

ДЕФОСФОРИЛИРОВАНИЕ АМФ-АКТИВИРУЕМОЙ ПРОТЕИНКИНАЗЫ В ПОСТУРАЛЬНОЙ МЫШЦЕ – КЛЮЧЕВОЕ СИГНАЛЬНОЕ СОБЫТИЕ ПЕРВЫХ СУТОК ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ РАЗГРУЗКИ

© 2016 г. Н.А. Вильчинская, Е.П. Мочалова, С.П.Белова, Б.С. Шенкман

ГНЦ РФ Институт медико-биологических проблем РАН, 123007, Москва, Хорошевское шоссе, 76а

E-mail: Vilchinskaya2008@rambler.ru

Поступила в редакцию 27.06.16 г.

Для анализа сигнальных эффектов дефосфорилирования АМФ-активируемой протеинкиназы был применен ее активатор 5-аминоимдазол-4-карбоксамид рибофуранозид (аналог АМФ). Было обнаружено, что активация этой киназы предотвращает повышение содержания фосфорилированной формы ключевой рибосомальной киназы р70S6K после 24 часов гравитационной разгрузки. Также было показано, что воздействие данным активатором предотвращает снижение экспрессии и предшественника и зрелой мРНК медленной формы и мРНК изоформы ПА тяжелых цепей миозина в *m. soleus* крысы после кратковременного воздействия гравитационной разгрузки. Этот факт указывает на снижение фосфорилирования АМФ-активируемой протеинкиназы при разгрузке как на важный фактор снижения экспрессии медленного миозина и миозина ПА.

Ключевые слова: АМФ-активируемая протеинкиназа, тяжелые цепи миозина, АICAR, функциональная разгрузка, *m. soleus*.

В ряду основных событий, характерных для различных форм инактивации скелетных мышц, обычно называют развитие мышечной атрофии (т.е. потери мышечной преимущественно белковой массы) и изменения миозинового фенотипа (т.е. увеличение экспрессии быстрых и уменьшение экспрессии медленных изоформ тяжелых цепей миозина (ТЦМ)). В последние годы было показано, что запуск сигнальных систем, контролирующих развитие этих процессов, происходит на очень ранних стадиях разгрузки. Так, уже после 24 ч разгрузки задних конечностей крысы (при использовании модели антиортостатического вывешивания) в *m. soleus* наблюдается достоверное снижение экспрессии предшественника мРНК медленной изоформы тяжелых цепей миозина – пре-мРНК ТЦМ I [1]. Уже после 6–12 ч разгрузки наблюдается снижение электрогенной активности $\alpha 2$ субъединицы Na,K-АТФазы сарколеммы *m. soleus* крысы [2]. В течение первых суток разгрузки отмечается парадоксальное увеличение содержания фосфорилированной формы ключевой рибосомальной киназы р70S6K [3]. В экспери-

менте с участием человека (с использованием модели «сухой» иммерсии) после трех суток разгрузки наряду со снижением содержания фосфорилированной формы нейрональной NO-синтазы (nNOS) наблюдалось также значительное (до 60%) снижение содержания фосфорилированной формы АМФ-активируемой протеинкиназы (АМПК) [4]. Сколько-нибудь целостное представление о возможных механизмах описанных феноменов в литературе пока отсутствует. При этом последнее наблюдение, касающееся драматического дефосфорилирования АМПК, на наш взгляд, требует отдельного тщательного анализа.

Центральная молекула энергетического сигналинга АМФ-активируемая протеинкиназа не только контролирует инсулиннезависимый транспорт глюкозы, транспорт жирных кислот и экспрессию ферментов энергетического метаболизма, но и активно участвует в белковом обмене, активируя экспрессию протеолитических ферментов и подавляя активность ключевых анаболических регуляторов [5]. Поскольку на ранних этапах разгрузки наряду со снижением содержания фосфорилированной АМПК наблюдали парадоксальное увеличение содержания фосфорилированной рибосомальной киназы р70S6K [3], то естественно предположить

Сокращения: ТЦМ – тяжелые цепи миозина, АМПК – АМФ-активируемая протеинкиназа, АICAR – 5-аминоимдазол-4-карбоксамид рибофуранозид.

взаимосвязь этих феноменов. Интенсивность супрессии фосфорилирования mTOR-зависимой рибосомальной киназы со стороны АМПК должна быть существенно меньше при снижении содержания фосфорилированной формы АМПК, что вполне может привести к увеличению активности p70S6K.

Основным фактором, обуславливающим фосфорилирование и соответственно активность АМПК, является соотношение фосфорилированных и нефосфорилированных макроэргических фосфатов. Так, АМФ стимулирует активность этой молекулы, а АТФ, АДФ и креатинфосфат – ингибируют ее. О роли соотношения макроэргических фосфатов в регуляции сигнальных процессов в мышечном волокне в условиях разгрузки можно судить лишь в том случае, если на том или ином этапе процесса наблюдается достоверное изменение этого соотношения. Действительно, было обнаружено, что после 10-суточного вывешивания крыс наблюдается достоверное повышение уровня креатинфосфата в m. soleus [6]. Также эти же исследователи показали, что снижение уровня фосфорилированных макроэргических фосфатов, достигаемое введением животному β-гуанидинпропионовой кислоты, предотвращает трансформацию миозинового фенотипа в быструю сторону у вывешенных животных [7]. Известно, что хроническое действие β-гуанидинпропионовой кислоты реализуется через АМПК-зависимые сигнальные механизмы [8]. Предполагается, что основным механизмом влияния АМПК на экспрессию генов является фосфорилирование/дефосфорилирование молекул гистондеацетилаз, поэтому можно допустить, что их действие (деацетилирование гистона H3 и транскрипционного фактора MEF2) должно проявляться в условиях моделируемой гравитационной разгрузки. Действительно, было показано, что при вывешивании крыс наблюдается повышенное ацетилирование гистона H3 в локусе генов «быстрых» изоформ миозина [9]. Совсем недавно было обнаружено, что при действии классического ингибитора гистондеацетилаз на фоне вывешивания крыс в m. soleus не происходит трансформация волокон медленного типа в быстрые волокна [10]. Поэтому снижение фосфорилирования АМПК может быть одним из пусковых механизмов, приводящих к снижению экспрессии медленной изоформы ТЦМ.

Для проверки высказанных гипотез необходимо исключить снижение содержания фосфорилированной формы АМПК в течение 24-часовой разгрузки. Для этого естественно использовать специфический стимулятор активности

этого фермента – 5-аминоимидазол-4-карбоксамид рибофуранозид (AICAR). В силу особенностей стимулирования АМПК в m. soleus [11] мы применили метод предобработки животных инъекциями AICAR. Если высказанные гипотезы верны, то в группе животных, предобработанных AICAR, после 24-часового антиортостатического вывешивания следовало ожидать отсутствие снижения фосфорилирования АМПК, отсутствие парадоксального гиперфосфорилирования p70S6K и отсутствие снижения экспрессии пре-мРНК ТЦМ I. Результаты экспериментов полностью подтвердили наши предположения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

24-часовое антиортостатическое вывешивание на фоне предварительного введения AICAR. В качестве модели гравитационной разгрузки использовали метод антиортостатического вывешивания по Новикову–Ильину в модификации Мори–Холтон [12]. Для изучения роли АМПК в контроле экспрессии генов медленной изоформы тяжелых цепей миозина на начальном этапе гравитационной разгрузки использовали AICAR, специфический активатор АМПК. Для проведения этого эксперимента 32 самца крыс линии Вистар массой 180–200 г были случайным образом разделены на четыре группы по восемь крыс в каждой: интактный контроль (С), контроль + AICAR (СА), вывешивание в течение 24 ч (НС) и вывешивание в течение 24 ч + AICAR (НСА). Животные в экспериментальных группах с использованием AICAR получали препарат путем внутрибрюшинных инъекций в дозе 400 мг/кг массы тела в течение семи дней, животные других экспериментальных групп получали внутрибрюшинные инъекции физиологического раствора. Животных из группы контроля содержали в клетке все время эксперимента. После проведения эксперимента у каждого животного под авертиновым наркозом (10 мл/кг) из обеих ног была выделена камбаловидная мышца m. soleus. Все процедуры с животными были одобрены Комиссией по биомедицинской этике ГНЦ РФ–ИМБП РАН.

Гель-электрофорез и иммуноблоттинг для определения содержания фосфорилированной АМПК, тотальной и фосфорилированной p70S6K. Методом Вестерн-блоттинга определяли содержание тотальной и фосфорилированной p70S6K, а также фосфорилированной АМПК. Для этого проводили выделение белка из мышечной ткани m. soleus крысы с помощью набора реагентов для выделения ядерной и ци-

Таблица 1. Характеристики праймеров

Название гена	Последовательность (5' → 3')
β-актин	5'-TCATGAAGTGTGACGTTGACATCC-3' 5'-GTA AACGCAGCTCAGTAACAGTC-3'
GAPDH	5'-ACGGCAAGTTCAACGGCACAGTCAA-3' 5'-GCTTCCAGAGGGGCCATCCACA-3'
ТЦМ I типа	5'-ACAGAGGAAGACAGGAAGAACCTAC-3' 5'-GGGCTTCACAGGCATCCTTAG-3'
ТЦМ IIА типа	5'-TATCCTCAGGCTTCAAGATTTG-3' 5'-TAAATAGAATCACATGGGGACA-3'
ТЦМ IIВ типа	5'-CTGAGGAACAATCCAACGTC-3' 5'-TTGTGTGATTTCTTCTGTACACCT-3'
ТЦМ IIд/х типа	5'-CGCGAGGTTACACCAAA-3' 5'-ACCCAAAGTCGTAAGTACAAAATGG-3'
Предшественник ТЦМ I типа	5'-ACTTAGCAGGCAAATCTCAGTAGC-3' 5'-CTCGCGTTATGTTTCTCATCCGAAT-3'

топлазматической фракции белков NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction (Thermo Scientific, США). Электрофорез был проведен в 10%-м полиакриламидном геле. Образцы каждой группы загружались на один гель с контрольными образцами. Электрофорез проводили при токе 17 мА на 1 гель в мини-системе (Bio-Rad Laboratories, США) при комнатной температуре. Электроперенос белков проводили на нитроцеллюлозную мембрану при напряжении 100 В и температуре 4°C в течение 120 мин в системе mini Trans-Blot (Bio-Rad Laboratories, США). После электропереноса нитроцеллюлозные мембраны блокировали в 5%-м растворе сухого молока (Bio-Rad Laboratories, США) в фосфатно-солевом буфере, содержащем 0,1% твин 20, в течение 1 ч при комнатной температуре. Для определения белковых полос использовали первичные поликлональные антитела против рАМРК в разведении 1:500; первичные поликлональные антитела против phospho-p70S6K в разведении 1:1000; первичные поликлональные антитела против тотальной p70S6K в разведении 1:1000; вторичные антитела goat anti-rabbit, конъюгированные с пероксидазой хрена, в разведении 1:4000 (все антитела – производства Santa Cruz, США). Инкубацию блоттов с первичными антителами проводили в течение ночи при 4°C, со вторичными – 1 ч при комнатной температуре. Выявление белковых полос проводили с помощью набора ImmunStar Substrate Kit (BioRad Laboratories, США). Анализ белковых полос проводили с использованием C-DiGit Blot Scanner (LI-COR Biotechnology, США). Оптическая плотность белковых полос была нормализована

к референсному белку GAPDH. Статистическую обработку данных вестерн-блота производили с помощью программы Image Studio Digits Ver4.0. На гистограммах содержание анализируемого белка в контроле было принято за 100%. Так как нельзя утверждать, что выборка является нормально распределенной, для сравнения вывешенной группы был использован непараметрический критерий Крускала–Уоллиса. Результаты приведены в виде максимума, минимума, медианы и интерквартильной ширины (0,25–0,75).

Полимеразная цепная реакция в реальном времени. Для анализа экспрессии генов методом ПЦР в реальном времени определяли уровень предшественника и зрелой мРНК ТЦМ I, уровень мРНК ТЦМ IIА, ТЦМ IIд/х, ТЦМ IIВ. Характеристики используемых праймеров представлены в табл. 1. Тотальную РНК выделяли из 8 мг *m. soleus* при помощи RNeasy Micro Kit (QIAGEN, Германия). Все образцы РНК были обработаны протеиназой К и ДНКазой I. Для обратной транскрипции использовали водный раствор 0,5 мкг РНК, олиго(dT)15, гексануклеотиды d(N)6, обратную транскриптазу MMLV. Обратную транскрипцию проводили при 37°C в течение 60 мин согласно стандартному протоколу. Полученные образцы кДНК хранили при –84°C для проведения ОТ-ПЦР в реальном времени с использованием интеркалирующего красителя SYBR Green I. Для анализа данных, полученных с помощью ОТ-ПЦР, использовали программу REST (Relative expression software tool) 2009 v. 2.0.12 (QIAGEN, Германия), основные алгоритмы которой изложены в работе [13]. В качестве референсных генов с

Таблица 2. Масса животных и камбаловидной мышцы

Группа	Масса крысы, г	Масса m. soleus, г
Контроль + физиологический раствор	254,11 ± 5,73	0,104 ± 0,003
Контроль + AICAR	266,71 ± 5,97	0,107 ± 0,003
HS + физиологический раствор	259,23 ± 3,49	0,110 ± 0,003
HS + AICAR	253,09 ± 3,71	0,110 ± 0,005

помощью базы EST Database были выбраны RPL19 и циклофиллин А, а также использованы β-актин и GAPDH. Результаты нормализации в целом были схожие. Результаты представлены в виде медиан и интерквартильных разбросов.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В данной работе мы проанализировали уровень содержания ряда сигнальных анаболических маркеров, а также уровень экспрессии мРНК различных изоформ ТЦМ в m. soleus крысы после моделируемой 24-часовой гравитационной разгрузки на фоне введения активатора АМПК – AICAR.

Масса животных и камбаловидной мышцы во всех экспериментальных группах не отличалась от уровня контроля после 24-часового антиортостатического вывешивания (табл. 2).

После предобработки интактных животных инъекциями AICAR достоверных отличий от контрольной группы обнаружено не было (рис. 1). В группе вывешивания с плацебо наблюдалось достоверное снижение содержания фосфорилированной АМПК на 49% от уровня контрольной группы. При предобработке вывешенных животных инъекциями AICAR отличий от контрольной группы выявлено не было. Вместе с тем было обнаружено достоверное увеличение содержания фосфорилированной АМПК в группе вывешенных животных с предобработкой инъекциями AICAR относительно группы вывешенных животных с плацебо (рис. 1).

Предобработка контрольных животных инъекциями AICAR приводила к снижению содержания фосфорилированной p70S6K на 18% относительно группы контроля (рис. 2а). В группе вывешивания с плацебо наблюдалось достоверное увеличение содержания фосфорилированной p70S6K – на 56% от уровня контрольной группы. При предобработке вывешенных животных инъекциями AICAR содержание фосфорилированной p70S6K не отличалось от уровня контрольной группы. Также отмечалось достоверное снижение содержания фосфорилированной p70S6K в группе вывешивания с пре-

добработкой инъекциями AICAR относительно группы вывешивания с плацебо (рис. 2а). Содержание тотальной p70S6K во всех экспериментальных группах не отличалось от уровня контроля (рис. 2б).

При предобработке интактных животных инъекциями AICAR содержание предшественника мРНК ТЦМ I не отличалось от уровня контрольной группы (рис. 3). В группе вывешивания с плацебо наблюдалось достоверное снижение содержания предшественника мРНК ТЦМ I – в 1,3 раза по сравнению с контрольной группой. При предобработке группы вывешенных животных инъекциями AICAR отличий от контрольной группы выявлено не было. Так же была обнаружена тенденция увеличения содержания предшественника мРНК ТЦМ I в группе вывешенных животных с предобработкой инъекциями AICAR относительно группы вывешенных животных с плацебо (рис. 3).

После предобработки контрольных животных инъекциями AICAR было обнаружено достоверное увеличение содержания зрелой мРНК ТЦМ I – в 1,4 раза относительно группы кон-

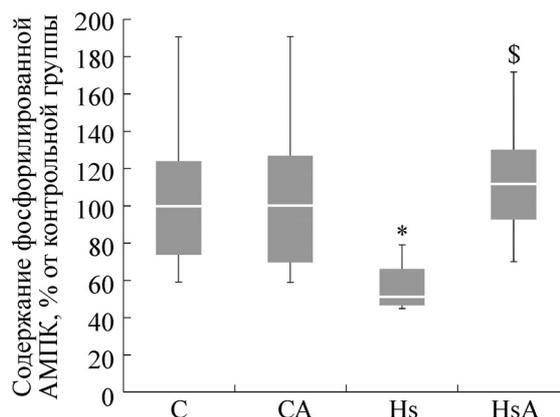


Рис. 1. Содержание фосфорилированной АМПК в m. soleus крысы после 24-часовой моделируемой гравитационной разгрузки на фоне введения AICAR. Обозначения (здесь и на следующих рисунках): С – контроль, СА – контроль + AICAR, HS – вывешивание 24 ч, HsA – вывешивание в течение 24 ч + AICAR; * – достоверное отличие от группы «С»; ** – достоверное отличие от группы «HS» ($p < 0,05$).

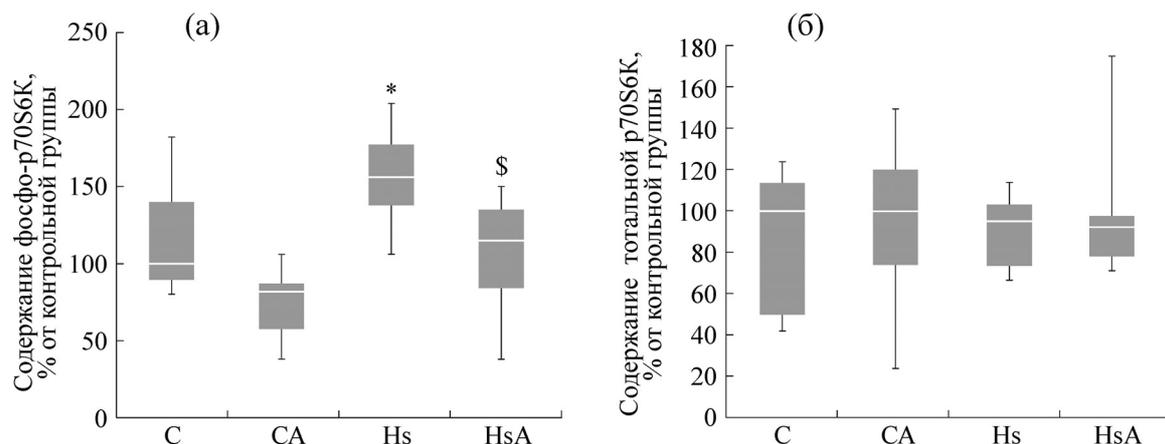


Рис. 2. Содержание фосфорилированной p70S6K (А) и totalной p70S6K (Б) в *m. soleus* крысы после 24-часовой моделируемой гравитационной разгрузки на фоне введения АICAR.

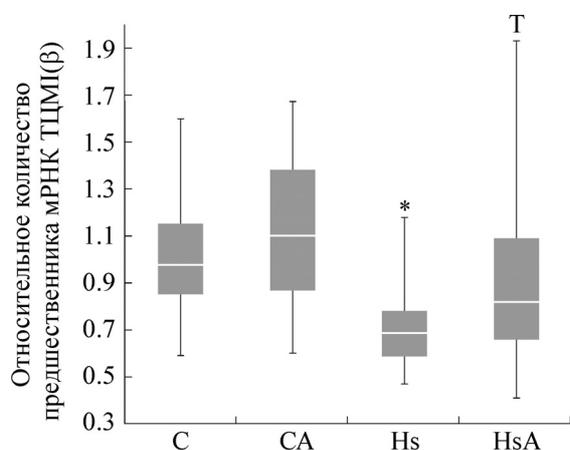


Рис. 3. Относительное количество предшественника мРНК ТЦМ I в *m. soleus* крысы после 24-часовой моделируемой гравитационной разгрузки на фоне введения АICAR. Т – тенденция.

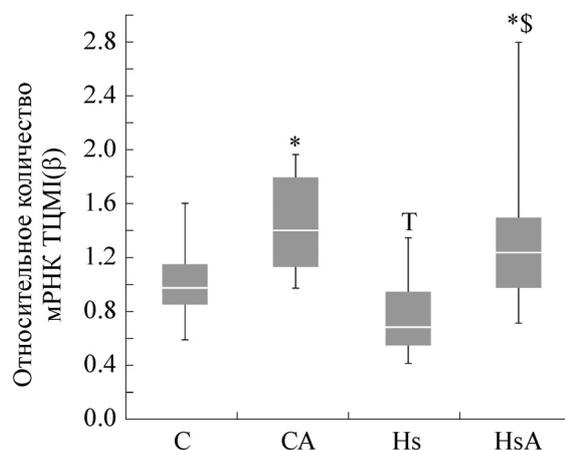


Рис. 4. Относительное количество мРНК ТЦМ I в *m. soleus* крысы после 24-часовой моделируемой гравитационной разгрузки на фоне введения АICAR. Т – тенденция.

троля (рис. 4). В группе вывешивания с плацебо прослеживалась тенденция к снижению содержания зрелой мРНК ТЦМ I по сравнению с контрольным уровнем. При предобработке группы вывешенных животных инъекциями АICAR отмечалось достоверное увеличение содержания мРНК ТЦМ I в 1,2 раза по сравнению с контрольной группой. Также наблюдалось достоверное увеличение количества зрелой мРНК ТЦМ I в группе вывешенных животных с предобработкой инъекциями АICAR относительно группы вывешенных животных с плацебо (рис. 4).

После предобработки интактных животных инъекциями АICAR отличий содержания мРНК ТЦМ IА от контрольной группы обнаружено не было (рис. 5). При этом в группе вывешивания с плацебо наблюдалось достоверное сни-

жение содержания мРНК ТЦМ IА в 1,4 раза по сравнению с контрольной группой. При предобработке вывешенных животных инъекциями АICAR содержание мРНК ТЦМ IА не отличалось от контрольной группы (рис. 5).

Предобработка контрольных животных инъекциями АICAR приводила к увеличению содержания мРНК ТЦМ IВ в 1,9 раз относительно группы контроля (рис. 6). В группе вывешивания с плацебо содержание мРНК ТЦМ IВ не отличалось от уровня контрольной группы. При предобработке вывешенных животных инъекциями АICAR было обнаружено достоверное увеличение содержания мРНК ТЦМ IВ в 2,3 раза по сравнению с контрольной группой. Также отмечалось достоверное увеличение содержания мРНК ТЦМ IВ в группе вывешенных животных с предобработкой инъ-

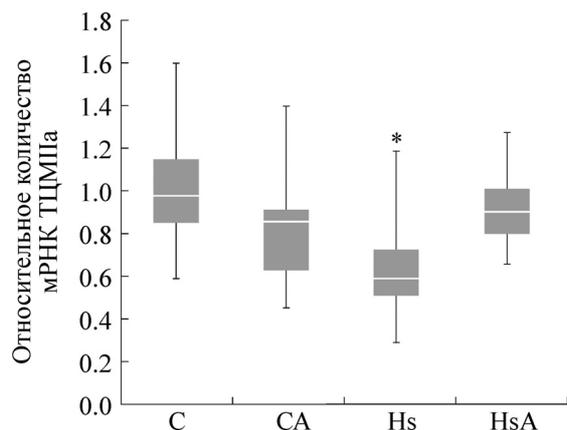


Рис. 5. Относительное количество мРНК ТЦМ ПА в *m. soleus* крысы после 24-часовой моделируемой гравитационной разгрузки на фоне введения АICAR.

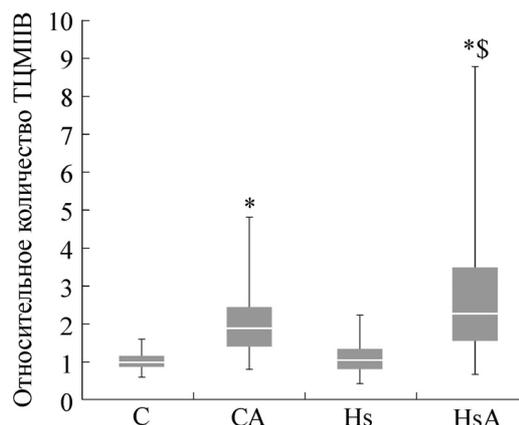


Рис. 6. Относительное количество мРНК ТЦМ ПВ в *m. soleus* крысы после 24-часовой моделируемой гравитационной разгрузки на фоне введения АICAR.

екциями АICAR относительно группы вывешенных животных с плацебо (рис. 6).

При предобработке интактных животных инъекциями АICAR содержание мРНК ТЦМ IId/x не отличалось от уровня контрольной группы (рис. 7). В группе вывешивания с плацебо наблюдалось достоверное увеличение содержания мРНК ТЦМ IId/x в 2,4 раза по сравнению с контрольной группой. При предобработке вывешенных животных инъекциями АICAR было обнаружено увеличение содержания мРНК ТЦМ IId/x в 3,8 раза относительно контроля. Увеличение содержания мРНК ТЦМ IId/x наблюдалось в обеих вывешенных группах, причем в группе вывешивания с предобработкой инъекциями АICAR содержание мРНК ТЦМ IId/x значительно выше (рис. 7).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Настоящее исследование было направлено на анализ сигнальных событий, разворачивающихся в постуральной мышце животного на самом раннем этапе гравитационной разгрузки, обусловленной устранением механической опоры для задних конечностей. Мы проанализировали состояние одной из ключевых сигнальных молекул – АМФ-активируемой протеинкиназы, регулирующей основные реакции энергетического метаболизма мышечного волокна и оказывающей существенное влияние на регуляцию синтеза и деградации белка. Мы также выявили некоторые сигнальные последствия изменения состояния АМПК в первые сутки гравитационной разгрузки, касающиеся изменений экспрессии медленных и быстрых изоформ тяжелых цепей миозина и степени фосфорилирования ключевой рибосомальной киназы

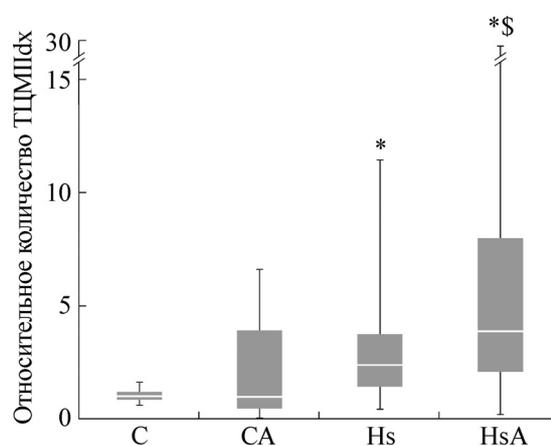


Рис. 7. Относительное количество мРНК ТЦМ II d/x в *m. soleus* крысы после 24-часовой моделируемой гравитационной разгрузки на фоне введения АICAR.

р70S6K. До недавнего времени вопрос об изменении фосфорилирования АМПК в камбаловидной мышце в условиях гравитационной разгрузки оставался спорным. Данные двух исследований, выполненных на модели 14-суточного вывешивания крыс, с очевидностью противоречили друг другу [14,15]. Нами было установлено, что в камбаловидной мышце человека после трех суток экспозиции в условиях безопорности («сухая» иммерсия) содержание фосфорилированной формы АМПК существенно снижалось [4]. В настоящем исследовании аналогичный феномен был обнаружен в *m. soleus* крысы после 24-часовой экспозиции в условиях антиортостатического вывешивания. Известен ряд факторов, влияющих на фосфорилирование АМПК, среди которых важнейшим является соотношение фосфорилированных и дефосфорилированных макроэргических

фосфатов. Можно предположить, что прекращение сократительной активности *m. soleus* при устранении опоры [16] обуславливает быстрое накопление фосфорилированных макроэргов (АТФ, АДФ и креатинфосфата). Это накопление может объяснить обнаруженное нами снижение степени фосфорилирования АМПК.

Для анализа сигнальных последствий дефосфорилирования АМПК применили активатор АМПК АICAR (аналог АМФ), интенсифицирующий фосфорилирование молекулы по сайту Thr172. Предобработка животных инъекциями АICAR в течение семи суток перед вывешиванием позволила предотвратить ее дефосфорилирование после 24-часового вывешивания.

Ранее нами было обнаружено парадоксальное повышение содержания фосфорилированной формы ключевой рибосомальной киназы p70S6K [3] в течение первых суток гравитационной разгрузки. Аналогичное гиперфосфорилирование p70S6K было выявлено и при гипсовой иммобилизации *m. soleus* [17]. Хорошо известно, что АМПК (особенно ее изоформа $\alpha 1$) эффективно ингибирует фосфорилирование mTOR-зависимых сигнальных молекул. Поэтому можно предположить, что гиперфосфорилирование p70S6K в течение первых суток разгрузки обусловлено дефосфорилированием (т.е. инактивацией) АМПК. Если исходить из результатов настоящей работы, то это предположение вполне подтверждается. Действительно, активация АМПК приводит к отсутствию изменений содержания фосфорилированной формы p70S6K после 24-часовой гравитационной разгрузки. Таким образом, очевидно, что ослабление суппрессии mTOR-зависимого сигнального пути со стороны АМПК могло привести к значительной активации p70S6K.

Известно, что АМПК фосфорилирует гистондеацетилазы HDAC4 и 5, что существенно облегчает экспрессию «медленной» изоформы ТЦМ и ряда генов, контролирующих регуляторные белки окислительного метаболизма [18,19]. Кроме того, АМПК является одним из важнейших регуляторов, обуславливающих фосфорилирование (и соответственно активацию) нейрональной синтазы оксида азота [20,21]. Снижение продукции оксида азота в результате дефосфорилирования АМПК может привести к активации GSK3 β и в конечном итоге к снижению экспрессии «медленной» изоформы ТЦМ [22]. Таким образом, снижение фосфорилирования АМПК может сказаться и на системе регуляции экспрессии «медленной» изоформы ТЦМ. Действительно, мы обнаружили достоверное снижение содержания предшественника мРНК ТЦМ I и хорошо выра-

женную тенденцию к снижению содержания зрелой мРНК ТЦМ I после 24-часовой экспозиции в условиях разгрузки (рис. 3, 4). Эти данные хорошо согласуются с аналогичными результатами, полученными в аналогичных условиях, на крысах линии Sprague-Dawley [1]. Интересно, что достоверное и глубокое снижение содержания после 24-часовой разгрузки демонстрирует и мРНК ТЦМ IIА. Ранее нами было показано достоверное и значительное снижение экспрессии мРНК ТЦМ IIА после трех суток моделируемой гравитационной разгрузки [23]. В настоящем исследовании вполне подтверждается сходство характера экспрессии мРНК ТЦМ I и мРНК ТЦМ IIА при коротких сроках экспозиции.

Результаты, полученные после 24-часовой разгрузки на животных, предобработанных инъекциями АICAR, свидетельствуют о том, что увеличение фосфорилирования АМПК способствует поддержанию экспрессии как предшественника, так и зрелой мРНК ТЦМ I и мРНК ТЦМ IIА. Этот факт указывает на то, что снижение экспрессии этих изоформ тяжелых цепей миозина уже в течение первых суток разгрузки может быть обусловлено дефосфорилированием АМПК.

Что касается мРНК изоформ ТЦМ IIВ и ТЦМ II d/x, то после 24-часового вывешивания наблюдается достоверное увеличение экспрессии мРНК II d/x, которая еще больше усиливается у предобработанных АICAR животных. Достоверного увеличения экспрессии мРНК ТЦМ IIВ при этом мы не наблюдали. Однако у предобработанных животных такое увеличение после вывешивания было отмечено. Ранее в литературе сообщалось о бурном росте содержания мРНК ТЦМ II d/x после трех-четырёх суток вывешивания [23,24]. При этом наблюдалось и увеличение экспрессии мРНК ТЦМ IIВ, хотя и не столь интенсивное. Наши наблюдения показывают, что эти тенденции проявляются уже после 24-часовой разгрузки.

Интересно, что активация АМПК приводит к интенсификации экспрессии и быстрых изоформ ТЦМ.

Возможно, активированная АICAR АМПК фосфорилирует гистондеацетилазы HDAC4 и HDAC5, которые экспортируются из миоядер и тем самым повышают степень ацетилирования гистонов. В свою очередь, ацетилирование гистонов может в этом случае при кратковременном действии гравитационной разгрузки неспецифически способствовать повышению экспрессии большинства миозиновых генов.

Если это предположение верно, то вполне вероятно, что именно дефосфорилирование

АМПК в течение первых суток гравитационной разгрузки является фактором, обеспечивающим блокирование экспрессии ряда миозиновых генов.

Таким образом, результаты проведенных экспериментов ясно свидетельствуют о том, что дефосфорилирование АМПК в первые 24 ч моделируемой гравитационной разгрузки оказывает существенное влияние как на некоторые ключевые маркеры анаболических сигнальных путей (p70S6K), так и на экспрессию изоформ тяжелых цепей миозина.

Авторы выражают глубокую признательность профессору А. Chibalin (Karolinska Institutet, Швеция) за ценные советы при подготовке экспериментального протокола, сотрудникам нашей лаборатории Ю.Н. Ломоносовой и К.Г. Птицыну за методическую помощь.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 14-15-00358).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. J. M. Giger, P. W. Bodell, and M. Zeng, *J. Appl. Physiol.* **107**, 1204 (2009).
2. V. V. Kravtsova, A. M. Petrov, and V. V. Matchkov, *J. Gen. Physiol.* **147**, 175 (2016).
3. Т. М. Мирзоев, С. А. Тыганов и Ю. Н. Ломоносова, *Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова* **101** (11), 1299 (2015).
4. N. A. Vilchinskaya, T. M. Mirzoev, and Y. N. Lomonosova, *J. Musculoskelet. Neuronal Interact.* **15** (3), 286 (2015).
5. R. Mounier, M. Théret, and L. Lantier, *Trends Endocrinol. Metab.* **26** (6), 275 (2015).
6. T. Wakatsuki, Y. Ohira, and W. Yasui, *Jpn. J. Physiol.* **44** (2), 193 (1994).
7. T. Matoba, Y. Wakatsuki, and Y. Ohira, *Med. Sci. Sports Exerc.* **25** (5), 157 (1993).
8. H. Zong, J. M. Ren, and L. H. Young, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99** (25), 15983 (2002).
9. C. E. Pandorf, F. Haddad, and C. Wright, *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* **297**, C6 (2009).
10. S. Dupré-Aucouturier, J. Castells, and D. Freyssenet, *J. Appl. Physiol.* **119**, 342 (2015).
11. D. Zheng, P. Maclean, and S. C. Pohnert, *J. Appl. Physiol.* **91** (3), 1073 (2001).
12. E. Morey-Holton and R. Globus, *J. Appl. Physiol.* **92**, 1367 (2002).
13. M. W. Pfaffl, G. W. Horgan, and L. Dempfle, *Nucl. Acids Res.* **30** (9), e36 (2002).
14. B. Han, M. J. Zhu, and C. Ma, *Appl. Physiol. Nutr. Metab.* **32**, 1115 (2007).
15. T. L. Hilder, L. A. Baer, and P. M. Fuller, *J. Appl. Physiol.* **99**, 2181 (2005).
16. L. De-Doncker, M. Kasri, and F. Picquet, *J. Exp. Biol.* **208** (24), 4585 (2005).
17. J. S. You, G. B. Anderson, and M. S. Dooley, *Dis Model Mech.* **8** (9), 1059 (2015).
18. K. S. Röckl, M. F. Hirshman, and J. Brandauer, *Diabetes.* **56** (8), 2062 (2007).
19. S. L. McGee and M. Hargreaves, *Clin. Sci. (Lond.)* **118** (8), 507 (2010).
20. Z. P. Chen, G. K. McConell, and B. J. Michell, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **279**, E1202 (2000).
21. J. F. Garbincius and D. E. Michel, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **112** (44), 13663 (2015).
22. K. J. Martins, M. St-Louis, and G. K. Murdoch, *Physiol.* **590** (6), 1427 (2012).
23. Б. С. Шенкман и Ю. Н. Ломоносова, *Докл. РАН* **459** (6), 759 (2014).
24. L. Stevens, K. R. Sultan, and H. Peuker, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **46**, 1044 (1999).

Dephosphorylation of AMP-Activated Protein Kinase in Postural Muscle: a Key Signaling Event at the First Day of Functional Unloading

N.A. Vilchinskaya, E.P. Mochalova, S.P. Belova, and B.S. Shenkman

Institute of Biomedical Problems, Russian Academy of Sciences, Khoroshevskoe shosse 76a, Moscow, 123007 Russia

5-aminoimidazole-4-carboxamide ribofuranoside (AMP analogue), an AMP-activated protein kinase activator, was used to analyze signal effects of dephosphorylation of AMP-activated protein kinase. It was found that activation of this kinase prevents the elevation in phospho-p70S6K content after 24 hours of gravitational unloading. Pre-treatment with this activator prevents a decrease in the expression of pre- and slow-type mature mRNA and myosin heavy chain IIA mRNA in *m. soleus* fibers of the rat after short-term gravitational unloading. This finding indicates that a decrease in phosphorylation state of AMP-activated protein kinase under unloading is an important factor in downregulation in the expression of slow myosin and myosin IIA.

Key words: AMP-activated protein kinase, myosin heavy chain, AICAR, functional unloading, m. soleus