawa K., Yoshida J., Takayasu M.: Modification of endothelial nitric oxide synthase through AMPK after experimental subarachnoid hemorrhage. *J. Neurotrauma*, 2009; 26: 1157-1165

[43] Qi J., Gong J., Zhao T., Zhao J., Lam P., Ye J., Li J.Z., Wu J., Zhou H.M., Li P.: Downregulation of AMP-activated protein kinase by Cidea-mediated ubiquitination and degradation in brown adipose tissue. *EMBO J.*, 2008; 27: 1537-1548

[44] Randle P.J., Garland P.B., Hales C.N., Newsholme E.A.: The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. *Lancet*, 1963; 1: 785-789

[45] Riek U., Scholz R., Konarev P., Rufer A., Suter M., Nazabal A., Ringler P., Chami M., Muller S.A., Neumann D., Forstner M., Hennig M., Zenobi R., Engel A., Svergun D., Schlattner U., Wallimann T.: Structural properties of AMP-activated protein kinase: dimerization, molecular shape, and changes upon ligand binding. *J. Biol. Chem.*, 2008; 283: 18331-18343

[46] Ropelle E.R., Pauli J.R., Fernandes M.F., Rocco S.A., Marin R.M., Morari J., Souza K.K., Dias M.M., Gomes-Marcondes M.C., Gontijo J.A., Franchini K.G., Velloso L.A., Saad M.J., Carnevali J.B.: A central role for neuronal AMP-activated protein kinase (AMPK) and mammalian target of rapamycin (mTOR) in high-protein diet-induced weight loss. *Diabetes*, 2008; 57: 594-605

[47] Ruderman N., Prentki M.: AMP kinase and malonyl-CoA: targets for therapy of the metabolic syndrome. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2004; 3: 340-351

[48] Sag D., Carling D., Stout R.D., Suttles J.: Adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase promotes macrophage polarization to an anti-inflammatory functional phenotype. *J. Immunol.*, 2008; 181: 8633-8641

[49] Sakamoto K., Goransson O., Hardie D.G., Alessi D.R.: Activity of LKB1 and AMPK-related kinases in skeletal muscle: effects of contraction, phenformin, and AICAR. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 2004; 287: E310-E317

[50] Sanli T., Linher-Melville K., Tsakiridis T., Singh G.: Sestrin2 modulates AMPK subunit expression and its response to ionizing radiation in breast cancer cells. *PLoS One*, 2012; 7: e32035

[51] Sanli T., Rashid A., Liu C., Harding S., Bristow R.G., Cutz J.C., Singh G., Wright J., Tsakiridis T.: Ionizing radiation activates AMP-activated kinase (AMPK): a target for radiosensitization of human cancer cells. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 2010; 78: 221-229

[52] Schenk S., Saberi M., Olefsky J.M.: Insulin sensitivity: modulation by nutrients and inflammation. *J. Clin. Invest.*, 2008; 118: 2992-3002

[53] Shi H., Kokoeva M.V., Inouye K., Tzameli I., Yin H., Flier J.S.: TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. *J. Clin. Invest.*, 2006; 116: 3015-3025

[54] Shi H., Tzameli I., Bjorbaek C., Flier J.S.: Suppressor of cytokine signaling 3 is a physiological regulator of adipocyte insulin signaling. *J. Biol. Chem.*, 2004; 279: 34733-34740

[55] Song C.W., Lee H., Dings R.P., Williams B., Powers J., Santos T.D., Choi B.H., Park H.J.: Metformin kills and radiosensitizes cancer cells and preferentially kills cancer stem cells. *Sci. Rep.*, 2012; 2: 362

[56] Stahmann N., Woods A., Spengler K., Heslegrave A., Bauer R., Krause S., Viollet B., Carling D., Heller R.: Activation of AMP-activated protein kinase by vascular endothelial growth factor mediates endothelial angiogenesis independently of nitric-oxide synthase. *J. Biol. Chem.*, 2010; 285: 10638-10652

[57] Steinberg G.R., Michell B.J., van Denderen B.J., Watt M.J., Carey A.L., Fam B.C., Andrikopoulos S., Proietto J., Gorgun C.Z., Carling D., Hotamisligil G.S., Febbraio M.A., Kay T.W., Kemp B.E.: Tumor necrosis factor α -induced skeletal muscle insulin resistance involves suppression of AMP-kinase signaling. *Cell Metab.*, 2006; 4: 465-474

[58] Sun Y., Connors K.E., Yang D.Q.: AICAR induces phosphorylation of AMPK in an ATM-dependent, LKB1-independent manner. *Mol. Cell. Biochem.*, 2007; 306: 239-245

[59] Suter M., Riek U., Tuerk R., Schlattner U., Wallimann T., Neumann D.: Dissecting the role of 5'-AMP for allosteric stimulation, activation, and deactivation of AMP-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.*, 2006; 281: 32207-32216

[60] Vander Heiden M.G., Cantley L.C., Thompson C.B.: Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science*, 2009; 324: 1029-1033

[61] Viollet B., Foretz M., Guigas B., Horman S., Dentin R., Bertrand L., Hue L., Andreelli F.: Activation of AMP-activated protein kinase in the liver: a new strategy for the management of metabolic hepatic disorders. *J. Physiol.*, 2006; 574: 41-53

[62] Williams T., Brenman J.E.: LKB1 and AMPK in cell polarity and division. *Trends Cell Biol.*, 2008; 18: 193-198

[63] Wojtaszewski J.F., Jorgensen S.B., Hellsten Y., Hardie D.G., Richter E.A.: Glycogen-dependent effects of 5-aminoimidazole-4-car-

boxamide (AICA)-riboside on AMP-activated protein kinase and glycogen synthase activities in rat skeletal muscle. *Diabetes*, 2002; 51: 284-292

[64] Woods A., Dickerson K., Heath R., Hong S.P., Momcilovic M., Johnstone S.R., Carlson M., Carling D.: Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta acts upstream of AMP-activated protein kinase in mammalian cells. *Cell Metab.*, 2005; 2: 21-33

[65] Woods A., Munday M.R., Scott J., Yang X., Carlson M., Carling D.: Yeast SNF1 is functionally related to mammalian AMP-activated protein kinase and regulates acetyl-CoA carboxylase in vivo. *J. Biol. Chem.*, 1994; 269: 19509-19515

[66] Xiao B., Heath R., Saiu P., Leiper F.C., Leone P., Jing C., Walker P.A., Haire L., Eccleston J.F., Davis C.T., Martin S.R., Carling D., Gamblin S.J.: Structural basis for AMP binding to mammalian AMP-activated protein kinase. *Nature*, 2007; 449: 496-500

[67] Xiao B., Sanders M.J., Underwood E., Heath R., Mayer F.V., Carmena D., Jing C., Walker P.A., Eccleston J.F., Haire L.F., Saiu P., Howell S.A., Aasland R., Martin S.R., Carling D., Gamblin S.J.: Structure of mammalian AMPK and its regulation by ADP. *Nature*, 2011; 472: 230-233

[68] Xie M., Zhang D., Dyck J.R., Li Y., Zhang H., Morishima M., Mann D.L., Taffet G.E., Baldini A., Khoury D.S., Schneider M.D.: A pivotal role for endogenous TGF-beta-activated kinase-1 in the LKB1/AMP-activated protein kinase energy-sensor pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2006; 103: 17378-17383

[69] Yamada E., Pessin J.E., Kurland I.J., Schwartz G.J., Bastie C.C.: Fyn-dependent regulation of energy expenditure and body weight is mediated by tyrosine phosphorylation of LKB1. *Cell Metab.*, 2010; 11: 113-124

[70] Zannella V.E., Cojocari D., Hilgendorf S., Vellanki R.N., Chung S., Wouters B.G., Koritzinsky M.: AMPK regulates metabolism and survival in response to ionizing radiation. *Radiother. Oncol.*, 2011; 99: 293-299

[71] Zheng B., Jeong J.H., Asara J.M., Yuan Y.Y., Granter S.R., Chin L., Cantley L.C.: Oncogenic B-Raf negatively regulates the tumor suppressor LKB1 to promote melanoma cell proliferation. *Mol. Cell*, 2009; 275: 237-247

[72] Zhou B.B., Chaturvedi P., Spring K., Scott S.P., Johanson R.A., Mishra R., Mattern M.R., Winkler J.D., Khanna K.K.: Caffeine abolishes the mammalian G(2)/M DNA damage checkpoint by inhibiting ataxia-telangiectasia-mutated kinase activity. *J. Biol. Chem.*, 2000; 275: 10342-10348

[73] Zou M.H., Wu Y.: AMP-activated protein kinase activation as a strategy for protecting vascular endothelial function. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 2008; 35: 535-545

Autorzy deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.