

АМРК: СТРУКТУРА, ФУНКЦИИ И УЧАСТИЕ В ПАТОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССАХ

ОБЗОР

© 2015 Д.С. Новикова*, А.В. Гарабаджиу, Дж. Мелино,
Н.А. Барлев, В.Г. Трибулович

*Санкт-Петербургский технологический институт
(технический университет), 190013 Санкт-Петербург;
факс: +7(812)316-4648, электронная почта: dc.novikova@gmail.com*

Поступила в редакцию 05.07.14
После доработки 12.09.14

В последние годы АМФ-активируемая протеинкиназа (АМРК) признана ключевым регулятором энергетического баланса как на клеточном уровне, так и на уровне всего организма. Участие в многочисленных сигнальных каскадах позволяет АМРК эффективно управлять энергопотребляющими и энергопродуцирующими процессами для поддержания энергетического гомеостаза в стрессовых условиях. Нарушения активации или экспрессии киназы приводят к целому ряду метаболических расстройств и повышают риск развития раковых заболеваний. В обзоре рассмотрена структура АМРК, приведены механизмы ее активации, а также перечислены мишени, воздействие на которые определяет функции метаболического регулятора. Особое внимание уделено низкомолекулярным соединениям, способным оказывать как активирующее, так и ингибирующее действие на АМРК, а также рассмотрена перспектива терапевтического применения подобных модуляторов активности в ряде социально значимых заболеваний.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: АМФ-активируемая протеинкиназа, энергетический метаболизм, метаболический синдром, диабет 2-го типа, рак, активаторы АМРК, ингибиторы АМРК.

Существование всех живых организмов непосредственно связано с процессами производства и потребления энергии. Выживание этих организмов зависит от эффективного и оперативного контроля энергетического метаболизма во время резкого или продолжительного недостатка питательных веществ, энергетического подкрепления. Недавно было установлено, что АМФ-активируемая протеинкиназа (АМРК) является важным регулятором клеточного энергетического гомеостаза, который координирует многочисленные метаболические пути для того, чтобы привести в соответствие энергетические

ресурсы с энергетическими потребностями в клетках млекопитающих. В ответ на падение внутриклеточного уровня АТФ АМРК активирует энергопродуцирующие пути и ингибирует энергопотребляющие процессы. За счет присутствия как в ядре, так и в цитоплазме АМРК определяет как быстрые изменения (фосфорилирование цитоплазматических белков), так и постепенную корректировку метаболических процессов (изменения в транскрипции генов) для поддержания энергетического гомеостаза. Несмотря на то, что известность АМРК связана с ее метаболическими эффектами, она осуществляет

Принятые сокращения: ACC – ацетил-коА карбоксилаза; СаМКК – киназа Са²⁺/кальмодулин зависимых протеинкиназ; CD36 – белок-транспортер жирных кислот; eEF2K – киназа эукариотического фактора элонгации-2; eNOS – эндотелиальная синтаза оксида азота; FOXO3 – белок семейства транскрипционных факторов FOX; GLUT1/GLUT4 – представители семейства белков-транспортеров глюкозы; G6Pase – глюкозо-6-фосфатаза; GPAT – глицерин-3-фосфат ацилтрансфераза; GS – гликогенсинтаза; HDAC5 – гистоновая деацетилаза 5; HIF-1α – гипоксия-индуцибельный фактор 1α; НКП – гексокиназа II; HMGR – 3-гидрокси-3-метилглутарил-коА редуктаза; HSL – гормон-чувствительная липаза; LKB1 – киназа печени B1; MO25 – мышинный белок 25; mTOR – киназа, мишень рапамицина у млекопитающих; mTORC1 – комплекс 1 киназы mTOR; NRF – ядерный респираторный фактор; PEPCK – фосфоенолпируват карбоксикиназа; PFK2 – 6-фосфофруктокиназа-2; PGC-1α – PPARγ коактиватор 1α; PKA – протеинкиназа A; PPAR – рецепторы, активируемые пероксисомными пролифераторами; Rap2K – белок-партнер mTOR; Rheb – GTP-связывающий белок; SREBP-1c – белок, связывающий регуляторные элементы стеролов 1c; STRAD – STE20-связанный адапторный белок; TAK1 – TGF-β-активируемая киназа 1; TBC1D1/TBC1D4 – представители семейства белков, содержащих TBC домен; TSC2 – белок туберозного склероза 2 (туберин).

* Адресат для корреспонденции.

много других функций, включая регуляцию клеточного роста, пролиферации, митохондриального биогенеза. В настоящее время АМРК привлекает интерес как потенциальная мишень терапии заболеваний, связанных с энергетическим метаболизмом, таких как диабет 2-го типа, ожирение, рак.

СТРУКТУРА АМРК

АМРК представляет собой комплекс, состоящий из трех субъединиц (α , β , γ) в соотношении 1 : 1 : 1 [1]. α -Субъединица функционирует в качестве каталитической, именно она определяет киназную активность белкового комплекса, благодаря которой АМРК воздействует на метаболические пути на белковом и геномном уровне [2]. Субъединицы β и γ являются регуляторными; они так или иначе участвуют в модуляции активности всего киназного комплекса [3]. Каждая из субъединиц встречается в живых организмах в виде нескольких изоформ (рис. 1), при этом для α и β существует по две изоформы, а γ может входить в состав комплекса в виде трех существенно различающихся по длине изоформ [4]. Комбинируя эти изоформы, можно получить 12 различных вариантов АМРК. Такой разнообразный изоформный состав комплекса подразумевает, прежде всего, различные функциональные свойства, а также тканеспецифичность и внутриклеточную локализацию. Однако истинный смысл подобной вариативности АМРК еще предстоит выяснить.

Основной функциональной составляющей АМРК является каталитическая α -субъединица (АМРК α) – белок с молекулярной массой 63 кДа [1, 5]. В состав АМРК α входят следующие структурные элементы: серин/треонин киназный домен, автоингибиторный домен и участок, отвечающий за связывание с β -субъединицей. Киназный домен (KD), определяющий киназную активность комплекса, располагается на N-конце белка и является консервативным среди киназ [6]. Важной составной частью киназного домена является «активационная петля», на которой располагается основной активационный сайт АМРК – высококонсервативный треониновый остаток, при фосфорилировании которого происходит активация киназного комплекса [7]. Киназные домены практически идентичны для обеих изоформ, и, как было установлено, сходство составляет 94% [8].

В большинстве литературных источников Thr-172 указывается как основной сайт активации, что не совсем правильно. Это связано с тем, что первой была идентифицирована $\alpha 2$ -субъеди-

ница (изначально названная $\alpha 1$ -субъединицей), для которой действительно на месте 172 располагается треониновый остаток, фосфорилирование которого приводит к увеличению киназной активности АМРК [7]. После идентификации второй изоформы АМРК α , первоначально открытая изоформа была переименована, а вновь открытая получила название $\alpha 1$ изоформы, по-видимому, из-за больших размеров (552 против 559 а.о.) [9]. Но до сих пор, когда речь заходит об АМРК, в качестве основного активационного сайта называется Thr-172, хотя это справедливо только для $\alpha 2$ -субъединицы, тогда как для $\alpha 1$ -субъединицы сайтом фосфорилирования является Thr-183.

За киназным доменом следует участок, названный автоингибиторным доменом (AID) ввиду того, что α -субъединица, содержащая только киназный и автоингибиторный домены проявляет низкую активность даже в случае фосфорилирования, в то время как конструкция, содержащая только киназный домен, проявляет активность в полной мере [6]. C-концевой участок АМРК α (α -CTD) образует глобулярный домен, который взаимодействует с C-концевым доменом β -субъединицы, что является необходимым для образования $\alpha : \beta : \gamma$ комплекса [10]. Различие между двумя изоформами АМРК α главным образом заключается в степени активации при связывании с АМФ и клеточной локализации. Считается, что за счет изоформ α -субъединицы определяется клеточная локализация всего комплекса АМРК: было показано, что $\alpha 1$ -субъединица способствует локализации во внеядерной фракции, тогда как $\alpha 2$ -субъединица локализуется как в ядре, так и в цитоплазме [11]. Однако локализация АМРК строго не детерминирована строением, и при различных условиях распределение киназного комплекса между ядром и цитоплазмой может меняться. Так была выявлена C-терминальная гидрофобная аминокислотная последовательность (NES), обуславливающая ядерный экспорт АМРК комплекса [12].

Что касается β -субъединицы, то помимо регуляторной составляющей АМРК, ее можно назвать остовом киназного комплекса [13]. Внутри АМРК β (30 кДа) можно выделить два характеристических участка: гликоген-связывающий домен и участок связывания с α - и γ -субъединицей. Регуляторная функция заключается в непосредственной вовлеченности АМРК β в углеводный метаболизм. Присутствие гликоген-связывающего домена (GVD) позволяет комплексу АМРК ассоциировать с олигосахаридами и гликогеном с различной аффинностью в зависимости от изоформы [14], помимо этого связы-

вание с олигосахаридами, содержащими только α 1 \rightarrow 6 цепочку, ингибирует активацию АМРК комплекса [15]. С-концевой домен АМРК β (β -СТД), связывающий α - и γ -субъединицу, структурно представляет собой β -листы. Он взаимодействует с α -СТД и через терминальную короткую последовательность связывает γ -субъединицу, образуя таким образом основу комплекса [16]. Кроме того, для обеих изоформ АМРК β характерно миристоилирование, сайт которого находится на N-конце β -субъединицы (Gly-2). Как известно, N-миристоилирование белков обеспечивает связывание с мембраной и мембранную ориентацию, а в случае АМРК также отражается и на активности киназы [17].

Наиболее важной субъединицей АМРК комплекса является γ -субъединица, обуславливающая функционирование белка в качестве сенсора уровня АМФ в клетке [18]. В зависимости от изоформы масса АМРК γ находится в

пределах 38–63 кДа, при этом разница заключается в длине N-концевой последовательности [19]. Все три изоформы содержат четыре повтора эволюционно консервативной последовательности цистатионин- β -синтазы (CBS). Из-за склонности к димеризации CBS чаще всего встречаются в виде тандемных повторов. Основной их функцией является контроль внутриклеточных метаболитов, а в случае АМРК заключается в связывании адениновых нуклеотидов [20]. Непосредственно перед первым повтором CBS располагается короткая последовательность, отвечающая за связывание с β -субъединицей [21].

За последние годы были предприняты усилия для установления третичной структуры комплекса АМРК. Фактически на сегодняшний день расшифрованы структуры большей части α - и β -субъединиц, а также полная структура γ -субъединицы. Данные о структуре АМРК

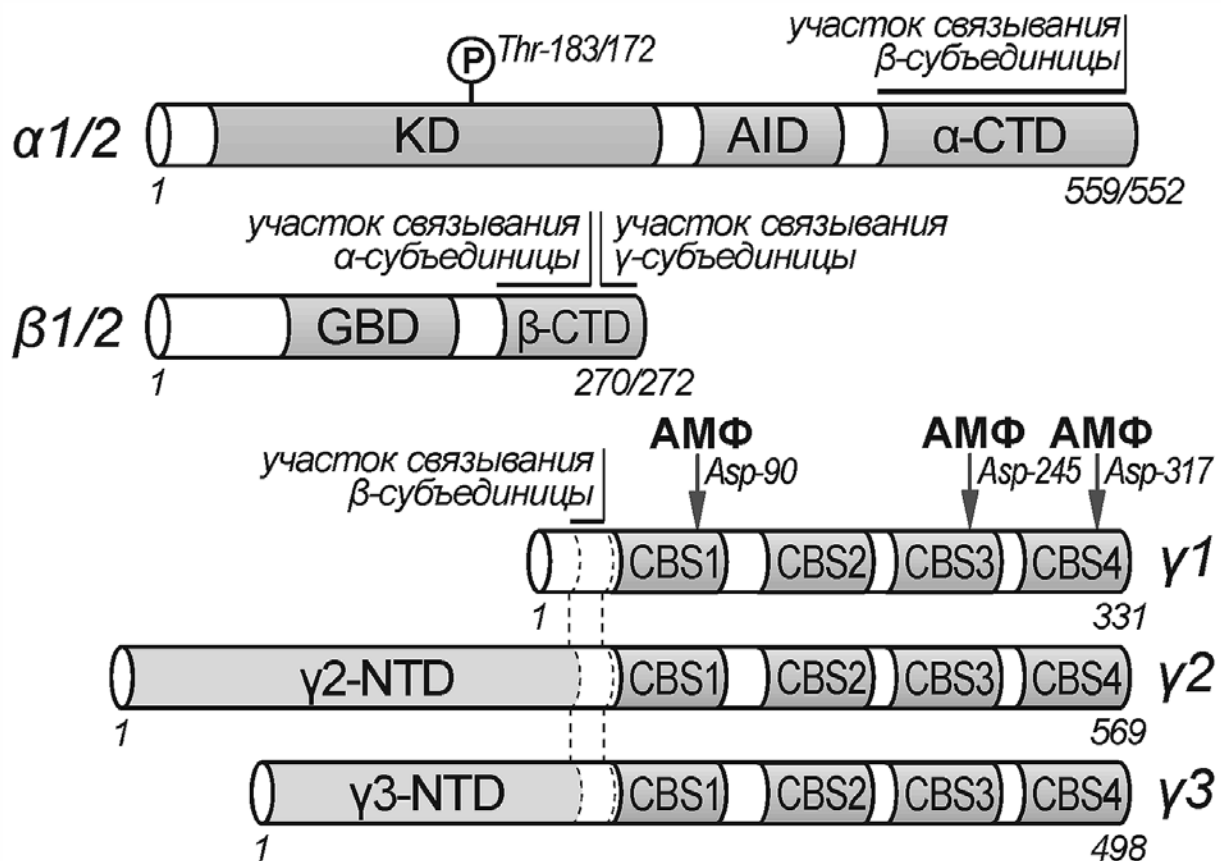


Рис. 1. Доменная структура субъединиц АМРК. Условные сокращения: KD – киназный домен; AID – автоингибиторный домен; CTD – С-концевой домен; GBD – гликоген-связывающий домен; CBS – домен, содержащий последовательность цистатионин- β -синтазы; NTD – N-концевой домен. Цифры под субъединицами указывают на количество аминокислотных остатков. Стрелками обозначено расположение сайтов связывания АМФ (сайты 1, 3 и 4)

основаны на идентификации строения отдельных доменов и изучении их взаимодействия с киназным комплексом с помощью протеолитических делеций и точечных мутаций. Большое количество работ связано с исследованием структуры киназного домена α -субъединицы, как основного каталитического элемента комплекса, при этом большой вклад внесло изучение киназного домена Snf1, родственной АМРК киназе делящихся дрожжей [8, 22, 23]. Ряд работ был посвящен изучению функционирования регуляторной γ -субъединицы, в частности сокристаллизации как дрожжевой, так и АМРК γ млекопитающих с различными нуклеотидами [24–26]. На сегодняшний день наиболее актуальной задачей является изучение функционирования всех составляющих частей гетеротримерного комплекса АМРК. В рамках решения этой задачи впервые кристаллическая структура $\alpha\beta\gamma$ комплекса была получена для АМРК *Saccharomyces cerevisiae* [27]. Спустя четыре года кристаллическая структура комплекса, собранного из трех субъединиц (α и β из крысы, γ из человека), была получена и для АМРК млекопитающих [10]. Несмотря на предпринятые усилия, долгое время не удавалось расшифровать полную структуру автоингибиторного домена α -субъединицы человека, по всей видимости существенно отличавшегося от аналогичной области Snf1 дрожжей [10]. Данная область особенно интересна как своим участием в процессе активации/инактивации киназного комплекса, так и возможностью ее использования для разработки новых соединений, напрямую взаимодействующих с АМРК. К настоящему моменту эта задача решена: была получена кристаллическая структура ($\alpha 1$: 295–347), включающая нерасшифрованный ранее участок AID [28].

АКТИВАЦИЯ АМРК

Первоначально было установлено, что регуляция АМРК происходит за счет АМФ, благодаря чему киназа и получила свое название. В настоящее время АМРК считается сенсором энергетического состояния клетки, на уровне организма в целом ее задачей является поддержание энергетического гомеостаза [29]. Несмотря на то, что АМРК активируется за счет АМФ при увеличении его концентрации в клетке, киназа не является непосредственным индикатором уровня АМФ. В действительности АМРК реагирует на изменение отношения АМФ/АТФ как наиболее чувствительного индикатора энергетического статуса, что обусловлено конкурентным связыванием АМФ и АТФ с АМРК [30]. В

организме активация АМРК происходит в стрессовых условиях, при которых повышается уровень АМФ и снижается уровень АТФ, таких как гипоксия [31], ишемия [32], тепловой шок, оксидативный стресс [33], недостаток питательных веществ, продолжительные мышечные сокращения [34].

Считается, что активация киназного комплекса зависит от двух факторов: фосфорилирования активирующими киназами (АМРКК) и связывания с АМФ. Первый фактор представляет собой так называемый АМФ-независимый путь активации [35]. Второй фактор определяется связыванием γ -субъединицы киназы с АМФ, что приводит к конформационным изменениям всего комплекса, т.е. аллостерической активации [36]. До сих пор не определена очередность и значимость этих факторов. С одной стороны, как только происходит фосфорилирование АМРК, киназа становится активной и степень ее активации в дальнейшем может быть увеличена за счет связывания с АМФ [25, 37]. С другой стороны, аллостерически активный комплекс может дополнительно активироваться за счет фосфорилирования [38]. Трудно сказать, насколько один механизм активации независим от другого и существуют ли случаи, когда активация АМРК достигается только за счет одного фактора. Показано, что АМФ не оказывает воздействия на активирующие киназы АМРК [39], что позволяет рассматривать активацию посредством фосфорилирования и аллостерическую активацию как два независимых фактора.

Говоря об аллостерической активации, вначале следует рассмотреть процесс взаимодействия адениновых нуклеотидов с регуляторной γ -субъединицей. АМРК γ содержит четыре потенциальных сайта для связывания адениновых нуклеотидов, находящихся в соответствующих CBS доменах, нумерация которых осуществляется по их расположению от N-конца [20]. Ввиду естественной мутации только три из четырех сайтов способны к связыванию нуклеотидов. Механизм взаимодействия с АМФ (АДФ, АТФ) заключается в следующем: адениновое основание заходит внутрь гидрофобного кармана на поверхности CBS домена и 2'- и 3'-гидроксильные группы рибозного остатка взаимодействуют с консервативным остатком аспарагиновой кислоты [40]. Для CBS1, CBS3 и CBS4 доменов эти остатки располагаются соответственно Asp-90, Asp-245, Asp-317, тогда как для четвертого потенциального сайта (CBS2) на месте остатка аспарагиновой кислоты находится остаток аргинина (Arg-171). В качестве подтверждения при сокристаллизации γ -субъединицы с АМФ в кристаллической структуре было зафиксировано

но только три молекулы АМФ. Таким образом, считается, что сайт 2 остается постоянно незанятым [25]. Кроме этого считается, что сайт 4 большую часть времени занят молекулой АМФ и не участвует в регуляции. Таким образом, остается лишь два сайта связывания нуклеотидов (CBS1 и CBS3) из четырех возможных [25].

Аллостерическая активация АМРК происходит при связывании молекул АМФ по γ -субъединице, в которой находится два аллостерических сайта (сайты 1 и 3). Несмотря на симметрию АМРК γ , эти два сайта существенно отличаются друг от друга по аффинности в отношении нуклеотидов. Было установлено, что сайт 1 связывает нуклеотиды как минимум в 30 раз сильнее, чем сайт 3, что, как полагают, делает его ответственным за аллостерический эффект [10]. Однако, несмотря на более слабое связывание, взаимодействие АМФ с сайтом 3 вызывает значительные изменения позиции His-297 [40], что способствует конформационным изменениям АМРК комплекса и его аллостерической активации. Кроме того, исследования показывают, что взаимодействие с АМФ и последующие изменения в структуре киназы делают ее менее чувствительной к действию фосфатаз [36]. Таким образом, молекулы АМФ при связывании с γ -субъединицей АМРК выполняют две основные функции: 1) аллостерическая активация АМРК комплекса; 2) защита от дефосфорилирования основного активационного сайта. В настоящее время найдены подтверждения, что помимо этих функций связывание с АМФ стимулирует фосфорилирование за счет АМРКК [41] и теперь этот эффект выделяют наряду с аллостерической активацией и защитой от дефосфорилирования.

Связывание молекул АТФ по γ -субъединице вызывает противоположный эффект. Высокие концентрации АТФ препятствуют активации АМРК ввиду того, что связывание АМФ и АТФ сайтами 1 и 3 носит конкурентный характер [25]. Считается, что максимально γ -субъединица может связать две молекулы АТФ. Интересно, что в отсутствие АМФ был получен сокристаллизованный комплекс АМРК γ с молекулами АТФ, в котором они занимают сайты 1 и 4, что подтверждает способность сайта 4 к конкурентному связыванию [40].

Помимо АМФ и АТФ, АМРК может связывать также молекулы АДФ [42]. Связывание с АДФ не вызывает аллостерического эффекта, однако, также как и АМФ, защищает основной активационный сайт от дефосфорилирования. В сокристаллизованной структуре АМРК γ молекула АДФ занимает более аффинный сайт 1, вероятно отвечающий за эффект защиты от дефосфорилирования [10].

Не вдаваясь в механизмы действия адениновых нуклеотидов, тем не менее, можно сделать ряд заключений. Связывание с нуклеотидами имеет различное влияние на АМРК: взаимодействие с АМФ вызывает аллостерическую активацию киназного комплекса и защиту от дефосфорилирования основного активационного сайта; взаимодействие с АДФ не вызывает активации, но сохраняет эффект защиты от действия фосфатаз; тогда как АТФ препятствует обоим процессам. Такое ступенчатое изменение активности при взаимодействии с нуклеотидами, по всей видимости, и делает АМРК весьма чувствительной к изменениям в энергетическом состоянии клетки.

Если говорить о регуляции активности АМРК за счет фосфорилирования, то необходимо охарактеризовать киназы, за счет которых оно осуществляется. К настоящему моменту для АМРК комплекса идентифицировано три активирующих киназы [43–45].

Основной активирующей киназой АМРК является LKB1 [46]. Показано, что LKB1 непосредственно фосфорилирует АМРК по основному активационному сайту как *in vitro*, так и *in vivo* [43]. Для функционирования данной АМРКК требуются две вспомогательные субъединицы STRAD и MO25. Псевдокиназа STRAD активирует LKB1 и отвечает за экспорт комплекса из ядра в цитоплазму [47], MO25 в свою очередь стимулирует образование гетеротримера и повышает киназную активность LKB1 в 10 раз, выступая в роли скаффолд-белка [48]. Экспрессия LKB1, следовательно, и степень фосфорилирования АМРК регулируется, в частности, половыми гормонами – тестостероном/дигидротестостероном и эстрадиолом [49]. Установлено, что тестостерон/дигидротестостерон ингибируют, в то время как эстрадиол стимулирует экспрессию LKB1, при этом действие гормонов опосредовано андрогенными и эстрогенными рецепторами. Следует отметить, что в ряде случаев зависимость активности LKB1 от уровня мужских или женских половых гормонов может меняться на противоположную [50]. Мутации в LKB1 приводят к развитию синдрома Пейца–Егерса (полипоз желудочно-кишечного тракта), что связывают с потерей LKB1 киназной активности, а также являются причиной развития некоторых видов рака [51, 52]. Выступая в роли онкосупрессора, LKB1 проявляет соответствующие функции через фосфорилирование и активацию не только АМРК, но и еще, по меньшей мере, 12 родственных киназ [53].

После того, как было показано, что в нокаутных по LKB1 клетках, несмотря на снижение фосфорилирования АМРК, полного подавле-

ния ее активности не происходит, стало очевидно, что для АМРК существуют альтернативные активирующие киназы [54]. Было установлено, что в качестве них могут выступать киназы Ca^{2+} /кальмодулин зависимых протеинкиназ (СаМККs), причем основной изоформой, активирующей АМРК, является СаМКК β [55, 56]. Было показано, что СаМКК фосфорилируют и активируют АМРК *in vitro* [44]. СаМКК β , как и LKB1, не активируется за счет АМФ; ее активация происходит в ответ на увеличение внутриклеточного уровня Ca^{2+} [39]. Высказано предположение, что в мозге Ca^{2+} -зависимый сигнальный каскад является основным путем активации АМРК. Это связывают с повышенной экспрессией СаМКК в мозге [56]. Увеличение уровня Ca^{2+} обычно сопровождается такие процессы, как активация моторных белков, и сигнализирует об увеличенном энергетическом потреблении. Таким образом, активация АМРК через СаМКК β является механизмом предотвращения АТФ дефицита до того, как он наступит, что практически важно для нейронов [54], а также эндотелиальных клеток [57] и Т-лимфоцитов [58].

Третьей активирующей киназой является TGF- β -активируемая киназа 1 (ТАК1), которая также непосредственно фосфорилирует АМРК в различных тканях, включая скелетные мышцы [45]. Являясь альтернативной активирующей киназой, ТАК1, по всей видимости, играет ключевую роль в регуляции активности АМРК в сердце [59]. Однако физиологические условия, при которых ТАК1 модулирует активность АМРК, еще предстоит установить.

Дефосфорилирование основного активационного сайта осуществляется действием протеинфосфатаз, которые играют важную роль в регуляции активности АМРК комплекса. За этот процесс отвечают протеинфосфатазы 2А и 2С, для которых было показано дефосфорилирование основного активационного сайта *in vivo* [60]. Следует отметить, что помимо основного активационного сайта, который подвергается фосфорилированию за счет активирующих киназ (LKB1, СаМКК β , ТАК1), АМРК может фосфорилироваться и по другим сайтам в составе α - и β -субъединицы [61]. Некоторые из них были определены как вторичные регуляторные сайты. В частности, фосфорилирование $\alpha 1$ Ser-485 ($\alpha 2$ Ser-491) оказывает ингибирующее воздействие на АМРК посредством РКА-опосредованной цАМФ сигнализации [62]. Помимо фосфорилирования, АМРК может подвергаться ацилированию по α -субъединице, при этом деацилирование стимулирует взаимодействие с LKB1 [63].

Несмотря на кажущуюся простоту механизмов активации, какая из модификаций является «активной», а какая «неактивной» сказать трудно. Исследования, проведенные с использованием бактериально экспрессируемой рекомбинантной АМРК показали, что дикий тип АМРК сам по себе не обладает активностью [36]. Это объясняется тем, что в бактериях АМРК не подвергается фосфорилированию, в отличие от нативной АМРК [61]. Было установлено, что в ряде клеток LKB1, основная активирующая киназа АМРК, является постоянно активной [39], что заставляет предположить наличие равновесия между фосфорилированной и дефосфорилированной формой АМРК. Таким образом, при нормальных физиологических условиях можно говорить о некоторой базальной активности АМРК, при этом активацией будет фактически являться смещение равновесия в сторону фосфорилированной формы.

Если говорить о количественных эффектах, при связывании с АМФ степень активации АМРК по сравнению с базальной увеличивается в 1,5–4 раза [44, 46]. Такую разницу можно объяснить различной чувствительностью изоформ γ -субъединицы к изменению соотношения АМФ/АТФ. Было показано, что комплекс, содержащий $\gamma 2$ изоформу, более чувствителен к аллостерической активации, чем комплекс, содержащий $\gamma 3$ изоформу [19]. Различная чувствительность может быть связана с различной силой связывания изоформами адениновых нуклеотидов [10]. Полное фосфорилирование основного активационного сайта за счет активирующих киназ может вызвать 100-кратное увеличение активности АМРК, однако это практически не достижимо в клеточных условиях [37]. Комбинирование эффектов аллостерической активации и фосфорилирования основного активационного сайта может выражаться в увеличении степени активации до 1000 раз, проявляя своего рода синергетическое действие [36]. Можно утверждать, что для успешной активации АМРК *in vivo* одинаково важным является как взаимодействие с АМФ, так и воздействие активирующих АМРК киназ.

ФУНКЦИИ АМРК

Основная функция АМРК – поддержание энергетического гомеостаза. АМРК является универсальным переключателем, который при энергетическом истощении организма запускает процессы, направленные на производство АТФ, в то же время подавляя потребляющие АТФ процессы (рис. 2). Переключение осуществ-

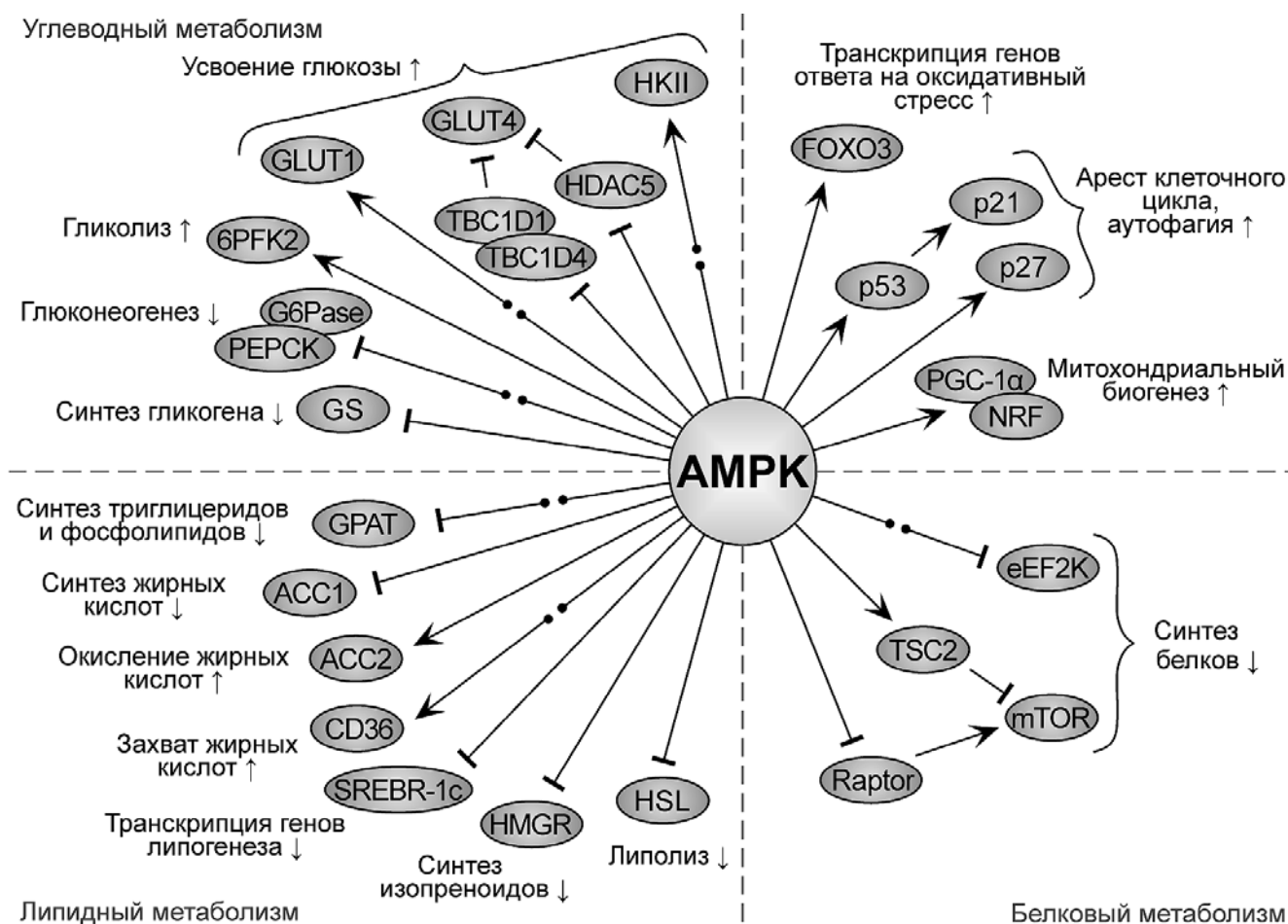


Рис. 2. Участие АМПК в различных биохимических процессах. Разрыв линии указывает на неизвестный механизм действия

вляется путем оперативного фосфорилирования основных ферментов наиболее значимых метаболических путей, включающих синтез жирных кислот, синтез белков, углеводный метаболизм, и в то же время фосфорилированием транскрипционных факторов, обеспечивающих долгосрочные регуляторные эффекты [61]. АМПК не только участвует в углеводном, липидном и белковом метаболизме, но и вовлечена в регуляцию митохондриального биогенеза, клеточного роста и пролиферации, процессов апоптоза и аутофагии, полярности эпителиальных клеток [38]. АМПК играет важную роль в гормональной сигнализации, занимая узловое положение на пересечении сигнальных путей. АМПК способна регулировать эндокринную систему, в то же время ее активность контролируется рядом гормонов и цитокинов (адипокинов), таких как лептин, интерлейкин 6, резистин, грелин, адипонектин. Интересно, что некоторые адипокины оказывают противополож-

ное действие на активность АМПК в зависимости от органа, на который направлено их воздействие [64]. Помимо этого АМПК осуществляет контроль аппетита через нейроэндокринную систему, что делает ее ключевым регулятором энергетического метаболизма на уровне всего организма [65].

Рассматривая мишени АМПК, относящиеся к углеводному метаболизму, следует начать с усвоения глюкозы периферическими тканями. За этот процесс отвечают трансмембранные белки семейства GLUT, из которых скоростью определяющим является GLUT4. АМПК фосфорилирует и инактивирует гуанозинтрифосфатазы TBC1D1/TBC1D4 (AS160), что приводит к незамедлительной транслокации GLUT4 из везикул на плазматическую мембрану [66]. В тканях, не экспрессирующих GLUT4, АМПК активирует GLUT1 уже находящийся на плазматической мембране, однако происходит это непрямым путем и механизмы этого пока не изучены [67].

Долгосрочный эффект захвата глюкозы определяется транскрипционной регуляцией как GLUT4 (предположительно за счет фосфорилирования гистоновой деацетилазы 5), так и гексокиназы II, которая также играет важную роль в процессе усвоения глюкозы [68]. АМПК непосредственно фосфорилирует и инактивирует гликогенсинтазу, тем самым ингибируя синтез гликогена в ряде тканей [69]. Активация процесса гликолиза происходит за счет фосфорилирования и активации киназы 6PFK2, отвечающей за синтез и распад фруктозо-2,6-бисфосфата. В свою очередь фруктозо-2,6-бисфосфат регулирует активность киназы 6PFK1, которая катализирует реакцию фруктозо-6-фосфат → фруктозо-1,6-бисфосфат, определяющую интенсивность гликолиза в целом [70]. Помимо этого АМПК ингибирует синтез глюкозы в печени. Регуляция глюконеогенеза осуществляется за счет фосфорилирования и инактивации коактиваторов транскрипции и транскрипционных факторов, контролирующих экспрессию ферментов, таких как PEPCK (катализирует скорость, определяющую реакцию: оксалоацетат → фосфоенолпируват) и G6Pase (глюко-6-фосфат → глюкоза) через множественные механизмы [71].

Одной из наиболее значимых мишеней, относящихся к липидному метаболизму, является ацетил-коА карбоксилаза (АСС), фермент, необходимый для синтеза малонил-коА. АСС играет ключевую роль в биосинтезе жирных кислот и является мощным ингибитором транспорта жирных кислот в митохондрии. С исследованием ее активности связывают открытие АМПК как протеинкиназы, осуществляющей регуляцию ключевых ферментов биосинтеза жирных кислот и стеролов. АМПК напрямую фосфорилирует АСС1, цитозольную изоформу ацетил-коА карбоксилазы, что приводит к ингибированию синтеза жирных кислот [72]. Помимо этого АМПК фосфорилирует транскрипционный фактор SREBP-1c, предотвращая его протеолитический процессинг и, как следствие, транслокацию в ядро, что приводит к ингибированию транскрипции генов, контролирующих весь путь синтеза жирных кислот, в том числе АСС и синтазы жирных кислот [73]. При этом АМПК активирует процесс окисления жирных кислот за счет фосфорилирования митохондриально ассоциированной изоформы АСС2, стимулируя таким образом захват жирных кислот митохондриями [74]. Также АМПК активирует захват жирных кислот за счет транслокации белка CD36 на плазматическую мембрану, хотя механизм этого остается неясным [75]. АМПК ингибирует процесс липолиза за счет фосфорилирования гормончувствительной липазы, что исключает возмож-

ность ее активации с помощью цАМФ-зависимой протеинкиназы [76]. Ингибирование этого процесса, вероятно, позволяет избежать стимуляции энергозатратного цикла синтеза триглицеридов при накоплении свободных жирных кислот [37]. Кроме того, АМПК ингибирует синтез изопреноидов, в частности холестерина, путем непосредственного фосфорилирования и ингибирования 3-гидрокси-3-метилглутарил-коА редуктазы (HMGCR), которая катализирует основную стадию синтеза холестерина и других изопреноидов — синтез мевалоновой кислоты [77]. АМПК также ингибирует синтез триглицеридов и фосфолипидов за счет инактивации ацилтрансферазы GPAT, но является ли она непосредственным субстратом АМПК пока не ясно [78].

Участие АМПК в регуляции белкового метаболизма проявляется в ингибировании синтеза белков путем фосфорилирования белка TSC2, что негативно регулирует mTORC1 за счет инактивации белка Rheb, и непосредственного фосфорилирования белка Raptor, являющегося субъединицей mTORC1 комплекса [79]. Вместе с этим АМПК ингибирует синтез белков также через фосфорилирование киназы eEF2K, хотя последняя может не являться ее непосредственным субстратом [80].

Следует упомянуть ряд мишеней, не относящихся напрямую к метаболическим процессам. АМПК, вероятно, фосфорилирует белки p53 и p27, причем фосфорилирование p53 приводит к его стабилизации и активации транскрипции p21. Таким образом, активация двух циклин-зависимых ингибиторов киназ, p27 и p21, индуцирует арест клеточного цикла в G1:S фазе и стимулирует аутофагию [81, 82]. АМПК непосредственно фосфорилирует транскрипционный фактор FOXO3, который активирует транскрипцию ряда генов, в том числе вовлеченных в процессы ответа на оксидативный стресс [83]. Мишенью АМПК также является синтаза eNOS, отвечающая за синтез оксида азота в кровеносных сосудах и их функционирование; АМПК напрямую фосфорилирует eNOS и тем самым увеличивает производство NO [84]. Кроме того, мишенями АМПК являются NRF/PGC-1 α — два главных транскрипционных регулятора митохондриального биогенеза, синхронизирующих производство энергии в митохондриях [85].

В целом воздействие активированной АМПК на функционирование клеток проявляется в многочисленных и сложных эффектах, целью которых является восстановление нарушенного клеточного энергетического баланса. Практически повсеместная экспрессия позволяет АМПК селективно регулировать метаболические процессы, свойственные определенным тканям, кото-

рые характеризуются специфичным изоформным составом киназного комплекса [9, 19, 86]. Так, установлено, что $\alpha 1$, $\beta 2$ и $\gamma 1$ изоформы обнаруживаются повсеместно, в то время как $\gamma 3$ изоформа найдена лишь в скелетной мышечной ткани. Описание распределения изоформ субъединиц АМРК по тканям и органам приведено в таблице. Чтобы подробно рассмотреть спектр мишеней и понять, каким образом АМРК регулирует те или иные процессы в различных органах и тканях, читателю рекомендуется обратиться к работам, посвященным функционированию АМРК как на уровне организма в целом, так и на клеточном уровне [37, 61].

АКТИВАТОРЫ АМРК

Среди известных активаторов АМРК на сегодняшний день значительную группу составляют соединения натурального происхождения. Среди них наиболее отражены в литературе следующие: бигуаниды [88], ресвератрол [89], берберин [90], салидрозид [91], D-ксилоза [92], кверцетин [93], генистеин, эпигаллокатехин-3-

галлат, капсаицин [94], куркумин [95] и др. Такое структурное разнообразие природных активаторов подразумевает, что вероятнее всего данные соединения не взаимодействуют с АМРК напрямую, а активируют киназный комплекс опосредованно: 1) через увеличение внутриклеточного АМФ/АТФ отношения, в большинстве случаев путем снижения концентрации АТФ (что может достигаться за счет ингибирования Комплекса I дыхательной цепи, угнетения митохондриальной функции), либо путем ингибирования АМФ-метаболизирующих ферментов [96]; 2) за счет активации или стимуляции активирующих киназ.

Опубликовано большое количество работ по определению механизмов действия прямых и непрямых активаторов [97]. Подробнее с эффектами данных природных активаторов и механизмами, по которым они действуют, можно ознакомиться в обзорах [37, 98].

К опосредованным активаторам АМРК относят класс тиазолидиндионов. Они являются синтетическими лигандами PPAR, причем наибольшую специфичность проявляют по отношению к PPAR γ , ядерного гормонального рецептора,

Экспрессия изоформ субъединиц АМРК в различных тканях и органах [87]

Ткань/орган	АМРК α	АМРК β	АМРК γ
Жировая ткань	$\alpha 1$: 90% $\alpha 2$: 10%	н/опр.	н/опр.
Мозг	$\alpha 1$: 75% $\alpha 2$: 25%	н/опр.	$\gamma 1$: 36% $\gamma 2$: 36%
Костная ткань: остеобласты остеокласты	$\alpha 1$: 100% $\alpha 1$: 100%	н/опр. $\beta 1$: 100%	$\gamma 1$: 100% $\gamma 1$: 100%
Сердце:	$\alpha 1$: 75% $\alpha 2$: 25%	$\beta 1 < \beta 2$	$\gamma 1$: 85% $\gamma 2$: 15%
эндотелиальные клетки гладкие мышцы	$\alpha 1 > \alpha 2$ н/опр.	$\beta 1 > \beta 2$ н/опр.	$\gamma 1 < \gamma 2$ н/опр.
Почки	$\alpha 1$: 80% $\alpha 2$: 20%	$\beta 1 < \beta 2$	$\gamma 1$: 80% $\gamma 2$: 20%
Печень	$\alpha 1$: 45% $\alpha 2$: 55%	$\beta 1 > \beta 2$	$\gamma 1$: 90% $\gamma 2$: 10%
Легкие	$\alpha 1$: 90% $\alpha 2$: 10%	$\beta 1 > \beta 2$	$\gamma 1$: 80% $\gamma 2$: 20%
Скелетные мышцы	$\alpha 1$: 20% $\alpha 2$: 80%	$\beta 1 < \beta 2$	$\gamma 1$: 90% $\gamma 2$: 10% $\gamma 3$: н/опр.

Примечание: н/опр. – изоформа присутствует, но относительное содержание не определено.

экспрессируемого в основном в жировых тканях, но также имеющего большое значение в скелетных мышцах и печени [99]. Было установлено, что тиазолидиндионы активируют АМПК за счет изменения уровня адениновых нуклеотидов. Воздействие тиазолидиндионов на мышечную ткань вызывает резкое увеличение уровня АМФ, и как следствие быструю активацию АМПК [100]. Наряду с метформином, бигуанидом синтетического происхождения, представители тиазолидиндионов – росиглитазон и пиоглитазон – широко используются для лечения диабета 2-го типа [101].

К другому классу активаторов можно отнести АМФ-аналоги, основным представителем которых является АICAR (рис. 3). Метаболизируясь в организме до 5-аминоимидазол-4-карбоксамид-1- β -D-рибофуранозил 5'-монофосфата (ZMP), который представляет собой миметик АМФ, он непосредственно взаимодействует с АМПК, вызывая активацию комплекса [102]. Механизм действия АICAR аналогичен АМФ: он взаимодействует с АМПК по АМФ-связывающему домену с образованием водородной связи за счет гидроксильных групп рибозы [42]. АICAR также активирует АМПК *in vitro*, однако по сравнению с АМФ его стимулирующий потенциал значительно ниже, что говорит о неполном сходстве АМФ и ZMP в клеточных условиях [36]. Было показано, что применение АICAR повышает чувствительность к инсулину путем угнетения провоспалительных цитокинов, в связи с чем он некоторое время считался перспективным противодиабетическим агентом [103]. Вскоре после того, как было установлено, что АICAR стимулирует мышечную выносливость посредством регуляции транскрипционной активности PPAR δ [104], его использование было запрещено Всемирным антидопинговым агентством (WADA). Фактически, АICAR представляет собой антиметаболит, который способен вовлекаться в широкий спектр биохимических процессов и вызывать нежелательные побочные эффекты. Обладая способностью взаимодействовать с ферментами, содержащими АМФ-связывающие сайты, тем самым проявляя низкую специфичность к АМПК, его использование в качестве активатора имеет свои ограничения [105].

Фактически, АМФ-аналоги, связываясь с γ -субъединицей, вызывают аллостерическую активацию, таким образом, их можно также отнести к классу аллостерических активаторов АМПК. Помимо классических сайтов (АМФ-связывающие домены) у АМПК, как у любой протеинкиназы, существуют альтернативные аллостерические сайты. Один из них был найден при попытке разработки новых активаторов

АМПК путем скрининга химической библиотеки, содержащей 700 000 соединений [106]. В ходе этого процесса было идентифицировано соединение А-769662 (рис. 3), для которого было подтверждено прямое взаимодействие с АМПК [107]. Данное соединение встраивается в зазор между γ -субъединицей и гликоген-связывающим доменом β -субъединицы, не затрагивая аминокислотных остатков, участвующих в связывании АМФ [108]. Особенностью А-769662 является способность к активации только комплексов АМПК, содержащих β 1 изоформу, что не позволяет использовать его для активации АМПК скелетных мышц, где доминирующей изоформой является β 2 [87]. Благодаря дальнейшим исследованиям и оптимизации на основе А-769662 был получен ряд соединений класса пиридонов, активирующих как β 1-, так и β 2-содержащие комплексы [109]. Интересно, что среди природных соединений также был найден прямой активатор – сангвинарин, взаимодействующий с АМПК по данному аллостерическому сайту [110].

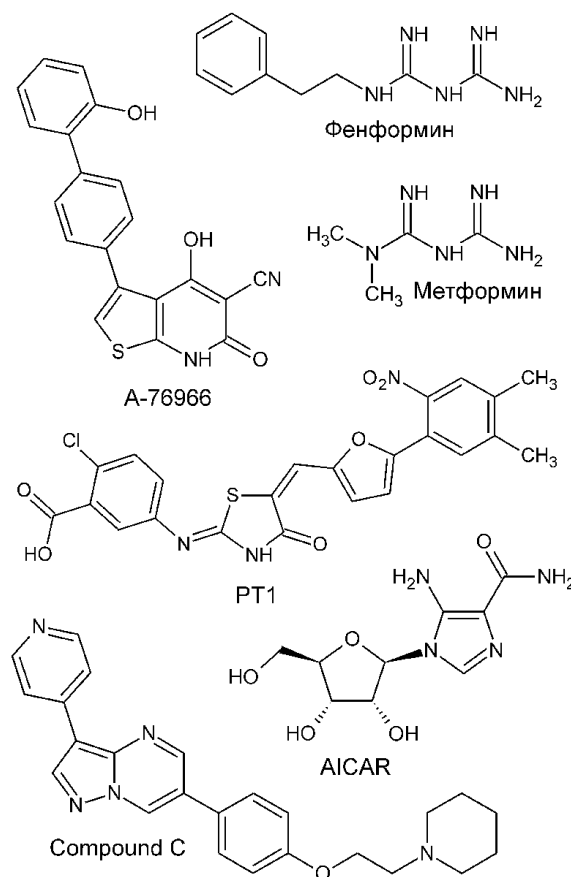


Рис. 3. Структуры наиболее известных модуляторов активности АМПК. Метформин и фенформин являются непрямыми активаторами; АICAR и А-769662 относятся к аллостерическим активаторам; PT1 активирует АМПК путем блокирования автоингибиторного домена; Compound C – АМПК ингибитор

АВТОИНГИБИРОВАНИЕ АМРК

Как известно, регуляция активности АМРК осуществляется в условиях метаболического стресса или с помощью лекарственных препаратов, ксенобиотиков, гормонов и цитокинов. Помимо этого, АМРК способна к саморегуляции как и другие протеинкиназы. На сегодняшний день предполагается два механизма, посредством которых АМРК регулирует свою активность.

Первый заключается в связывании псевдосубстратного участка, находящегося внутри CBS2 домена γ -субъединицы, по каталитической области α -субъединицы. Предполагается, что в отсутствие АМФ такое взаимодействие предотвращает фосфорилирование активирующими киназами и блокирует каталитическую активность по отношению к субстратам [111]. По всей видимости, данный механизм авторегулирования может иметь как межмолекулярный, так и внутримолекулярный характер [61].

Второй механизм, посредством которого АМРК может саморегулировать активность, обусловлен наличием в последовательности α -субъединицы автоингибиторного домена (AID). Было установлено, что делеция небольшого участка ($\alpha 1$: 313–335), входящего в состав автоингибиторного домена, приводит к тому, что активность АМРК становится постоянной [112]. Исследование механизма автоингибирования показало, что взаимодействие этого участка с киназным доменом отражается на каталитической активности белка в целом [22]. Как у всего суперсемейства протеинкиназ, активационная петля АМРК ограничена двумя мотивами: инвариантным $^{157}\text{DFG}^{159}$ и полуконсервативным $^{181}\text{APE}^{183}$. Взаимодействие с AID вызывает выпетливание участка DFG, приводящее к реструктуризации каталитической петли киназы [8]. Переключение активности киназы осуществляется через конформационный переход между «открытым» и «закрытым» состоянием. Неактивной форме киназы соответствует открытая конформация активационной петли, в то время как активная форма характеризуется закрытой конформацией, причем переход из одной формы в другую опосредован AID [110]. Было показано, что взаимодействие AID с киназным доменом осуществляется с помощью водородных связей. Точечные мутации приводят к ослаблению взаимодействия AID с киназным доменом и, как следствие, к частичному снятию автоингибиторного эффекта [22, 113].

Впоследствии из автоингибиторной области был выделен участок, следующий непосредственно за AID и названный α -линкером [28].

Здесь стоит отметить, что в работах последнего времени термин AID относят лишь к участку автоингибиторной области, непосредственно взаимодействующему с киназным доменом [28, 114, 115]. Обладая большой протяженностью, α -линкер подходит вплотную к γ -субъединице, проходя в непосредственной близости от АМФ-связывающего сайта 3 [10, 28]. Структурный элемент α -линкера, взаимодействующий с сайтом 3, был назван « α -hook». Расшифровка структуры автоингибиторной области и изучение механизмов ее функционирования показали, что функцией AID и следующего за ним линкерного участка является передача активирующего сигнала АМФ на каталитическую субъединицу киназы [10].

Современная картина процесса аллостерической активации выглядит следующим образом. Связывание АМФ по сайту 3 не нарушает взаимодействие « α -hook» с аминокислотами, образующими этот сайт. Полученный сигнал аллостерической активации, передаваясь по линкерной последовательности, приводит к разрыву взаимодействия AID с киназным доменом АМРК и дальнейшему переходу активационной петли в активную «закрытую» конформацию. В свою очередь связывание по сайту 3 молекулы АТФ, содержащей два дополнительных фосфатных остатка, не позволяет осуществить взаимодействие « α -hook» с γ -субъединицей в области сайта 3 ввиду стерических затруднений, что приводит к восстановлению связей между AID и киназным доменом и дальнейшему переходу в неактивную «открытую» конформацию [115].

Однако существует мнение, что сигнал, передаваемый по линкерной последовательности, служит для защиты от дефосфорилирования, в то время как для передачи сигнала аллостерической активации задействуется весь киназный комплекс, включая β -субъединицу [10]. Скорее всего, механизм аллостерической активации сложнее, чем представляется на сегодняшний день, поскольку существуют данные, что в стабилизации активной «закрытой» конформации также принимает участие гликоген-связывающий домен [114].

В течение долгого времени высказывались предположения, что воздействие на автоингибиторный домен может предоставлять возможность регуляции активности АМРК. Первым шагом в этом направлении стал высокопроизводительный скрининг по усеченному варианту α -субъединицы, содержащей только киназный и автоингибиторный домены. В результате было идентифицировано соединение РТ1 (рис. 3), которое проявило активность как по $\alpha 1$ -, так и по $\alpha 2$ -субъединице. Найденное соединение пока-

зало активность не только на белковых моделях, но и на клеточных линиях L6 и HeLa [116]. Последующие оптимизационные процедуры позволили получить соединение-лидер, проявляющее активность при испытаниях на животных, а также обладающее высокой биодоступностью и удовлетворительным ADMET (absorption, distribution, metabolism, excretion, toxicity) профилем [117].

Уже сейчас становится ясно, что рассмотрение автоингибиторного домена в качестве мишени является перспективным подходом к разработке прямых и селективных активаторов АМРК. Такое утверждение можно подкрепить недавней работой, в которой на базе РТ1 с помощью компьютерного моделирования был создан ингибитор А1D. Разработанное производное бензотиазола проявляет АМРК-опосредованный гипогликемический эффект как на клеточных, так и на мышинных моделях [118].

РОЛЬ АМРК В ПАТОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССАХ

Рассмотрев в предыдущих разделах достаточно разнообразный ряд соединений, активирующих АМРК, следует сказать и об областях, в которых подобная модуляция имеет терапевтическое значение. В первую очередь речь пойдет о применении низкомолекулярных соединений в качестве препаратов для лечения диабета 2-го типа, который характеризуется гипергликемией, обусловленной снижением чувствительности тканей к инсулину. При этом заболевании активация АМРК позволяет снизить уровень глюкозы в крови за счет улучшения ее усвоения путем непосредственной транслокации транспортеров семейства GLUT на плазматическую мембрану и увеличения уровня их экспрессии в виде долгосрочного эффекта [66, 68], а также снижения эндогенного производства глюкозы в печени [71]. Также отмечено, что стимуляция АМРК позволяет в некоторой степени смягчить такие проявления инсулинорезистентности, как повышенное накопление триглицеридов и митохондриальная дисфункция [119, 120].

Известно, что активность АМРК негативно регулируется за счет воздействия высоких концентраций глюкозы [38]. Острая гипергликемия нивелирует воздействие активирующих факторов в первую очередь в мышцах и печени, затем в почках [121, 122]. Подавление активности киназы на фоне высокого уровня глюкозы в крови приводит к сопутствующим метаболическим расстройствам, которые в совокупности с диабетом и ожирением называют метаболическим синдромом. Следует отметить, что в клетках печени, как

и в мышечных клетках доминирует экспрессия $\alpha 1\gamma 1$ -содержащего комплекса [87]. Исследования активации АМРК во время физических упражнений у пациентов с диабетом 2-го типа не только показали эффективность регулярных физических тренировок в снижении уровня глюкозы в крови, но и указали на перспективность такого подхода для лечения этого заболевания [34].

Как уже отмечалось выше, активация АМРК происходит также во время ишемии [32]. При таком патологическом состоянии, как ишемическая болезнь сердца, активация АМРК способствует защите кардиомиоцитов от повреждений во время ишемии и последующей реперфузии [123]. Для определения роли АМРК при ишемических повреждениях было создано большое количество моделей, основанных на инактивации киназы. При этом было показано, что фармакологическая активация АМРК представляет собой потенциальный терапевтический путь снижения размеров ишемического поражения, сохранения энергетических запасов, восстановления обмена веществ и сократительной функции после ишемии [124, 125]. Следует еще раз отметить, что непосредственной мишенью АМРК является эндотелиальная синтаза оксида азота, воздействие на которую определяет кардиопротекторный эффект [84]. В настоящее время для ряда существующих активаторов АМРК уже доказана эффективность при инфарктных состояниях [124, 125].

Желудочковая гипертрофия – еще одно заболевание, при котором активация АМРК может иметь значительный терапевтический эффект [126]. Данное состояние представляет собой адаптивную функцию уменьшения нагрузки на стенки при повышенном давлении в левом желудочке, которое может являться следствием гипертонии или быть связанным с заболеваниями клапанов сердца. Избыточное давление может привести к патологическому ремоделированию левого желудочка, и именно активация АМРК может скомпенсировать перегрузку и сдержать патологическую гипертрофию [127, 128].

Еще одной областью применения активаторов АМРК может стать лечение сердечной недостаточности. На моделях данного заболевания было показано, что использование таких АМРК активаторов, как метформин и AICAR, позволяет значительно уменьшить сократительную дисфункцию, апоптоз и фиброз [129]. Подобное лечение увеличивает выживаемость у пациентов с сердечной недостаточностью и диабетом 2-го типа [130]. АМРК, по-видимому, также играет роль в предотвращении сердечной недостаточности [131].

В связи с высокими энергетическими потребностями мозга и непереносимостью таких стрессовых состояний, как ишемия, гипоксия и энергетическое истощение, можно предположить, что АМРК играет важную роль в выживаемости нейронов [132]. Как было показано, активация АМРК при церебральной ишемии может усугубить поражение головного мозга [133, 134], однако использование активаторов АМРК эффективно для предотвращения инсультных состояний, а также восстановления после инсульта [135]. Стимуляция АМРК в преинсультный период определяет регулирование митохондриального биогенеза и апоптотических путей, что при ишемии головного мозга является нейропротекторным эффектом [136]. В период восстановления фармакологическая активация АМРК выражается в стимуляции нейрогенеза, ангиогенеза и улучшении функции головного мозга [137]. Таким образом, активаторы АМРК могут найти применение в качестве профилактических агентов при риске возникновения инсульта и также при терапии последствий ишемических поражений головного мозга.

АМРК И РАК

Разработка противоопухолевых препаратов является еще одной областью, в которой использование АМРК в качестве мишени может иметь терапевтическое применение. Как известно, в раковых клетках скорость метаболических процессов очень высока, и АМРК, как основной метаболический регулятор, является эффективным рычагом воздействия на их протекание. Чтобы показать, каким образом сложилась последовательность диабет — активация АМРК — рак, ниже приведен пример взаимосвязи между противодиабетическими и противораковыми препаратами.

Еще в средневековой Европе были отмечены гипогликемические свойства Козлятника лекарственного (*Galega officinalis*). Впоследствии из его экстракта были выделены два активных вещества — гуанидин и галегин (изопреновое производное гуанидина) [37]. На их основе в 1920-х гг. были разработаны два синтетических аналога — метформин и фенформин (рис. 3), которые наряду с галегинном успешно прошли клинические испытания [37]. Несмотря на то, что фенформин был снят с производства из-за опасного побочного действия [138], метформин до сих пор применяется для лечения диабета 2-го типа в качестве препарата первого выбора.

Долгое время механизм действия метформина оставался неизвестным, пока не было показа-

но, что он активирует АМРК в клетках печени [88]. Вскоре появились свидетельства в пользу того, что активация АМРК посредством метформина происходит косвенным путем. Установлено, что метформин ингибирует Комплекс I дыхательной цепи, таким образом, было доказано его действие на АМРК через ингибирование синтеза АТФ с последующим увеличением концентрации АМФ, что и является активирующим фактором [139, 140]. Несмотря на это некоторые исследователи не оставили попыток доказать прямое воздействие метформина на АМРК; наиболее интересной в этой области стала работа [141], в которой отражен факт взаимодействия метформина и γ -субъединицы киназы.

В последнее время неоднократно высказывались предположения о том, что для метформина существует АМРК-независимый путь реализации гипогликемического эффекта. На фоне этих предположений для метформина, как и для АICAR, было продемонстрировано снижение активности двух ферментов глюконеогенеза, G6Pase и PEPCK, при нокауте обеих каталитических субъединиц АМРК [142]. Действие метформина через альтернативный путь, связанный с цАМФ сигнальными механизмами, было показано в работе [143]. Таким образом, гипогликемическое действие метформина, по всей вероятности, определяется АМРК-независимым механизмом. Однако это не исключает того, что другие противодиабетические свойства метформина, такие как увеличение чувствительности тканей к инсулину, могут реализовываться через АМРК-зависимый путь.

Бигуаниды применяются в клинической практике более полувека. В связи с этим накопилось большое количество данных о применении этого класса лекарственных препаратов на фоне сопутствующих заболеваний. Анализ таких данных привел к заключению, что лечение диабета 2-го типа АМРК-активирующими препаратами существенно снижает риск возникновения раковых заболеваний [144], что особенно ярко проявилось в отношении рака кишечника и печени [145]. Эффект подавления онкогенеза на фоне диабета 2-го типа связан с этиологией данного заболевания, поскольку гипергликемия и гиперинсулинемия являются возможными механизмами стимуляции опухолевого роста [146]. Таким образом, можно сделать вывод, что АМРК-зависимые сигнальные пути регулируют онкосупрессорные процессы, а активация АМРК представляет собой способ защиты от опухолевой прогрессии. Таким замысловатым путем была показана возможная эффективность противодиабетических препаратов в борьбе с раковыми заболеваниями. Следует отметить, что мет-

формин в настоящее время находится на стадии клинических испытаний против рака груди [147].

Говоря о проявлениях онкосупрессорных функций АМПК, стоит напомнить о том, что основная активирующая киназа LKB1 является опухолевым супрессором. Несмотря на то, что помимо АМПК, LKB1 активирует двенадцать родственных киназ, полагают, что онкосупрессорное действие LKB1 опосредовано по большей части АМПК [148]. Через LKB1-АМПК путь происходит регуляция mTOR киназы, гиперэкспрессия которой наблюдается во многих типах рака. Данный сигнальный путь в раковых клетках может подавляться через мутации или инактивацию LKB1, что отражается на функциях АМПК [149].

В настоящее время принято выделять три основных направления, по которым АМПК реализует свою онкосупрессорную активность. Активация АМПК может привести к аресту клеточного цикла, что связано со стабилизацией p53 и ингибиторов циклин-зависимой киназы p21 и p27 [81, 82]. Переключая метаболизм с глюкозного на липидный, АМПК может подавлять эффект Варбурга, наблюдаемый в большинстве опухолевых клеток, который выражается в быстром усвоении глюкозы, повышенной скорости гликолиза и увеличенном выделении молочной кислоты во внеклеточную среду [150]. Активация АМПК приводит к подавлению HIF-1 α , транскрипционного фактора, управляющего экспрессией ферментов и транспортеров, реализующих эффект Варбурга [151]. Таким образом, противодействие эффекту Варбурга является еще одним проявлением онкосупрессорных функций АМПК. Помимо этого активация АМПК, как уже было сказано, приводит к угнетению анаболических процессов, а именно синтеза жирных кислот, триглицеридов, холестерина, гликогена, РНК и белков [69, 72, 77–79]. Ингибирование процессов образования «строительных молекул» естественно приводит к ингибированию клеточного роста в целом.

Все сказанное выше не только раскрывает взаимосвязь между АМПК, метаболическими расстройствами и раковыми заболеваниями, но и свидетельствует о том, что активация АМПК имеет высокий потенциал для разработки терапевтических подходов к лечению таких социально значимых заболеваний как диабет, инсульт, инфаркт, рак.

ИНГИБИТОРЫ АМПК

Известно, что наряду с проапоптотическими свойствами, АМПК может защищать клетки от апоптоза. В контексте раковых заболеваний та-

кую двойственность проявлений АМПК называют «палкой о двух концах» [38]. Являясь регулятором множественных метаболических путей, АМПК участвует в метаболическом перепрограммировании (эффект Варбурга), играя в этом процессе одну из основных ролей [152]. Таким образом, на определенных этапах развития рака ингибирование, а не активация АМПК, может являться потенциальным путем терапевтического вмешательства.

Во время длительных ишемических состояний, что наблюдается при инсультах, активация АМПК имеет губительные последствия для нейронов, что было подтверждено как ингибированием, так и генетической делецией АМПК [134]. Резкая активация АМПК при инсульте приводит к усугублению энергетического состояния и последующей метаболической катастрофе в ишемических нейронах. В связи с этим ингибирование АМПК во время острой фазы инсульта наряду со стимуляцией АМПК в прединсультный и восстановительный период представляет собой способ снижения размеров ишемического повреждения [153].

Недавно было установлено, что в ряде нейродегенеративных заболеваний происходит гиперактивация АМПК. Избыточное накопление фосфорилированной формы АМПК в церебральных нейронах было показано для ряда таупатий, к которым относятся болезнь Альцгеймера, прогрессирующий надъядерный парез зрения, кортикобазальная дегенерация, болезнь Пика и др. При этом считается, что АМПК может регулировать процесс нейродегенерации путем непосредственного фосфорилирования тау-белка [154]. Помимо этого гиперактивация АМПК может способствовать атрофии и последующей дегенерации нейронов при болезни Паркинсона [155], а также вызывать накопление α -синуклеина, что является отличительной чертой болезни Паркинсона и смежных расстройств [156]. Учитывая все сказанное, контроль степени активации АМПК может представлять собой новый способ регулирования нейродегенерации.

В отличие от активаторов АМПК, молекул, оказывающих ингибирующее воздействие на киназу, не так много. Наиболее известным является соединение, обозначаемое как «Compound C», производное пирозол[1,5-а]пиримидина. Compound C проявляет обратимое ингибирование АМПК, сопоставимое с действием АТФ [88]. Его использование, однако, ограничено ввиду неспособности подавить активацию АМПК в ответ на некоторые стимулы [157, 158], низкой селективности в ряду киназ [159] и недостаточной активности по отношению к α 1 изоформе [134]. Для этого соединения также был установлен

сайт связывания в α -субъединице и расшифрована структура сокристаллизованного комплекса с киназным доменом $\alpha 2$ изоформы [160]. Несмотря на все недостатки, Compound C является основным инструментом для изучения роли АМПК в различных биологических процессах.

Иодтуберцидин и аденина арабинозид (видарабин) также являются соединениями, ингибирующими АМПК. Иодтуберцидин, будучи синтетическим производным аденина, использовался для ингибирования АМПК *in vitro*. Также как и иодтуберцидин, аденина арабинозид ингибирует различные ферменты и киназы, включая АМПК [161, 162]. Однако их неспособность к ингибированию активации АМПК, вызванной мышечными сокращениями, ограничивает их применение даже в исследовательских целях [163].

Еще одно соединение – сунитиниб – было разработано как мультитаргетный ингибитор тирозин киназ. Одним из его выявленных побочных эффектов является кардиотоксичность, обусловленная ингибированием АМПК [164]. Позже было показано прямое ингибирующее действие сунитиниба на АМПК, при этом с помощью компьютерного моделирования был определен сайт связывания ингибитора по α -субъединице [165]. Данный препарат одобрен для

лечения двух типов рака (почечно-клеточного рака и иматиниб-резистентных гастроинтестинальных стромальных опухолей), клинические исследования для других типов опухолей в настоящее время продолжаются [166].

В связи со скромным набором известных соединений, ингибирующих АМПК, прилагаются усилия по модификации существующих структур с целью повышения активности и селективности по отношению к АМПК. Примером развития данного направления является разработка ингибитора АМПК с использованием методологии FBDD (Fragment-Based Drug Discovery) [167]. Полученное соединение оказалось более активным, чем Compound C, но также малоселективным, тем не менее подобный подход может представлять интерес в дальнейшем поиске и разработке модуляторов АМПК.

Приведенные здесь факты говорят о том, что не только активация, но и ингибирование АМПК может лечь в основу разработки лекарств, а модулирование сигнального каскада АМПК может стать эффективным терапевтическим подходом при лечении социально значимых заболеваний.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант 14-03-31592 мол_а) и Правительства РФ (грант 11.G34.31.0069 от 21.10.2011).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Davies, S.P., Hawley S.A., Woods, A., Carling, D., Haystead, T.A., and Hardie, D.G. (1994) Purification of the AMP-activated protein kinase on ATP-gammaspharose and analysis of its subunit structure, *Eur. J. Biochem.*, **223**, 351–357.
- Stein, S.C., Woods, A., Jones, N.A., Davison, M.D., and Carling, D. (2000) The regulation of AMP-activated protein kinase by phosphorylation, *Biochem. J.*, **345**, 437–443.
- Dyck, J.R., Gao, G., Widmer, J., Stapleton, D., Fernandez, C.S., Kemp, B.E., and Witters, L.A. (1996) Regulation of 5'-AMP-activated protein kinase activity by the noncatalytic beta and gamma subunits, *J. Biol. Chem.*, **271**, 17798–17803.
- Stapleton, D., Woollatt, E., Mitchelhill, K.I., Nicholl, J.K., Fernandez, C.S., Michell, B.J., Witters, L.A., Power, D.A., Sutherland, G.R., and Kemp, B.E. (1997) AMP-activated protein kinase isoenzyme family: subunit structure and chromosomal location, *FEBS Lett.*, **409**, 452–456.
- Mitchelhill, K.I., Stapleton, D., Gao, G., House, C., Michell, B., Katsis, F., Witters, L.A., and Kemp, B.E. (1994) AMP-activated protein kinase shares structural and functional homology with the catalytic domain of yeast Snf1 protein kinase, *J. Biol. Chem.*, **269**, 2361–1364.
- Crute, B.E., Seefeld, K., Gamble, J., Kemp, B.E., and Witters, L.A. (1998) Functional domains of the alpha catalytic subunit of the AMP-activated protein kinase, *J. Biol. Chem.*, **273**, 35347–35354.
- Hawley, S.A., Davison, M., Woods, A., Davies, S.P., Beri, R.K., Carling, D., and Hardie, D.G. (1996) Characterization of the AMP-activated protein kinase from rat liver and identification of threonine 172 as the major site at which it phosphorylates AMP-activated protein kinase, *J. Biol. Chem.*, **271**, 27879–27887.
- Little, D.R., Walker, J.R., Davis, T., Wybenga-Groot, L.E., Finerty, P.J. Jr., Newman, E., Mackenzie, F., and Dhe-Paganon, S. (2010) A conserved mechanism of autoinhibition for the AMPK kinase domain: ATP-binding site and catalytic loop refolding as a means of regulation, *Acta Crystallogr. F Struct. Biol. Cryst. Commun.*, **66**, 143–151.
- Thornton, C., Snowden, M.A., and Carling, D. (1998) Identification of a novel AMP-activated protein kinase beta subunit isoform that is highly expressed in skeletal muscle, *J. Biol. Chem.*, **273**, 12443–12450.
- 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., and Gamblin, S.J. (2011) Structure of mammalian AMPK and its regulation by ADP, *Nature*, **472**, 230–233.
- Salt, I., Celler, J.W., Hawley, S.A., Prescott, A., Woods, A., Carling, D., and Hardie, D.G. (1998) AMP-activated protein kinase: greater AMP dependence, and preferential nuclear localization, of complexes containing the alpha2 isoform, *Biochem. J.*, **334**, 177–187.

12. Kazgan, N., Williams, T., Forsberg, L.J., and Brenman, J.E. (2010) Identification of a nuclear export signal in the catalytic subunit of AMP-activated protein kinase, *Mol. Biol. Cell*, **21**, 3433–3442.
13. Woods, A., Cheung, P.C., Smith, F.C., Davison, M.D., Scott, J., Beri, R.K., and Carling, D. (1996) Characterization of AMP-activated protein kinase beta and gamma subunits. Assembly of the heterotrimeric complex *in vitro*, *J. Biol. Chem.*, **271**, 10282–10290.
14. Bieri, M., Mobbs, J.I., Koay, A., Louey, G., Mok, Y.F., Hatters, D.M., Park, J.T., Park, K.H., Neumann, D., Stapleton, D., and Gooley, P.R. (2012) AMP-activated protein kinase β -subunit requires internal motion for optimal carbohydrate binding, *Biophys. J.*, **102**, 305–314.
15. McBride, A., Ghilagaber, S., Nikolaev, A., and Hardie, D.G. (2009) The glycogen-binding domain on the AMPK beta subunit allows the kinase to act as a glycogen sensor, *Cell Metab.*, **9**, 23–34.
16. Iseli, T.J., Walter, M., van Denderen, B.J., Katsis, F., Witters, L.A., Kemp, B.E., Michell, B.J., and Stapleton, D. (2005) AMP-activated protein kinase beta subunit tethers alpha and gamma subunits via its C-terminal sequence (186–270), *J. Biol. Chem.*, **280**, 13395–13400.
17. Warden, S.M., Richardson, C., O'Donnell, J.Jr., Stapleton, D., Kemp, B.E., and Witters, L.A. (2001) Post-translational modifications of the beta-1 subunit of AMP-activated protein kinase affect enzyme activity and cellular localization, *Biochem. J.*, **354**, 275–283.
18. Moffat, C., and Harper, E.M. (2010) Metabolic functions of AMPK: aspects of structure and of natural mutations in the regulatory gammasubunits, *IUBMB Life*, **62**, 739–745.
19. Cheung, P.C., Salt, I.P., Davies, S.P., Hardie, D.G., and Carling, D. (2000) Characterization of AMP-activated protein kinase gammasubunit isoforms and their role in AMP binding, *Biochem. J.*, **346**, 659–669.
20. Scott, J.W., Hawley, S.A., Green, K.A., Anis, M., Stewart, G., Scullion, G.A., Norman, D.G., and Hardie, D.G. (2004) CBS domains form energy-sensing modules whose binding of adenosine ligands is disrupted by disease mutations, *J. Clin. Invest.*, **113**, 274–284.
21. Viana, R., Towler, M.C., Pan, D.A., Carling, D., Viollet, B., Hardie, D.G., and Sanz, P. (2007) A conserved sequence immediately N-terminal to the Bateman domains in AMP-activated protein kinase gamma subunits is required for the interaction with the beta subunits, *J. Biol. Chem.*, **282**, 16117–16125.
22. Chen, L., Jiao, Z.H., Zheng, L.S., Zhang, Y.Y., Xie, S.T., Wang, Z.X., and Wu, J.W. (2009) Structural insight into the autoinhibition mechanism of AMP-activated protein kinase, *Nature*, **459**, 1146–1149.
23. Rudolph, M.J., Amodeo, G.A., and Tong, L. (2010) An inhibited conformation for the protein kinase domain of the *Saccharomyces cerevisiae* AMPK homolog Snf1, *Acta Crystallogr. F Struct. Biol. Cryst. Commun.*, **66**, 999–1002.
24. Townley, R., and Shapiro, L. (2007) Crystal structures of the adenylate sensor from fission yeast AMP-activated protein kinase, *Science*, **315**, 1726–1729.
25. 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., and Gamblin, S.J. (2007) Structural basis for AMP binding to mammalian AMP-activated protein kinase, *Nature*, **449**, 496–500.
26. Mayer, F.V., Heath, R., Underwood, E., Sanders, M.J., Carmena, D., McCartney, R.R., Leiper, F.C., Xiao, B., Jing, C., Walker, P.A., Haire, L.F., Ogrodzowicz, R., Martin, S.R., Schmidt, M.C., Gamblin, S.J., and Carling, D. (2011) ADP regulates SNF1, the *Saccharomyces cerevisiae* homolog of AMP-activated protein kinase, *Cell Metab.*, **14**, 707–714.
27. Amodeo, G.A., Rudolph, M.J., and Tong, L. (2007) Crystal structure of the heterotrimer core of *Saccharomyces cerevisiae* AMPK homologue SNF1, *Nature*, **449**, 492–455.
28. Chen, L., Xin, F.J., Wang, J., Hu, J., Zhang, Y.Y., Wan, S., Cao, L.S., Lu, C., Li, P., Yan, S.F., Neumann, D., Schlattner, U., Xia, B., Wang, Z.X., and Wu, J.W. (2013) Conserved regulatory elements in AMPK, *Nature*, **498**, 8–10.
29. Ghillebert, R., Swinnen, E., Wen, J., Vandesteene, L., Ramon, M., Norga, K., Rolland, F., and Winderickx, J. (2011) The AMPK/SNF1/SnRK1 fuel gauge and energy regulator: structure, function and regulation, *FEBS J.*, **278**, 3978–3990.
30. Hardie, D.G., and Hawley, S.A. (2001) AMP-activated protein kinase: the energy charge hypothesis revisited, *Bioessays*, **23**, 1112–1119.
31. Mungai, P.T., Waypa, G.B., Jairaman, A., Prakriya, M., Dokic, D., Ball, M.K., and Schumacker, P.T. (2011) Hypoxia triggers AMPK activation through reactive oxygen species-mediated activation of calcium release-activated calcium channels, *Mol. Cell Biol.*, **31**, 3531–3545.
32. Marsin, A.S., Bertrand, L., Rider, M.H., Deprez, J., Beauloye, C., Vincent, M.F., Van den Berghe, G., Carling, D., and Hue, L. (2000) Phosphorylation and activation of heart PFK-2 by AMPK has a role in the stimulation of glycolysis during ischaemia, *Curr. Biol.*, **10**, 1247–1255.
33. Wu, S.B., and Wei, Y.H. (2012) AMPK-mediated increase of glycolysis as an adaptive response to oxidative stress in human cells: implication of the cell survival in mitochondrial diseases, *Biochim. Biophys. Acta*, **1822**, 233–247.
34. Musi, N., Fujii, N., Hirshman, M.F., Ekberg, I., Froberg, S., Ljungqvist, O., Thorell, A., and Goodyear, L.J. (2001) AMP-activated protein kinase (AMPK) is activated in muscle of subjects with type 2 diabetes during exercise, *Diabetes*, **50**, 921–927.
35. Johnson, L.N., Noble, M.E., and Owen, D.J. (1996) Active and inactive protein kinases: structural basis for regulation, *Cell*, **85**, 149–158.
36. Suter, M., Riek, U., Tuerk, R., Schlattner, U., Wallimann, T., Neumann, D. (2006) Dissecting the role of 5'-AMP for allosteric stimulation, activation, and deactivation of AMP-activated protein kinase, *J. Biol. Chem.*, **281**, 32207–32216.
37. Hardie, D.G., Ross, F.A., and Hawley, S.A. (2012) AMP-activated protein kinase: a target for drugs both ancient and modern, *Chem. Biol.*, **19**, 1222–1236.
38. Viollet, B., Horman, S., Leclerc, J., Lantier, L., Foretz, M., Billaud, M., Giri, S., and Andreelli, F. (2010) AMPK inhibition in health and disease, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, **45**, 276–295.
39. Sanders, M.J., Grondin, P.O., Hegarty, B.D., Snowden, M.A., and Carling, D. (2007) Investigating the mechanism for AMP activation of the AMP-activated protein kinase cascade, *Biochem. J.*, **403**, 139–148.
40. Chen, L., Wang, J., Zhang, Y.Y., Yan, S.F., Neumann, D., Schlattner, U., Wang, Z.X., and Wu, J.W. (2012) AMP-activated protein kinase undergoes nucleotide-dependent conformational changes, *Nature Struct. Mol. Biol.*, **19**, 716–719.
41. Oakhill, J.S., Chen, Z.P., Scott, J.W., Steel, R., Castelli, L.A., Ling, N., Macaulay, S.L., and Kemp, B.E. (2010) β -Subunit myristoylation is the gatekeeper for initiating metabolic stress sensing by AMP-activated protein kinase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 19237–19241.
42. Jin, X., Townley, R., and Shapiro, L. (2007) Structural insight into AMPK regulation: ADP comes into play, *Structure*, **15**, 1285–1295.
43. Shaw, R.J., Kosmatka, M., Bardeesy, N., Hurley, R.L., Witters, L.A., DePinho, R.A., and Cantley, L.C. (2004)

- The tumor suppressor LKB1 kinase directly activates AMP-activated kinase and regulates apoptosis in response to energy stress, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 3329–3335.
44. Woods, A., Dickerson, K., Heath, R., Hong, S.P., Momcilovic, M., Johnstone, S.R., Carlson, M., and Carling, D. (2005) Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta acts upstream of AMP-activated protein kinase in mammalian cells, *Cell Metab.*, **2**, 21–33.
 45. Momcilovic, M., Hong, S.P., and Carlson, M. (2006) Mammalian TAK1 activates Snf1 protein kinase in yeast and phosphorylates AMP-activated protein kinase *in vitro*, *J. Biol. Chem.*, **281**, 25336–25343.
 46. Woods, A., Johnstone, S.R., Dickerson, K., Leiper, F.C., Fryer, L.G., Neumann, D., Schlattner, U., Wallimann, T., Carlson, M., and Carling, D. (2003) LKB1 is the upstream kinase in the AMP-activated protein kinase cascade, *Curr. Biol.*, **13**, 2004–2008.
 47. Baas, A.F., Boudeau, J., Sapkota, G.P., Smit, L., Medema, R., Morrice, N.A., Alessi, D.R., and Clevers, H.C. (2003) Activation of the tumour suppressor kinase LKB1 by the STE20-like pseudokinase STRAD, *EMBO J.*, **22**, 3062–3072.
 48. Boudeau, J., Baas, A.F., Deak, M., Morrice, N.A., Kieloch, A., Schutowski, M., Prescott, A.R., Clevers, H.C., and Alessi, D.R. (2003) MO25 α/β interact with STRAD α/β enhancing their ability to bind, activate and localize LKB1 in the cytoplasm, *EMBO J.*, **22**, 5102–5104.
 49. McInnes, K.J., Brown, K.A., Hunger, N.I., and Simpson, E.R. (2012) Regulation of LKB1 expression by sex hormones in adipocytes, *Int. J. Obes.*, **36**, 982–985.
 50. Brown, K.A., McInnes, K.J., Takagi, K., Ono, K., Hunger, N.I., Wang, L., Sasano, H., and Simpson, E.R. (2011) LKB1 expression is inhibited by estradiol-17 β in MCF-7 cells, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **127**, 439–443.
 51. Marignani, P.A. (2005) LKB1, the multitasking tumour suppressor kinase, *J. Clin. Pathol.*, **58**, 15–19.
 52. Ji, H., Ramsey, M.R., Hayes, D.N., Fan, C., McNamara, K., Kozlowski, P., Torrice, C., Wu, M.C., Shimamura, T., Perera, S.A., Liang, M.C., Cai, D., Naumov, G.N., Bao, L., Contreras, C.M., Li, D., Chen, L., Krishnamurthy, J., Koivunen, J., Chirieac, L.R., Padera, R.F., Bronson, R.T., Lindeman, N.I., Christiani, D.C., Lin, X., Shapiro, G.I., Janne, P.A., Johnson, B.E., Meyerson, M., Kwiatkowski, D.J., Castrillon, D.H., Bardeesy, N., Sharpless, N.E., and Wong, K.K. (2007) LKB1 modulates lung cancer differentiation and metastasis, *Nature*, **448**, 807–810.
 53. 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., and Alessi, D.R. (2004) LKB1 is a master kinase that activates 13 protein kinases of the AMPK subfamily, including the MARK/PAR-1 kinases, *EMBO J.*, **23**, 833–843.
 54. Hawley, S.A., Boudeau, J., Reid, J.L., Mustard, K.J., Udd, L., Makela, T.P., Alessi, D.R., and Hardie, D.G. (2003) Complexes between the LKB1 tumor suppressor, STRAD α/β and MO25 α/β are upstream kinases in the AMP-activated protein kinase cascade, *J. Biol.*, **2**, 28.
 55. Hurley, R.L., Anderson, K.A., Franzone, J.M., Kemp, B.E., Means, A.R., and Witters, L.A. (2005) The Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinases are AMP-activated protein kinase kinases, *J. Biol. Chem.*, **280**, 29060–29066.
 56. Hawley, S.A., Pan, D.A., Mustard, K.J., Ross, L., Bain, J., Edelman, A.M., Frenguelli, B.G., and Hardie, D.G. (2005) Calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta is an alternative upstream kinase for AMP-activated protein kinase, *Cell Metab.*, **2**, 9–19.
 57. Stahmann, N., Woods, A., Carling, D., and Heller, R. (2006) Thrombin activates AMP-activated protein kinase in endothelial cells via a pathway involving Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinase b, *Mol. Cell Biol.*, **26**, 5933–5945.
 58. Tamas, P., Hawley, S.A., Clarke, R.G., Mustard, K.J., Green, K., Hardie, D.G., and Cantrell, D.A. (2006) Regulation of the energy sensor AMP-activated protein kinase by antigen receptor and Ca²⁺ in T lymphocytes, *J. Exp. Med.*, **203**, 1665–1670.
 59. Xie, M., Zhang, D., Dyck, J.R., Li, Y., Zhang, H., Morishima, M., Mann, D.L., Taffet, G.E., Baldini, A., Khoury, D.S., and Schneider, M.D. (2006) 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*, **103**, 17378–17383.
 60. Chida, T., Ando, M., Matsuki, T., Masu, Y., Nagaura, Y., Takano-Yamamoto, T., Tamura, S., and Kobayashi, T. (2013) N-Myristoylation is essential for protein phosphatases PPM1A and PPM1B to dephosphorylate their physiological substrates in cells, *Biochem. J.*, **449**, 741–749.
 61. Steinberg, G.R., and Kemp, B.E. (2009) AMPK in health and disease, *Physiol. Rev.*, **89**, 1025–1078.
 62. Hurley, R.L., Barre, L.K., Wood, S.D., Anderson, K.A., Kemp, B.E., Means, A.R., and Witters, L.A. (2006) Regulation of AMP-activated protein kinase by multisite phosphorylation in response to agents that elevate cellular cAMP, *J. Biol. Chem.*, **281**, 36662–36672.
 63. 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., and Boeke, J.D. (2012) Functional dissection of lysine deacetylases reveals that HDAC1 and p300 regulate AMPK, *Nature*, **482**, 251–255.
 64. Kola, B., Boscaro, M., Rutter, G.A., Grossman, A.B., and Korbonits, M. (2006) Expanding role of AMPK in endocrinology, *Trends Endocrinol. Metab.*, **17**, 205–215.
 65. Stark, R., Ashley, S.E., and Andrews, Z.B. (2013) AMPK and the neuroendocrine regulation of appetite and energy expenditure, *Mol. Cell Endocrinol.*, **366**, 215–223.
 66. Frosig, C., Pehmoller, C., Birk, J.B., Richter, E.A., and Wojtaszewski, J.F. (2010) Exercise-induced TBC1D1 Ser237 phosphorylation and 14-3-3 protein binding capacity in human skeletal muscle, *J. Physiol.*, **588**, 4539–4548.
 67. Barnes, K., Ingram, J.C., Porras, O.H., Barros, L.F., Hudson, E.R., Fryer, L.G., Fougelle, F., Carling, D., Hardie, D.G., and Baldwin, S.A. (2002) Activation of GLUT1 by metabolic and osmotic stress: potential involvement of AMP-activated protein kinase (AMPK), *J. Cell Sci.*, **115**, 2433–2442.
 68. McGee, S.L., van Denderen, B.J., Howlett, K.F., Mollica, J., Schertzer, J.D., Kemp, B.E., and Hargreaves, M. (2008) AMP-activated protein kinase regulates GLUT4 transcription by phosphorylating histone deacetylase 5, *Diabetes*, **57**, 860–867.
 69. Jorgensen, S.B., Nielsen, J.N., Birk, J.B., Olsen, G.S., Viollet, B., Andreelli, F., Schjerling, P., Vaulont, S., Hardie, D.G., Hansen, B.F., Richter, E.A., and Wojtaszewski, J.F. (2004) The alpha2-5'-AMP-activated protein kinase is a site 2 glycogen synthase kinase in skeletal muscle and is responsive to glucose loading, *Diabetes*, **53**, 3074–3081.
 70. Marsin, A.S., Bertrand, L., Rider, M.H., Deprez, J., Beauloye, C., Vincent, M.F., Van den Berghe, G., Carling, D., and Hue, L. (2000) Phosphorylation and activation of heart PFK-2 by AMPK has a role in the stimulation of glycolysis during ischaemia, *Curr. Biol.*, **10**, 1247–1255.
 71. Lochhead, P.A., Salt, I.P., Walker, K.S., Hardie, D.G., and Sutherland, C. (2000) 5-aminoimidazole-4-carboxamide riboside mimics the effects of insulin on the expression of the 2 key gluconeogenic genes PEPCK and glucose-6-phosphatase, *Diabetes*, **49**, 896–903.

72. Davies, S.P., Carling, D., Munday, M.R., and Hardie, D.G. (1992) Diurnal rhythm of phosphorylation of rat liver acetyl-CoA carboxylase by the AMP-activated protein kinase, demonstrated using freeze-clamping. Effects of high fat diets, *Eur. J. Biochem.*, **203**, 615–623.
73. Li, Y., Xu, S., Mihaylova, M.M., Zheng, B., Hou, X., Jiang, B., Park, O., Luo, Z., Lefai, E., Shyy, J.Y., Gao, B., Wierzbicki, M., Verbeuren, T.J., Shaw, R.J., Cohen, R.A., and Zang, M. (2011) AMPK phosphorylates and inhibits SREBP activity to attenuate hepatic steatosis and atherosclerosis in diet-induced insulin-resistant mice, *Cell Metab.*, **13**, 376–388.
74. Merrill, G.F., Kurth, E.J., Hardie, D.G., and Winder, W.W. (1997) AICA riboside increases AMP-activated protein kinase, fatty acid oxidation, and glucose uptake in rat muscle, *Am. J. Physiol.*, **273**, 1107–1112.
75. Habets, D.D., Coumans, W.A., El Hasnaoui, M., Zarrinpashneh, E., Bertrand, L., Viollet, B., Kiens, B., Jensen, T.E., Richter, E.A., Bonen, A., Glatz, J.F., and Luiken, J.J. (2009) Crucial role for LKB1 to AMPK α 2 axis in the regulation of CD36-mediated long-chain fatty acid uptake into cardiomyocytes, *Biochim. Biophys. Acta*, **1791**, 212–219.
76. Daval, M., Diot-Dupuy, F., Bazin, R., Hainault, I., Viollet, B., Vaulont, S., Hajduch, E., Ferre, P., and Foufelle, F. (2005) Anti-lipolytic action of AMP-activated protein kinase in rodent adipocytes, *J. Biol. Chem.*, **280**, 25250–25257.
77. Clarke, P.R., and Hardie, D.G. (1990) Regulation of HMG-CoA reductase: identification of the site phosphorylated by the AMP-activated protein kinase *in vitro* and in intact rat liver, *EMBO J.*, **9**, 2439–2446.
78. Muoio, D.M., Seefeld, K., Witters, L.A., and Coleman, R.A. (1999) AMP-activated kinase reciprocally regulates triacylglycerol synthesis and fatty acid oxidation in liver and muscle: evidence that sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase is a novel target, *Biochem. J.*, **338**, 783–791.
79. Inoki, K., Zhu, T., and Guan, K.L. (2003) TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival, *Cell*, **115**, 577–590.
80. Browne, G.J., Finn, S.G., and Proud, C.G. (2004) Stimulation of the AMP-activated protein kinase leads to activation of eukaryotic elongation factor 2 kinase and to its phosphorylation at a novel site, serine 398, *J. Biol. Chem.*, **279**, 12220–12231.
81. Jones, R.G., Plas, D.R., Kubek, S., Buzzai, M., Mu, J., Xu, Y., Birnbaum, M.J., and Thompson, C.B. (2005) AMP-activated protein kinase induces a p53-dependent metabolic checkpoint, *Mol. Cell*, **18**, 283–293.
82. Liang, J., Shao, S.H., Xu, Z.X., Hennessy, B., Ding, Z., Larrea, M., Kondo, S., Dumont, D.J., Gutterman, J.U., Walker, C.L., Slingerland, J.M., and Mills, G.B. (2007) The energy sensing LKB1-AMPK pathway regulates p27(kip1) phosphorylation mediating the decision to enter autophagy or apoptosis, *Nature Cell Biol.*, **9**, 218–224.
83. Greer, E.L., Oskoui, P.R., Banko, M.R., Maniar, J.M., Gygi, M.P., Gygi, S.P., and Brunet, A. (2007) The energy sensor AMP-activated protein kinase directly regulates the mammalian FOXO3 transcription factor, *J. Biol. Chem.*, **282**, 30107–30119.
84. Procopio, C., Andreozzi, F., Laratta, E., Cassese, A., Beguinot, F., Arturi, F., Hribal, M.L., Perticone, F., and Sesti, G. (2009) Leptin-stimulated endothelial nitric-oxide synthase via an adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase/Akt signaling pathway is attenuated by interaction with C-reactive protein, *Endocrinology*, **150**, 3584–3593.
85. Lin, J., Handschin, C., and Spiegelman, B.M. (2005) Metabolic control through the PGC-1 family of transcription coactivators, *Cell Metab.*, **1**, 361–370.
86. Stapleton, D., Mitchelhill, K.I., Gao, G., Widmer, J., Michell, B.J., Teh, T., House, C.M., Fernandez, C.S., Cox, T., Witters, L.A., and Kemp, B.E. (1996) Mammalian AMP-activated protein kinase subfamily, *J. Biol. Chem.*, **271**, 611–614.
87. Kim, M., and Tian, R. (2011) Targeting AMPK for cardiac protection: opportunities and challenges, *J. Mol. Cell Cardiol.*, **51**, 548–553.
88. Zhou, G., Myers, R., Li, Y., Chen, Y., Shen, X., Fenyk-Melody, J., Wu, M., Ventre, J., Doebber, T., Fujii, N., Musi, N., Hirshman, M.F., Goodyear, L.J., and Moller, D.E. (2001) Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action, *J. Clin. Invest.*, **108**, 1167–1174.
89. Breen, D.M., Sanli, T., Giacca, A., and Tsiani, E. (2008) Stimulation of muscle cell glucose uptake by resveratrol through sirtuins and AMPK, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **374**, 117–122.
90. Lee, Y.S., Kim, W.S., Kim, K.H., Yoon, M.J., Cho, H.J., Shen, Y., Ye, J.M., Lee, C.H., Oh, W.K., Kim, C.T., Hohnen-Behrens, C., Gosby, A., Kraegen, E.W., James, D.E., and Kim, J.B. (2006) Berberine, a natural plant product, activates AMP-activated protein kinase with beneficial metabolic effects in diabetic and insulin-resistant states, *Diabetes*, **55**, 2256–2264.
91. Li, H.B., Ge, Y.K., Zheng, X.X., and Zhang, L. (2008) Salidroside stimulated glucose uptake in skeletal muscle cells by activating AMP-activated protein kinase, *Eur. J. Pharmacol.*, **588**, 165–169.
92. Gruzman, A., Shamni, O., Ben Yakir, M., Sandovski, D., Elgart, A., Alpert, E., Cohen, G., Hoffman, A., Katzhendler, Y., Cerasi, E., and Sasson, S. (2008) Novel D-xylose derivatives stimulate muscle glucose uptake by activating AMP-activated protein kinase alpha, *J. Med. Chem.*, **51**, 8096–8108.
93. Ahn, J., Lee, H., Kim, S., Park, J., and Ha, T. (2008) The anti-obesity effect of quercetin is mediated by the AMPK and MAPK signaling pathways, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **373**, 545–549.
94. Hwang, J.T., Park, I.J., Shin, J.I., Lee, Y.K., Lee, S.K., Baik, H.W., Ha, J., and Park, O.J. (2005) Genistein, EGCG, and capsaicin inhibit adipocyte differentiation process via activating AMP-activated protein kinase, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **338**, 694–699.
95. Kim, T., Davis, J., Zhang, A.J., He, X., and Mathews, S.T. (2009) Curcumin activates AMPK and suppresses gluconeogenic gene expression in hepatoma cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **388**, 377–382.
96. Kulkarni, S.S., Karlsson, H.K., Szekeres, F., Chibalin, A.V., Krook, A., and Zierath, J.R. (2011) Suppression of 5'-nucleotidase enzymes promotes AMP-activated protein kinase (AMPK) phosphorylation and metabolism in human and mouse skeletal muscle, *J. Biol. Chem.*, **286**, 34567–34574.
97. Hawley, S.A., Ross, F.A., Chevzoff, C., Green, K.A., Evans, A., Fogarty, S., Towler, M.C., Brown, L.J., Ogunbayo, O.A., Evans, A.M., and Hardie, D.G. (2010) Use of cells expressing gamma subunit variants to identify diverse mechanisms of AMPK activation, *Cell Metab.*, **11**, 554–565.
98. Gruzman, A., Babai, G., and Sasson, S. (2009) Adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK) as a new target for antidiabetic drugs: a review on metabolic, pharmacological and chemical considerations, *Rev. Diabet. Stud.*, **6**, 13–36.
99. Lehmann, J.M., Moore, L.B., Smith-Oliver, T.A., Wilkison, W.O., Willson, T.M., and Kliewer, S.A. (1995) An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma), *J. Biol. Chem.*, **270**, 12953–12956.

100. Fryer, L.G., Parbu-Patel, A., and Carling, D. (2002) The anti-diabetic drugs rosiglitazone and metformin stimulate AMP-activated protein kinase through distinct signaling pathways, *J. Biol. Chem.*, **277**, 25226–25232.
101. Krentz, A.J., Bailey, C.J., and Melander, A. (2000) Thiazolidinediones for type 2 diabetes. New agents reduce insulin resistance but need long term clinical trials, *BMJ*, **321**, 252–253.
102. Corton, J.M., Gillespie, J.G., Hawley, S.A., and Hardie, D.G. (1995) 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside. A specific method for activating AMP-activated protein kinase in intact cells, *Eur. J. Biochem.*, **229**, 558–565.
103. Lihn, A.S., Pedersen, S.B., Lund, S., and Richelsen, B. (2008) The anti-diabetic AMPK activator AICAR reduces IL-6 and IL-8 in human adipose tissue and skeletal muscle cells, *Mol. Cell Endocrinol.*, **292**, 36–41.
104. Narkar, V.A., Downes, M., Yu, R.T., Embler, E., Wang, Y.X., Banayo, E., Mihaylova, M.M., Nelson, M.C., Zou, Y., Juguilon, H., Kang, H., Shaw, R.J., and Evans, R.M. (2008) AMPK and PPARdelta agonists are exercise mimetics, *Cell*, **134**, 405–415.
105. Guigas, B., Sakamoto, K., Taleux, N., Reyna, S.M., Musi, N., Viollet, B., and Hue, L. (2009) Beyond AICAR riboside: in search of new specific AMP-activated protein kinase activators, *IUBMB Life*, **61**, 18–26.
106. Cool, B., Zinker, B., Chiou, W., Kifle, L., Cao, N., Perham, M., Dickinson, R., Adler, A., Gagne, G., Iyengar, R., Zhao, G., Marsh, K., Kym, P., Jung, P., Camp, H.S., and Frevert, E. (2006) Identification and characterization of a small molecule AMPK activator that treats key components of type 2 diabetes and the metabolic syndrome, *Cell Metab.*, **3**, 403–416.
107. Goransson, O., McBride, A., Hawley, S.A., Ross, F.A., Shpiro, N., Foretz, M., Viollet, B., Hardie, D.G., and Sakamoto, K. (2007) Mechanism of action of A-769662, a valuable tool for activation of AMP-activated protein kinase, *J. Biol. Chem.*, **282**, 32549–32560.
108. Scott, J.W., van Denderen, B.J., Jorgensen, S.B., Honeyman, J.E., Steinberg, G.R., Oakhill, J.S., Iseli, T.J., Koay, A., Gooley, P.R., Stapleton, D., and Kemp, B.E. (2008) Thienopyridone drugs are selective activators of AMP-activated protein kinase beta1-containing complexes, *Chem. Biol.*, **15**, 1220–1230.
109. Mirguet, O., Sautet, S., Clement, C.A., Toum, J., Donche, F., Marques, C., Rondet, E., Pizzonero, M., Beaufils, B., Dudit, Y., Huet, P., Trottet, L., Grondin, P., Brusq, J.M., Boursier, E., Saintillan, Y., and Nicodeme, E. (2013) Discovery of pyridones as oral AMPK direct activators, *ACS Med. Chem. Lett.*, **4**, 632–636.
110. Choi, J., He, N., Sung, M.K., Yang, Y., and Yoon, S. (2011) Sanguinarine is an allosteric activator of AMP-activated protein kinase, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **413**, 259–263.
111. Scott, J.W., Ross, F.A., Liu, J.K., and Hardie, D.G. (2007) Regulation of AMP-activated protein kinase by a pseudosubstrate sequence on the gamma subunit, *EMBO J.*, **26**, 806–815.
112. Pang, T., Xiong, B., Li, J.Y., Qiu, B.Y., Jin, G.Z., Shen, J.K., and Li, J. (2007) Conserved alpha-helix acts as autoinhibitory sequence in AMP-activated protein kinase alpha subunits, *J. Biol. Chem.*, **282**, 495–506.
113. Peng, C., and Head-Gordon, T. (2011) The dynamical mechanism of auto-inhibition of AMP-activated protein kinase, *PLoS Comput. Biol.*, **7**, e1002082.
114. Xiao, B., Sanders, M.J., Carmena, D., Bright, N.J., Haire, L.F., Underwood, E., Patel, B.R., Heath, R.B., Walker, P.A., Hallen, S., Giordanetto, F., Martin, S.R., Carling, D., and Gamblin, S.J. (2013) Structural basis of AMPK regulation by small molecule activators, *Nat. Commun.*, **4**, 3017.
115. Zhu, L., Chen, L., Zhou, X.M., Zhang, Y.Y., Zhang, Y.J., Zhao, J., Ji, S.R., Wu, J.W., and Wu, Y. (2011) Structural insights into the architecture and allostery of full-length AMP-activated protein kinase, *Structure*, **19**, 515–522.
116. Pang, T., Zhang, Z.S., Gu, M., Qiu, B.Y., Yu, L.F., Cao, P.R., Shao, W., Su, M.B., Li, J.Y., Nan, F.J., and Li, J. (2008) Small molecule antagonizes autoinhibition and activates AMP-activated protein kinase in cells, *J. Biol. Chem.*, **283**, 16051–16060.
117. Yu, L.F., Li, Y.Y., Su, M.B., Zhang, M., Zhang, W., Zhang, L.N., Pang, T., Zhang, R.T., Liu, B., Li, J.Y., Li, J., and Nan, F.J. (2013) Development of novel alkene oxindole derivatives as orally efficacious AMP-activated protein kinase activators, *ACS Med. Chem. Lett.*, **4**, 475–480.
118. Meltzer-Mats, E., Babai-Shani, G., Pasternak, L., Uritsky, N., Getter, T., Viskind, O., Eckel, J., Cerasi, E., Senderowitz, H., Sasson, S., and Gruzman, A. (2013) Synthesis and mechanism of hypoglycemic activity of benzothiazole derivatives, *J. Med. Chem.*, **56**, 5335–5350.
119. Kelley, D.E., Goodpaster, B.H., and Storlien, L. (2002) Muscle triglyceride and insulin resistance, *Annu. Rev. Nutr.*, **22**, 325–346.
120. Lowell, B.B., and Shulman, G.I. (2005) Mitochondrial dysfunction and type 2 diabetes, *Science*, **307**, 384–387.
121. Kraegen, E.W., Saha, A.K., Preston, E., Wilks, D., Hoy, A.J., Cooney, G.J., and Ruderman, N.B. (2006) 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.*, **290**, 471–479.
122. Lee, M.J., Feliers, D., Mariappan, M.M., Sataranatarajan, K., Mahimainathan, L., Musi, N., Foretz, M., Viollet, B., Weinberg, J.M., Choudhury, G.G., and Kasinath, B.S. (2007) A role for AMP-activated protein kinase in diabetes-induced renal hypertrophy, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **292**, 617–627.
123. Russell, R.R. 3rd, Li, J., Coven, D.L., Pypaert, M., Zechner, C., Palmeri, M., Giordano, F.J., Mu, J., Birnbaum, M.J., and Young, L.H. (2004) AMP-activated protein kinase mediates ischemic glucose uptake and prevents postischemic cardiac dysfunction, apoptosis, and injury, *J. Clin. Invest.*, **114**, 495–503.
124. Calvert, J.W., Gundewar, S., Jha, S., Greer, J.J., Bestermann, W.H., Tian, R., and Lefer, D.J. (2008) Acute metformin therapy confers cardioprotection against myocardial infarction via AMPK-eNOS-mediated signaling, *Diabetes*, **57**, 696–705.
125. Kim, A.S., Miller, E.J., Wright, T.M., Li, J., Qi, D., Atsina, K., Zaha, V., Sakamoto, K., and Young, L.H. (2011) A small molecule AMPK activator protects the heart against ischemia-reperfusion injury, *J. Mol. Cell Cardiol.*, **51**, 24–32.
126. Chan, A.Y., Soltys, C.L., Young, M.E., Proud, C.G., and Dyck, J.R. (2004) Activation of AMP-activated protein kinase inhibits protein synthesis associated with hypertrophy in the cardiac myocyte, *J. Biol. Chem.*, **279**, 32771–32779.
127. Li, H.L., Yin, R., Chen, D., Liu, D., Wang, D., Yang, Q., and Dong, Y.G. (2007) Long-term activation of adenosine monophosphate-activated protein kinase attenuates pressure-overload-induced cardiac hypertrophy, *J. Cell Biochem.*, **100**, 1086–1099.
128. Zhang, P., Hu, X., Xu, X., Fassett, J., Zhu, G., Viollet, B., Xu, W., Wiczer, B., Bernlohr, D.A., Bache, R.J., and Chen, Y. (2008) AMP activated protein kinase-alpha2 deficiency exacerbates pressure-overload-induced left

- ventricular hypertrophy and dysfunction in mice, *Hypertension*, **52**, 918–924.
129. Sasaki, H., Asanuma, H., Fujita, M., Takahama, H., Wakeno, M., Ito, S., Ogai, A., Asakura, M., Kim, J., Minamino, T., Takashima, S., Sanada, S., Sugimachi, M., Komamura, K., Mochizuki, N., and Kitakaze, M. (2009) Metformin prevents progression of heart failure in dogs: role of AMP-activated protein kinase, *Circulation*, **119**, 2568–2577.
 130. Aguilar, D., Chan, W., Bozkurt, B., Ramasubbu, K., and Deswal, A. (2011) Metformin use and mortality in ambulatory patients with diabetes and heart failure, *Circ. Heart Fail.*, **4**, 53–58.
 131. Gundewar, S., Calvert, J.W., Jha, S., Toedt-Pingel, I., Ji, S.Y., Nunez, D., Ramachandran, A., Anaya-Cisneros, M., Tian, R., and Lefer, D.J. (2009) Activation of AMP-activated protein kinase by metformin improves left ventricular function and survival in heart failure, *Circ. Res.*, **104**, 403–411.
 132. Ronnett, G.V., Ramamurthy, S., Kleman, A.M., Landree, L.E., and Aja, S. (2009) AMPK in the brain: its roles in energy balance and neuroprotection, *J. Neurochem.*, **109**, 17–23.
 133. McCullough, L.D., Zeng, Z., Li, H., Landree, L.E., McFadden, J., and Ronnett, G.V. (2005) Pharmacological inhibition of AMP-activated protein kinase provides neuroprotection in stroke, *J. Biol. Chem.*, **280**, 20493–20502.
 134. Li, J., Zeng, Z., Viollet, B., Ronnett, G.V., and McCullough, L.D. (2007) Neuroprotective effects of adenosine monophosphate-activated protein kinase inhibition and gene deletion in stroke, *Stroke*, **38**, 2992–2999.
 135. Li, J., Benashski, S.E., Venna, V.R., and McCullough, L.D. (2010) Effects of metformin in experimental stroke, *Stroke*, **41**, 2645–2652.
 136. Ashabi, G., Khodaghali, F., Khalaj, L., Goudarzvand, M., and Nasiri, M. (2014) Activation of AMP-activated protein kinase by metformin protects against global cerebral ischemia in male rats: Interference of AMPK/PGC-1 α pathway, *Metab. Brain Dis.*, **29**, 47–58.
 137. Venna, V.R., Li, J., Hammond, M.D., Mancini, N.S., and McCullough, L.D. (2014) Chronic metformin treatment improves post-stroke angiogenesis and recovery after experimental stroke, *Eur. J. Neurosci.*, **39**, 2129–2138.
 138. Tomkins, A.M., Jones, R., and Bloom, A. (1972) Lactic acidosis occurring during phenformin therapy, *Postgrad. Med. J.*, **48**, 386–387.
 139. Owen, M.R., Doran, E., and Halestrap, A.P. (2000) Evidence that metformin exerts its anti-diabetic effects through inhibition of complex I of the mitochondrial respiratory chain, *Biochem. J.*, **348**, 607–614.
 140. El-Mir, M.Y., Nogueira, V., Fontaine, E., Averet, N., Rigoulet, M., and Leverve, X. (2000) Dimethylbiguanide inhibits cell respiration via an indirect effect targeted on the respiratory chain complex I, *J. Biol. Chem.*, **275**, 223–228.
 141. Zhang, Y., Wang, Y., Bao, C., Xu, Y., Shen, H., Chen, J., Yan, J., and Chen, Y. (2012) Metformin interacts with AMPK through binding to γ subunit, *Mol. Cell Biochem.*, **368**, 69–76.
 142. Foretz, M., Hebrard, S., Leclerc, J., Zarrinpashneh, E., Soty, M., Mithieux, G., Sakamoto, K., Andreelli, F., and Viollet, B. (2010) Metformin inhibits hepatic gluconeogenesis in mice independently of the LKB1/AMPK pathway via a decrease in hepatic energy state, *J. Clin. Invest.*, **120**, 2355–2369.
 143. Miller, R.A., Chu, Q., Xie, J., Foretz, M., Viollet, B., and Birnbaum, M.J. (2013) Biguanides suppress hepatic glucagon signalling by decreasing production of cyclic AMP, *Nature*, **494**, 256–260.
 144. Evans, J.M., Donnelly, L.A., Emslie-Smith, A.M., Alessi, D.R., and Morris, A.D. (2005) Metformin and reduced risk of cancer in diabetic patients, *BMJ*, **330**, 1304–1305.
 145. Currie, C.J., Poole, C.D., and Gale, E.A. (2009) The influence of glucose-lowering therapies on cancer risk in type 2 diabetes, *Diabetologia*, **52**, 1766–1777.
 146. Giovannucci, E., Harlan, D.M., Archer, M.C., Bergenstal, R.M., Gapstur, S.M., Habel, L.A., Pollak, M., Regensteiner, J.G., and Yee, D. (2010) Diabetes and cancer: a consensus report, *Diabetes Care*, **33**, 1674–1685.
 147. Wahdan-Alaswad, R., Fan, Z., Edgerton, S.M., Liu, B., Deng, X.S., Arnadottir, S.S., Richer, J.K., Anderson, S.M., and Thor, A.D. (2013) Glucose promotes breast cancer aggression and reduces metformin efficacy, *Cell Cycle*, **12**, 3759–3769.
 148. Hardie, D.G. (2013) AMPK: a target for drugs and natural products with effects on both diabetes and cancer, *Diabetes*, **62**, 2164–2172.
 149. Hardie, D.G., and Alessi, D.R. (2013) LKB1 and AMPK and the cancer-metabolism link – ten years after, *BMC Biol.*, **11**, 36.
 150. Faubert, B., Boily, G., Izreig, S., Griss, T., Samborska, B., Dong, Z., Dupuy, F., Chambers, C., Fuerth, B.J., Viollet, B., Mamer, O.A., Avizonis, D., DeBerardinis, R.J., Siegel, P.M., and Jones, R.G. (2013) AMPK is a negative regulator of the Warburg effect and suppresses tumor growth *in vivo*, *Cell Metab.*, **17**, 113–124.
 151. Hsu, C.C., Wang, C.H., Wu, L.C., Hsia, C.Y., Chi, C.W., Yin, P.H., Chang, C.J., Sung, M.T., Wei, Y.H., Lu, S.H., and Lee, H.C. (2013) Mitochondrial dysfunction represses HIF-1 α protein synthesis through AMPK activation in human hepatoma HepG2 cells, *Biochim. Biophys. Acta*, **1830**, 4743–4751.
 152. Vander Heiden, M.G., Cantley, L.C., and Thompson, C.B. (2009) Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation, *Science*, **324**, 1029–1033.
 153. Li, J., Benashski, S.E., Siegel, C., Liu, F., and McCullough, L.D. (2010) Adenosine monophosphate activated protein kinase inhibition is protective in both sexes after experimental stroke, *Neurosci. Lett.*, **482**, 62–65.
 154. Vingtdeux, V., Davies, P., Dickson, D.W., and Marambaud, P. (2011) AMPK is abnormally activated in tangle- and pre-tangle-bearing neurons in Alzheimer's disease and other tauopathies, *Acta Neuropathol.*, **121**, 337–349.
 155. Kim, T.W., Cho, H.M., Choi, S.Y., Suguira, Y., Hayasaka, T., Setou, M., Koh, H.C., Hwang, E.M., Park, J.Y., Kang, S.J., Kim, H.S., Kim, H., and Sun, W. (2013) (ADP-ribose) polymerase 1 and AMP-activated protein kinase mediate progressive dopaminergic neuronal degeneration in a mouse model of Parkinson's disease, *Cell Death Dis.*, **4**, e919.
 156. Jiang, P., Gan, M., Ebrahim, A.S., Castanedes-Casey, M., Dickson, D.W., and Yen, S.H. (2013) Adenosine monophosphate-activated protein kinase overactivation leads to accumulation of α -synuclein oligomers and decrease of neurites, *Neurobiol. Aging*, **34**, 1504–1515.
 157. Fryer, L.G., Parbu-Patel, A., and Carling, D. (2002) Protein kinase inhibitors block the stimulation of the AMP-activated protein kinase by 5-amino-4-imidazolecarboxamide riboside, *FEBS Lett.*, **531**, 189–192.
 158. Labuzek, K., Liber, S., Gabryel, B., Buldak, L., and Okopien, B. (2010) Ambivalent effects of compound C (dorsomorphin) on inflammatory response in LPS-stimulated rat primary microglial cultures, *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, **381**, 41–57.
 159. Bain, J., Plater, L., Elliott, M., Shpiro, N., Hastie, C.J., McLauchlan, H., Klevernic, I., Arthur, J.S., Alessi, D.R.,

- and Cohen, P. (2007) The selectivity of protein kinase inhibitors: a further update, *Biochem. J.*, **408**, 297–315.
160. Handa, N., Takagi, T., Saijo, S., Kishishita, S., Takaya, D., Toyama, M., Terada, T., Shirouzu, M., Suzuki, A., Lee, S., Yamauchi, T., Okada-Iwabu, M., Iwabu, M., Kadowaki, T., Minokoshi, Y., and Yokoyama, S. (2011) Structural basis for compound C inhibition of the human AMP-activated protein kinase $\alpha 2$ subunit kinase domain, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, **67**, 480–487.
161. Massillon, D., Stalmans, W., van de Werve, G., and Bollen, M. (1994) Identification of the glycogenic compound 5-iodotubercidin as a general protein kinase inhibitor, *Biochem. J.*, **299**, 123–128.
162. Henin, N., Vincent, M.F., and Van den Berghe, G. (1996) Stimulation of rat liver AMP-activated protein kinase by AMP analogues, *Biochim. Biophys. Acta*, **1290**, 197–203.
163. Musi, N., Hayashi, T., Fujii, N., Hirshman, M.F., Witters, L.A., and Goodyear, L.J. (2001) AMP-activated protein kinase activity and glucose uptake in rat skeletal muscle, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **280**, 677–684.
164. Kerkela, R., Woulfe, K.C., Durand, J.B., Vagnozzi, R., Kramer, D., Chu, T.F., Beahm, C., Chen, M.H., and Force, T. (2009) Sunitinib-induced cardiotoxicity is mediated by off-target inhibition of AMP-activated protein kinase, *Clin. Transl. Sci.*, **2**, 15–25.
165. Laderoute, K.R., Calaoagan, J.M., Madrid, P.B., Klon, A.E., and Ehrlich, P.J. (2010) SU11248 (sunitinib) directly inhibits the activity of mammalian 5'-AMP-activated protein kinase (AMPK), *Cancer Biol. Ther.*, **10**, 68–76.
166. Gan, H.K., Seruga, B., and Knox, J.J. (2009) Sunitinib in solid tumors, *Expert Opin. Investig. Drugs*, **18**, 821–834.
167. Machrouhi, F., Ouhamou, N., Laderoute, K., Calaoagan, J., Bukhtiyarova, M., Ehrlich, P.J., and Klon, A.E. (2010) The rational design of a novel potent analogue of the 5'-AMP-activated protein kinase inhibitor compound C with improved selectivity and cellular activity, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **20**, 6394–6399.

AMPK: STRUCTURE, FUNCTIONS AND ROLE IN PATHOLOGICAL PROCESSES

D. S. Novikova*, **A. V. Garabadzhiu**, **G. Melino**,
N. A. Barlev, **V. G. Tribulovich**

*Saint Petersburg State Technological Institute (technical university),
Russia; fax: +7(812)316-4648, E-mail: dc.novikova@gmail.com*

Received July 5, 2014

Revision received September 12, 2014

Recently, AMP-activated protein kinase (AMPK) has emerged as a key regulator of the energy balance at cellular and whole-body levels. Due to the involvement in multiple signaling pathways, AMPK efficiently controls ATP-consuming/ATP-generating processes in order to maintain the energy homeostasis under stress conditions. Loss of the kinase activity or attenuation of its expression leads to a variety of metabolic disorders and increases cancer risk. In this review, we discuss recent findings on the structure of AMPK, its activation mechanisms, as well as the consequences of its targets in regulation of metabolism. A particular attention is paid to small molecular compounds that activate or inhibit AMPK; the perspective of therapeutic use of such modulators in treatment of several common diseases is also discussed.

Key words: AMP-activated protein kinase, energy metabolism, metabolic syndrome, diabetes type 2, cancer, AMPK activators, AMPK inhibitors