

Received: 2010.06.15
Accepted: 2010.08.26
Published: 2010.10.21

Rola kinazy białkowej aktywowanej przez AMP (AMPK) w regulacji metabolizmu mięśni szkieletowych*

The role of AMP-activated protein kinase in regulation of skeletal muscle metabolism

Anna Dziewulska, Paweł Dobrzyń, Agnieszka Dobrzyń

Pracownia Sygnałów Komórkowych i Zaburzeń Metabolicznych, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, Warszawa

Streszczenie

Kinaza białkowa aktywowana przez AMP (AMPK) jest konserwatywnym białkiem występującym we wszystkich organizmach eukariotycznych. AMPK bierze udział w regulacji metabolizmu lipidów i glukozy, dlatego też enzym ten wydaje się jednym z głównych czynników odpowiedzialnych za utrzymanie energetycznej homeostazy w organizmie. Aktywacja tego heterotrimerycznego białka prowadzi do zahamowania szlaków anabolicznych na korzyść procesów, w wyniku których powstaje ATP. AMPK może być aktywowana przez wzrost stężenia AMP w komórce, skurcz mięśnia szkieletowego, a także poprzez fosforylację przez nadrzędne kinazy. Aktywność AMPK jest także regulowana przez hormony i cytokiny, kwasy tłuszczowe, oraz reaktywne formy tlenu. Również metformina, lek używany w terapii cukrzycy typu 2, powoduje pośrednio wzrost aktywności AMPK. W odpowiedzi na aktywację AMPK obserwowany jest większy wychwyt glukozy przez komórki mięśni szkieletowych oraz wzrost tempa utleniania kwasów tłuszczowych w mitochondriach. Co ciekawe, zwiększony transport glukozy do mięśnia w wyniku aktywacji AMPK może się odbywać niezależnie od aktywacji szlaku insulinowego. Poznanie roli AMPK w regulacji metabolizmu mięśni szkieletowych budzi nadzieję na możliwość wykorzystania swoistej aktywacji tego enzymu jako nowej strategii w leczeniu otyłości oraz cukrzycy typu 2 – schorzeń, których cechą charakterystyczną jest obniżona wrażliwość mięśni na insulinę. W pracy przedstawiono aktualny stan wiedzy dotyczącej fizjologicznej funkcji AMPK w mięśniu szkieletowym oraz przedyskutowano potencjalną rolę tego białka w utrzymaniu homeostazy glukozy.

Słowa kluczowe:

mięśnie szkieletowe • AMPK • kwasy tłuszczowe • glikogen • glukoza

Summary

AMP-activated protein kinase (AMPK) is a conserved, ubiquitously expressed eukaryotic enzyme that is activated in response to increasing AMP level. Regulation of AMPK activity in skeletal muscle is coordinated by contraction and phosphorylation by upstream kinases and a growing number of hormones and cytokines. Once activated, AMPK turns on catabolic, ATP-generating pathways, and turns off ATP-consuming metabolic processes such as biosynthesis and proliferation. Activation of AMPK promotes glucose uptake and fatty acid oxidation, and enhances glycogen storage capacity in skeletal muscle. Interestingly, increased glucose uptake in response to AMPK activation may occur in an insulin-independent manner. It has been confirmed that AMPK is an indirect molecular target of the antidiabetic drug metformin, and it is postulated that AMPK

* Praca została przygotowana w ramach projektu N N301 0402 36 finansowanego przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego.

may be responsible for health benefits of exercise. Understanding of AMPK involving molecular pathways that govern skeletal muscle metabolism is of special interest and offers a unique possibility to find new physiological and/or pharmacological strategies that can improve insulin sensitivity. Here we review present knowledge on the physiological function of AMPK in muscle, and highlight its potential role in glucose homeostasis regulation.

Key words: skeletal muscles • AMPK • fatty acids • glycogen • glucose

Full-text PDF: <http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=921491>

Word count: 3755

Tables: –

Figures: 2

References: 87

Adres autorki: doc. dr hab. Agnieszka Dobrzyń, Pracownia Sygnałów Komórkowych i Zaburzeń Metabolicznych, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, ul. L. Pasteura 3, 02-093 Warszawa; e-mail: a.dobryzn@nencki.gov.pl

1. WSTĘP

W 1973 r. po raz pierwszy opublikowano wyniki, które wykazały, że inhibicja aktywności dwóch enzymów zaangażowanych w metabolizm lipidów w wątrobie, tj. karboksylazy acetylo-CoA (acetyl-CoA carboxylase – ACC) oraz reduktazy 3-hydroksy-3-metyloglutarylo-koenzymu A, jest spowodowana działaniem jednego, tego samego enzymu [1,2]. W kolejnych latach, Hardie i wsp. wykazali, że aktywność tego enzymu modulowana jest w odpowiedzi na zmianę zawartości wewnątrzkomórkowego AMP [61], stąd określono go mianem kinazy białkowej aktywowanej przez AMP (AMP-activated protein kinase – AMPK). Badania ostatnich 20 lat wykazały, że AMPK jest enzymem ekspresjonowanym w większości tkanek zwierzęcych i bierze udział nie tylko w regulacji metabolizmu lipidów, ale także wpływa na syntezę białek, biogenezę mitochondriów, wrażliwość tkanek na insulinę i wychwytywanie glukozy, transkrypcję genów oraz reguluje łaknienie. Dziś kinaza AMPK jest często nazywana centralnym enzymem regulującym metabolizm komórki [82]. Co więcej, badania ostatnich lat wykazały, że aktywność AMPK jest regulowana nie tylko przez AMP, ale także przez inne nukleotydy, kinazy, kwasy tłuszczowe, cytokiny, insulinę oraz reaktywne formy tlenu.

W mięśniach szkieletowych obecność kinazy AMPK wykazano po raz pierwszy w 1995 r. [71]. Zwiększona jej aktywność wiąże się ze wzrostem tempa oksydacji kwasów tłuszczowych oraz zwiększonym wychwytem i utylizacją glukozy w mięśniach. Przypuszcza się, że wzrost utylizacji substratów energetycznych podczas wysiłku fizycznego, jest także związany z aktywacją kinazy AMPK. Najnowsze badania wykazały, że AMPK jest regulatorem wychwytywania glukozy przez mięśnie szkieletowe i może mieć znaczenie w patogenezie insulinooporności. W pracy przedstawiliśmy najnowsze dane dotyczące roli AMPK w regulacji metabolizmu mięśnia szkieletowego oraz omówiliśmy mechanizmy regulacji aktywności tego enzymu.

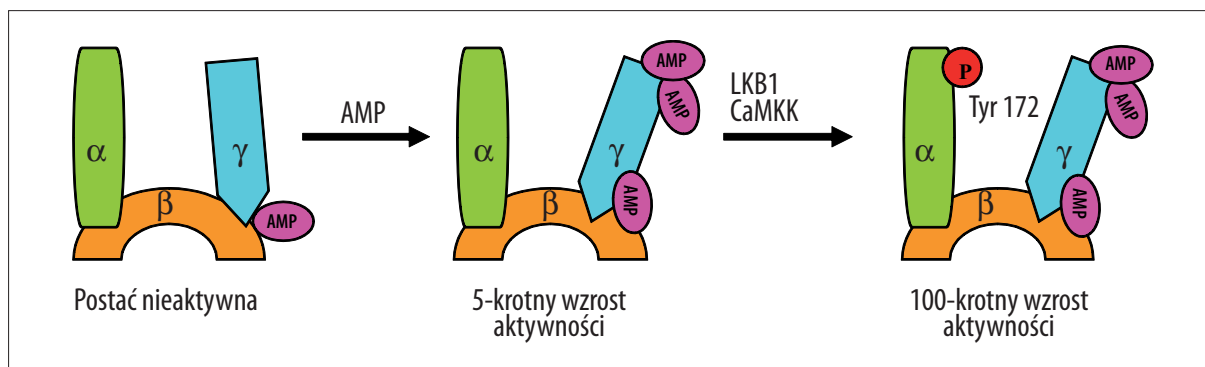
2. CZYNNIKI REGULUJĄCE AKTYWNOŚĆ AMPK

Kinaza AMPK jest białkiem o strukturze heterotrimerycznej złożonej z jednej podjednostki katalitycznej (α) oraz

dwóch podjednostek regulatorowych niezbędnych do stabilności i swoistości substratowej (β oraz γ). Podjednostka β zawiera także konserwatywną domenę wiążącą glikogen [40]. Dotychczas, w komórkach ssaków zidentyfikowano kilka izoform poszczególnych podjednostek, będących produktami odrębnych genów. Wyróżniono: dwie izoformy podjednostki α ($\alpha 1$, $\alpha 2$), dwie izoformy podjednostki β ($\beta 1$, $\beta 2$) oraz 3 izoformy podjednostki γ ($\gamma 1$, $\gamma 2$, $\gamma 3$) [80]. Ekspresję podjednostek $\alpha 1$, $\beta 1$ oraz $\gamma 1$ stwierdzono we wszystkich rodzajach tkanek. Ekspresja podjednostek $\alpha 2$, $\beta 2$ oraz $\gamma 3$ jest największa w mięśniach szkieletowych [67]. Co więcej, badania Barnes i wsp. wykazały, że podjednostka $\gamma 3$ jest ekspresjonowana głównie w mięśniach charakteryzujących się metabolizmem glikolitycznym (np. prostownik długi palców), natomiast w mięśniu charakteryzującym się metabolizmem oksydacyjnym (np. w mięśniu płaszczkowatym) jej ekspresja jest bardzo mała [4]. Różnice funkcjonalne poszczególnych izoform podjednostek AMPK są w dalszym ciągu słabo poznane.

2.1. Nukleotydy

Jednostką regulatorową kinazy AMPK jest podjednostka γ mająca trzy miejsca wiązania AMP. W stanie nieaktywnym do podjednostki γ przyłączona jest jedna cząsteczka AMP [84] (ryc. 1). Dwie cząsteczki AMP wiązane są odwracalnie w obrębie czterokrotnie powtórzonej sekwencji tandemowej składającej się z 60 reszt aminokwasowych (zwanej motywem CBS), natomiast w trzecim miejscu AMP wiązane jest na stałe [84]. Sekwencje stanowiące motyw CBS oddziałują w parach tworząc dwie domeny wiążące po jednej cząsteczce nukleotydu (tzw. domeny Batemana) [60]. Scott i wsp. wykazali również, że domeny Batemana charakteryzują się wysokim stopniem kooperatywności w wiązaniu AMP. Autorzy ci sugerują, że drugie miejsce wiązania jest niedostępne dla AMP zanim nie nastąpi przyłączenie nukleotydu do pierwszego miejsca wiązania [60]. Wydaje się, że mechanizm ten pozwala na szybką regulację aktywności AMPK w odpowiedzi na nawet najmniejsze zmiany w zawartości AMP w komórce, dzięki czemu dochodzi do zmian konformacyjnych w obrębie podjednostki γ , a co za tym idzie, do allosterycznej aktywacji enzymu, która umożliwia fosforylację tyrozyny



Ryc. 1. Mechanizm regulacji aktywności AMPK. Przyłączenie trzech cząsteczek AMP do podjednostki γ AMPK powoduje pięciokrotny wzrost aktywności enzymu. Aktywność AMPK regulowana jest także poprzez fosforylację przez kinazy nadrzędne podjednostki α w pozycji tyrozyny 172. Fosforylacja podjednostki α prowadzi do stukrotnego wzrostu aktywności enzymu; AMPK – kinaza białkowa aktywowana przez AMP; α , β , γ – podjednostki AMPK; LKB1 – kinaza treoninowo-serynowa LKB1; CaMKK – kinaza kinazy zależnej od kalmoduliny/ Ca^{2+}

w pozycji 172 w podjednostce α (ryc. 1). Jest to proces bardzo istotny, gdyż przyłączenie trzech cząsteczek AMP do podjednostki γ AMPK powoduje pięciokrotny wzrost aktywności enzymu, natomiast przyłączenie grupy fosforanowej do tyrozyny 172 podjednostki α powoduje nawet stukrotny wzrost aktywności enzymu [66]. Dodatkowo, związanie AMP przez podjednostkę γ uniemożliwia defosforylację, a tym samym inhibicję aktywności AMPK przez fosfatazy [58]. Ten trójstopniowy sposób regulacji aktywności enzymu pozwala na szybką reakcję w odpowiedzi na nawet niewielkie zmiany stanu energetycznego komórki, którego wskaźnikiem jest stosunek zawartości AMP do ATP (AMP/ATP).

Zahamowanie wytwarzania ATP bądź wzmoczone jego zużycie w wyniku działania stresu metabolicznego skutkuje wzrostem zawartości ADP w stosunku do ATP w komórce. Jest to potęgowane aktywacją kinazy adenylanowej przekształcającej dwie cząsteczki ADP do AMP i ATP, dzięki czemu wielokrotnie wzrasta wartość współczynnika AMP/ATP w komórce. Wykazano, że skurcz mięśnia szkieletowego na skutek wysiłku fizycznego, powoduje m.in. wzrost zawartości wewnątrzkomórkowego AMP oraz zmianę stosunku AMP/ATP, a przez to zwiększenie stopnia fosforylacji oraz aktywności AMPK [35,78,83]. Corton i wsp. wykazali, że pod wpływem działania trucizn hamujących wytwarzanie ATP, takich jak arsenik czy oligomycyna, dochodzi do aktywacji AMPK także z powodu zmiany zawartości AMP w stosunku do ATP [13].

Badania przeprowadzone z użyciem rekombinowanego białka AMPK wykazały, że NADH oraz βNAD także regulują aktywność AMPK, przy czym obecność NADH prowadzi do inhibicji, a βNAD powoduje aktywację enzymu [52]. Wykazano przy tym, że βNAD jest znacznie słabszym aktywatorem AMPK w porównaniu z AMP. Nie wiadomo jednak czy NADH i βNAD regulują aktywność AMPK bezpośrednio, czy też wpływają na aktywność nadrzędnych kinaz i fosfataz wpływających na aktywność enzymu.

2.2. Kinazy

Wyniki uzyskane przez badaczy w wielu laboratoriach wskazują, że regulacja aktywności AMPK w odpowiedzi na zmiany statusu energetycznego komórki jest zależna

od kinazy treoninowo-serynowej LKB1 [83]. Wykazano, że nokaut genu LKB1 u myszy powoduje wyraźny spadek aktywności podjednostek $\alpha 1$ i $\alpha 2$ AMPK, przy jednoczesnym wzroście zawartości komórkowego AMP w stosunku do ATP [35]. Dalsze badania wykazały, że zahamowanie ekspresji genu kodującego LKB1 swoiście w mięśniach szkieletowych powoduje istotny spadek aktywności podjednostki $\alpha 1$ AMPK, nie wpływa jednak na aktywność podjednostki $\alpha 2$ [35]. Dlatego też rola kinazy LKB1, jako głównego regulatora aktywności katalitycznej jednostki $\alpha 2$ w mięśniach szkieletowych wymaga dalszych badań.

Innym enzymem fosforylującym tyrozinę 172 w cząsteczce AMPK, zarówno w warunkach *in vitro* [25], jak i *in vivo* [81], jest kinaza kinazy zależnej od kalmoduliny/ Ca^{2+} (calmodulin-dependent protein kinase – CaMKK), która jest aktywowana poprzez wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia Ca^{2+} . Wykazano, że nadekspresja konstytutywnie aktywnej postaci CaMKK w mięśniach szkieletowych powoduje znaczący wzrost aktywności podjednostek α AMPK [81]. Jensen i wsp. stwierdzili istotne zahamowanie aktywności AMPK po inkubacji mięśni szkieletowych ze swoistym inhibitorem CaMKK, tj. STO-609 [31]. Natomiast inkubacja z inhibitorem STO-609 mysich mięśni szkieletowych stymulowanych do aktywności skurczowej nie obniżyła fosforylacji AMPK w pozycji tyrozyny 172, a co za tym idzie aktywności enzymu [81]. Wskazuje to na istnienie niezależnych mechanizmów aktywacji AMPK przez CaMKK oraz skurczu mięśnia.

2.3. Kwasy tłuszczowe

Ważnym czynnikiem wpływającym na aktywność AMPK są kwasy tłuszczowe. Watt i wsp. zaobserwowali aktywację AMPK pod wpływem działania kwasu palmitynowego w miocytach L6, przy czym było to niezależne od zawartości AMP [77]. Konsekwentnie, inkubacja miocytów L6 z kwasem palmitynowym lub linolowym prowadziła do zwiększonego utleniania kwasów tłuszczowych w mitochondriach [77]. Także Pimenta i wsp. wykazali, stosując ten sam model doświadczalny, że wzrost stężenia kwasu palmitynowego koreluje ze wzrostem fosforylacji i aktywności AMPK [51]. Wang i wsp. stwierdzili natomiast, że 0,75% kwas α -liponowy podawany z wodą przez jeden miesiąc powoduje znaczący wzrost fosforylacji AMPK, a także

wzrost ekspresji transportera glukozy 4 (glucose transporter 4 – GLUT4) oraz koaktywatora transkrypcyjnego czynnika PPARY (peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 α – PGC-1 α) w mięśniach myszy [74]. Jednak wzbogacenie diety w wielonienasycone kwasy tłuszczowe typu n-3 nie zwiększa fosforylacji AMPK w mięśniach szkieletowych myszy po 14 dniach suplementacji [16].

Nasycone kwasy tłuszczowe, takie jak palmitynowy i stearynowy, są substratami dla desaturazy stearoilo-CoA (SCD), enzymu wprowadzającego jedno wiązanie podwójne między węglami w cząsteczce kwasu tłuszczowego. Prowadzi to do przekształcenia kwasów palmitynowego i stearynowego do kwasu palmitooleinowego oraz oleinowego [57]. Mięśnie szkieletowe myszy ze znokautowanym genem kodującym białko SCD1, wykazują podwyższoną aktywność AMPK powiązaną ze zwiększonym tempem utleniania kwasów tłuszczowych, a także charakteryzują się zwiększoną wrażliwością na insulinę [15,16]. Jednak podwyższona ekspresja oraz aktywność SCD jest związana z obniżeniem fosforylacji AMPK, co wykazano w komórkach mięśniowych ludzi otyłych, opornych na insulinę [27]. Dalsze badania wykazały, że nadekspresja SCD1 w komórkach mięśniowych pochodzących od zdrowych ludzi, powoduje zmniejszenie fosforylacji podjednostek α AMPK, a co za tym idzie prowadzi do spadku aktywności AMPK oraz zmniejszenia tempa utleniania kwasów tłuszczowych w mitochondriach [27]. Wyniki te wskazują na istotną rolę SCD1 oraz/lub kwasów tłuszczowych metabolizowanych przez ten enzym w regulacji aktywności AMPK w mięśniach szkieletowych.

2.4. Cytokiny

Aktywność AMPK podlega również regulacji przez adipokiny, między innymi przez leptynę. Regulacja AMPK wydaje się w tym przypadku procesem dwufazowym. Pierwszy etap, tzw. etap wczesny (do 30 min od podania leptyny) jest zależny od wzrostu zawartości AMP w stosunku do ATP w komórkach, natomiast w etapie drugim (dwie godziny po podaniu leptyny) aktywacja AMPK staje się zależna od fosforylacji przez nadrzędne kinazy [30]. Inną adipokiną aktywującą AMPK jest adiponektyna. Mechanizm aktywacji AMPK przez adiponektynę nie został jeszcze dokładnie poznany. Prawdopodobnie jest on związany ze wzrostem stężenia wewnątrzkomórkowego AMP i przebiega z aktywacją receptora AdipoR1 i udziałem białka APPL1 [85]. Wiadomo, że adiponektyna aktywuje zarówno podjednostkę α 1 jak i α 2 AMPK, w odróżnieniu od leptyny, która wpływa wyłącznie na podjednostkę α 2 [72]. Kolejną cytokiną regulującą AMPK jest rzęskowy czynnik neurotropowy, który aktywuje AMPK i zwiększa utlenianie kwasów tłuszczowych w mięśniach, także w tkankach z obniżoną wrażliwością na leptynę [75]. Aktywacja AMPK następuje także pod wpływem inkubacji mięśni szkieletowych z interleukiną 6 (IL-6) [49]. Prace przeprowadzone *in vitro* na mysich miocytach C2C12 dowodzą, że fosforylacja AMPK w przypadku krótkotrwałego podawania IL6 następuje pod wpływem kinazy LKB1 [49]. Długotrwałe podawanie IL-6 skutkuje jednak rozwojem oporności na insulinę [49].

Adipocytokiny mogą również hamować aktywność AMPK. Wykazano, że pod wpływem związania czynnika martwicy nowotworów α (tumor necrosis factor- α – TNF α) ze

swoistym receptorem (TNFR) aktywowana jest fosfataza białkowa 2C, która powoduje defosforylację AMPK, a w konsekwencji spadek aktywności tego enzymu prowadzący do zmniejszenia tempa utleniania kwasów tłuszczowych oraz zwiększoną akumulację lipidów w mięśniach szkieletowych [63].

2.5. Inne czynniki

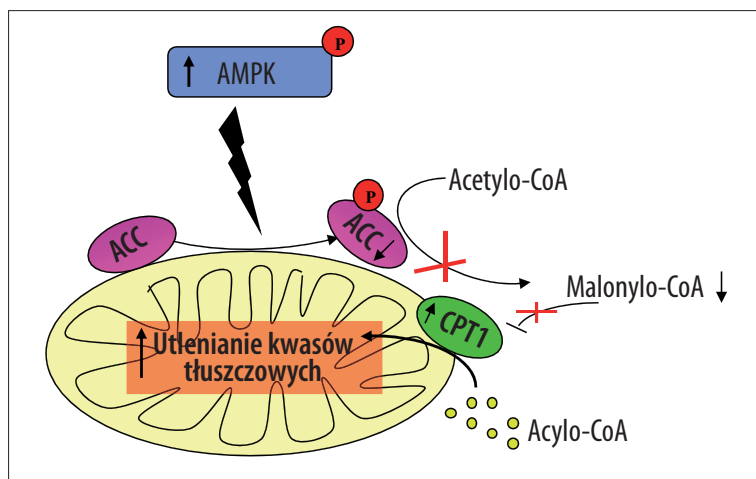
Przeprowadzone w ostatnich latach badania wskazały na potencjalnie znaczącą rolę reaktywnych form tlenu (reactive oxygen species – ROS) w regulacji aktywności AMPK. ROS, jako produkt uboczny oddychania tlenowego, wytwarzane są w sposób ciągły w mitochondriach. Wykazano, że wzrost ich wytwarzania, podobnie jak aktywacja AMPK, następuje w odpowiedzi na skurcz mięśni i wysiłek fizyczny [46]. W przypadku mięśnia prostownika długiego palców wykazano, że zastosowanie antyoksydantu – N-acetylo-L-cysteiny skutkowało 50% obniżeniem wywołanej przez aktywność skurczową fosforylacji AMPK [59]. Z kolei inkubacja mięśni szkieletowych z nadtlentkiem wodoru spowodowała zależny od jego stężenia wzrost fosforylacji podjednostki α 1 AMPK, a efekt ten został stłumiony poprzez działanie N-acetylo-L-cysteiny [68]. Wskazuje to na potencjalny związek między zawartością ROS a aktywnością AMPK, jednakże biochemiczne podłoże tych zmian jest nieznane.

Kolejnym czynnikiem potencjalnie regulującym aktywność AMPK jest apolipoproteina apoAI, wchodząca w skład lipoprotein o dużej gęstości (HDL), co wykazano w eksperymentach z użyciem miocytów C2C12 [18]. Następnie stwierdzono, że w mięśniach myszy ze znokautowanym genem kodującym apoAI fosforylacja oraz aktywność AMPK są istotnie obniżone w porównaniu z grupą kontrolną [24]. Autorzy obu wymienionych publikacji sugerują, że HDL mogą odgrywać rolę w regulacji metabolizmu glukozy i lipidów za pośrednictwem AMPK.

Badania przeprowadzone przez Hormana i wsp. [26] wykazały, że istotnym czynnikiem wpływającym na aktywność AMPK jest także insulina. Hormon ten poprzez aktywację szlaku związanego z kinazą Akt hamuje aktywność AMPK. Kinaza Akt fosforyluje serynę 485 w podjednostce α 1 oraz serynę 491 w podjednostce α 2 AMPK, dzięki czemu uniemożliwia fosforylację tyrozyny 172 AMPK przez kinazę LKB1, co obniża aktywność enzymu [26].

3. ROLA AMPK W REGULACJI METABOLIZMU KWASÓW TŁUSZCZOWYCH W MIĘŚNIACH SZKIELETOWYCH

Wysiłek fizyczny i aktywność skurczowa stymulują utylizację kwasów tłuszczowych w mięśniach szkieletowych [8]. Istotną rolę w tym procesie odgrywa AMPK. Wykazano, iż egzogenna aktywacja AMPK przez AICAR (5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside) prowadzi do zwiększonego wychwytu kwasów tłuszczowych przez wiele tkanek, wliczając w to mięśnie szkieletowe [65]. Dotychczas przeprowadzone badania wykazały, że aktywacja AMPK, np. pod wpływem wysiłku fizycznego prowadzi do zwiększenia zawartości białka translokazy kwasów tłuszczowych (fatty acid translocase – FAT/CD36) w błonie komórkowej [7]. To z kolei zwiększa transport wolnych kwasów tłuszczowych do mięśni, gdzie są one, w zależności od stanu



Ryc. 2. Wpływ AMPK na tempo utleniania kwasów tłuszczowych w mitochondriach. AMPK fosforyluje ACC w pozycji seryny 79, przez co enzym ten staje się nieaktywny. Wskutek tego maleje ilość wytwarzanego przez ACC malonylo-CoA, co z kolei aktywuje CPT1 oraz wzmacnia transport kwasów tłuszczowych do mitochondrium, gdzie ulegają one utlenieniu; AMPK – kinaza białkowa aktywowana przez AMP; ACC – karboksylaza acetylo-CoA, CPT1 – acetylotransferaza karnitynowa 1

fizjologicznego tkanki, utleniane lub magazynowane w postaci triacylogliceroli. Istotną rolę w procesie translokacji FAT/CD36 do błony komórkowej pod wpływem AMPK może odgrywać podjednostka $\gamma 3$ enzymu, ponieważ myszy ze znokautowanym genem kodującym tę podjednostkę charakteryzują się niską zawartością błonowej frakcji FAT/CD36 [39].

Istotnym enzymem biorącym udział zarówno w syntezie, jak i utlenianiu kwasów tłuszczowych, podlegającym regulacji przez AMPK, jest ACC [30]. Enzym ten katalizuje reakcję karboksylacji acetylo-CoA do malonylo-CoA. Dotychczas zidentyfikowano dwie izoformy ACC: α (ACC1; 265 kDa) oraz β (ACC2; 280 kDa). ACC β , w odróżnieniu od ACC α , ma 146 dodatkowych aminokwasów na N-końcu, umożliwiających jej umiejscowienie w zewnętrznej błonie mitochondrium [5]. W mięśniach szkieletowych ekspresjonowane są obie postaci ACC, przy czym przeważa ekspresja ACC β [11]. W wyniku fosforylacji ACC przez AMPK w pozycji seryny 79, enzym ten staje się nieaktywny, przez co maleje ilość wytwarzanego przez niego malonylo-CoA w komórce, co z kolei aktywuje acylotransferazę karnitynową 1 (carnitine palmitoyltransferase 1 – CPT1) oraz wzmacnia transport kwasów tłuszczowych do mitochondrium, gdzie ulegają one utlenieniu (ryc. 2) [11]. Myszy ze znokautowanym genem ACC β charakteryzują się obniżoną zawartością malonylo-CoA i zwiększonym tempem utleniania kwasów tłuszczowych w mięśniach [11]. Dodatkowo myszy te, w przeciwieństwie do zwierząt kontrolnych, nie przybierają na wadze i pozostają wrażliwe na insulinę, mimo karmienia ich pokarmem z dużą zawartością tłuszczu. Pomimo prawidłowej ekspresji ACC α , nie wykazano kompensacji obniżonej zawartości malonylo-CoA obserwowanej w mięśniach szkieletowych i sercu [11]. Wskazuje to, że ekspresja genu kodującego ACC β jest podstawowa dla regulacji aktywności CPT1, a co za tym idzie tempa utleniania lipidów w tych tkankach. Jak już wspomniano, także myszy ze znokautowanym genem SCD1, charakteryzują się podwyższoną fosforylacją AMPK, obniżoną fosforylacją ACC, większą aktywnością CPT1, a co za tym idzie zwiększonym tempem utleniania kwasów tłuszczowych w mięśniach szkieletowych [11]. Przypuszcza się, że aktywacja szlaku zależnego od AMPK może być przyczyną podwyższonej wrażliwości na insulinę obserwowanej u myszy z nokautem genu SCD1.

Przeprowadzone badania wykazały także, że aktywacja AMPK przez AICAR przyspiesza biogenezę mitochondriów [79]. Poza tym dowiedziono, że AMPK aktywuje czynniki transkrypcyjne odpowiedzialne za powstawanie elementów łańcucha oddechowego (tj. jądrowe czynniki oddechowe NRF1 i NRF2) oraz głównych koaktywatorów dla tych czynników, m.in. PGC1 [6,28]. Wszystko to wpływa na intensyfikację utylizacji kwasów tłuszczowych w organizmie.

Istotnym elementem katabolizmu lipidów jest hydroliza triacylogliceroli, a uwolnione kwasy tłuszczowe są przekształcane do metabolitów lipidowych, tj. diacylogliceroli, ceramidów i długołańcuchowych acylo-CoA, które pełnią istotne funkcje regulatorowe, m.in. aktywują kinazy oraz fosfatazy białkowe regulujące szlak insuliny. Enzymem odpowiedzialnym za ten proces jest lipaza hormonowrażliwa (hormone-sensitive lipase – HSL), aktywowana poprzez fosforylację seryny 563 przez kinazę białkową A (PKA) pod wpływem adrenaliny. AMPK również fosforyluje HSL, jednakże reakcja zachodzi na serynie 565, co uniemożliwia fosforylację i aktywację HSL przez PKA [53,76]. Potwierdzeniem tej tezy są wyniki eksperymentów, w których wykazano, że zarówno podczas skurczu mięśnia, jak i w spoczynku, aktywność HSL jest zredukowana po zastosowaniu AICAR [62]. Aktywacja AMPK przez AICAR spowodowała także zahamowanie szlaku PKA – HSL w badaniach *in vitro* wykonanych na miocytach L6 [76]. Podobne spostrzeżenia przyniosły badania przeprowadzone z udziałem ludzi. Trwający 90 min wysiłek fizyczny, spowodował wzrost fosforylacji AMPK, co istotnie korelowało z zahamowaniem aktywności HSL [53].

Jak już wspomniano, stymulujące działanie na utylizację kwasów tłuszczowych za pośrednictwem AMPK wywiera leptyna [54]. Długotrwałe podawanie leptyny powoduje wzrost ekspresji podjednostek $\alpha 2$ i $\beta 2$ AMPK w mięśniach, a zjawisko to koreluje ze wzmocnionym utlenianiem kwasów tłuszczowych oraz zmniejszoną lipogenezą [45,64]. Co ciekawe, opisane działanie leptyny jest wyraźne u osób o prawidłowej masie ciała, natomiast u osób otyłych nie stwierdzono aktywacji AMPK po podaniu leptyny [44]. Może to być związane z obniżoną wrażliwością na leptynę stwierdzoną w mięśniach ludzi otyłych.

4. WPŁYW AMPK NA REGULACJĘ METABOLIZMU GLIKOGENU

Zawartość glikogenu w komórkach mięśniowych jest odzwierciedleniem dynamicznej równowagi między procesami syntezy i degradacji tego związku, w których pośredniczą odpowiednio syntaza glikogenu (glycogen synthase – GS) i fosforylaza glikogenu (glycogen phosphorylase – GP) [48]. GS regulowana jest allosterycznie przez glukozo-6-fosforan oraz poprzez fosforylację i defosforylację [48]. Carling i Hardie wykazali w 1989 r., że także AMPK powoduje inhibicję tego enzymu poprzez fosforylację seryny 7 w częstej formie GS [10]. W kolejnych latach wykazano, że inkubacja wyizolowanych mysich mięśni szkieletowych z AICAR powoduje znaczny spadek aktywności GS [32]. Wydaje się natomiast, że AMPK odwrotnie wpływa na aktywność GP. Young i wsp. zauważyli wzrost aktywności GP pod wpływem fosforylacji katalizowanej przez AMPK [86]. Interesujące jest to, że aktywacja AMPK może pośrednio prowadzić także do wzrostu aktywności GS. Badania przeprowadzone *in vivo* wykazały, że długotrwałe podawanie AICAR skutkuje aktywacją GS oraz wzrostem zawartości glikogenu w mięśniach [3]. Było to związane ze zwiększonym poborem glukozy przez komórki, co prowadziło do wzrostu ilości glukozo-6-fosforanu, który aktywował GS niezależnie od fosforylacji przez AMPK [3]. Badania te wykazały, że o ile w warunkach podstawowych AMPK hamuje aktywność GS poprzez fosforylację seryny 7 enzymu, w sytuacji zwiększonego stężenia wewnątrzkomórkowej glukozy, inhibicja ta może zostać zniesiona dzięki allosterycznej regulacji GS przez glukozo-6-fosforan.

5. ROLA AMPK W REGULACJĘ METABOLIZMU GLUKOZY W MIĘŚNIACH SZKIELETOWYCH

Mięśnie szkieletowe stanowią około 40% masy ciała. Są one odpowiedzialne za większą część (60–85%) zależności od insuliny wychwyty glukozy z osocza [47]. Stąd też tkanka ta jest w znacznej mierze odpowiedzialna za rozwój insulinooporności, a określenie mechanizmów regulacji dokomórkowego transportu glukozy w mięśniach stało się jednym z ważniejszych wyzwań współczesnych badań biomedycznych [47]. Przeprowadzone badania wykazały, że AMPK jest jednym z regulatorów metabolizmu glukozy w mięśniach szkieletowych. Aktywatory AMPK, takie jak AICAR czy metformina powodują zwiększenie wychwyty glukozy przez mięśnie, prawdopodobnie przez bezpośrednią aktywację translokacji glukotransportera 4 (GLUT4) z pęcherzyków wewnątrzkomórkowych do błony komórkowej, i proces ten jest niezależny od insuliny [22,37]. Jorgensen i wsp. wykazali, że nokaut podjednostki $\alpha 2$ AMPK (ale nie $\alpha 1$), hamuje wychwyty glukozy, mimo egzogennej aktywacji AMPK przez AICAR [34]. Znaczące obniżenie wychwyty glukozy, mimo stymulacji AICAR, było również widoczne w przypadku mięśni szkieletowych myszy ze znokautowanym genem kodującym podjednostkę $\gamma 3$ AMPK [4]. Dlatego też, podjednostka $\gamma 3$ kinazy wydaje się najważniejsza dla niezależnego od insuliny wychwyty glukozy przez mięśnie. Ponadto konstytutywna nadekspresja AMPK jest czynnikiem wystarczającym do stymulacji transportu glukozy do mięśni szkieletowych [19]. Ostatnie doniesienia wskazują na istotne znaczenie białek TBC1D1 (Tre-2/Bub2/Cdc16 domain family, member 1 – TBC) oraz AS160, które regulują aktywność małych GTPaz z rodziny Rab odpowiedzialnych za egzocytozę pęcherzyków

zawierających GLUT4. Wykazano podwyższoną ekspresję TBC1D1 w mięśniach o metabolizmie glikolitycznym, a AS160 w mięśniach oksydacyjnych, co sugeruje ich tkankowo swoiste działanie [50]. W stanie aktywnym białka te utrzymują pęcherzyki zawierające GLUT4 w cytoplazmie, natomiast ich inhibicja przez fosforylację indukuje translokację pęcherzyków do błony komórkowej [56]. AS160 ulega fosforylacji przez kinazę Akt w odpowiedzi na stymulację mięśni insuliną [9]. Wzrost fosforylacji AS160 obserwowano również w wyniku skurczu mięśnia szkieletowego oraz inkubacji mięśni z AICAR, a fosforylacja ta była niezależna od aktywności kinazy Akt [81]. W warunkach *in vitro* wykazano, że pod wpływem stymulacji AICAR, AMPK fosforyluje bezpośrednio AS160 głównie na serynie 588, a w mniejszym stopniu na serynie 341 i treoninie 642, dzięki czemu wzmacniane jest przyłączenie do AS160 białka 14-3-3, a przez to zahamowanie aktywności AS160 [20]. Wykorzystując myszy ze znokautowanym genem kodującym podjednostki $\alpha 2$ i $\gamma 3$ AMPK, kilka grup badawczych wykazało istotnie obniżoną fosforylację AS160 w mięśniach szkieletowych w odpowiedzi na podanie AICAR, ale nie na skurcz [36,69]. W przypadku TBC1D1 jego fosforylacja na serynie 237 przez AMPK, a nie przez Akt, promowała wiązanie białka 14-3-3, a co za tym idzie zahamowanie aktywności TBC1D w komórkach miocytów L6 [12]. Przypuszcza się, że regulacja aktywności TBC1D1 i AS160 polega na połączeniu sygnałów molekularnych pochodzących od szlaku insulinowego oraz od szlaku AMPK w celu osiągnięcia maksymalnej wydajności translokacji GLUT4 do błony.

Oprócz zwiększonej translokacji GLUT4 do błon, AMPK wzmacnia również ekspresję tego białka. Ciągła stymulacja mięśni szkieletowych przez AICAR powoduje wzrost transkrypcji GLUT4 w stopniu podobnym do wysiłku fizycznego [33]. W 2003 r. wykazano, iż przy jednorazowym intensywnym wysiłku fizycznym podjednostka $\alpha 2$ AMPK jest także obecna w jądrze komórkowym [41,43]. Dowiedziono, że AMPK poprzez jednoczesną fosforylację PGC1 α oraz deacetylasy histonowej reguluje aktywność czynników jądrowych miocytów typu 2 (MEF2A i MEF2D) [38]. Następnie aktywacja tych czynników transkrypcyjnych skutkuje wzrostem ekspresji genu kodującego GLUT4 [38].

Ważnym czynnikiem wpływającym na zależny od AMPK transport glukozy do mięśni szkieletowych są cytokiny (w tym adipokiny wydzielane przez adipocyty). Dotychczas potwierdzono stymulujące działanie leptyny na transport glukozy do tkanek peryferyjnych poprzez podwyższenie ekspresji podjednostek α i β AMPK [42]. Zwiększony wychwyty glukozy skorelowany z podwyższoną fosforylacją AMPK wykazany został natomiast w ludzkich miocytach poddanych inkubacji z IL-6 [21]. Adiponektyna, hormon, którego stężenie jest znacznie obniżone u osób otyłych, również zwiększa transport glukozy do mięśni. W badaniach przeprowadzonych na miocytach linii C2C12 wykazano, że zwiększony wychwyty glukozy stymulowany adiponektyną jest związany z aktywacją AMPK [23].

Badania przeprowadzone z udziałem osób ze zdiagnozowaną opornością na insulinę wykazały, że wysiłek fizyczny jest czynnikiem w pewnym stopniu przywracającym wrażliwość tkanek peryferyjnych na ten hormon [14]. Nieznany jest mechanizm tego procesu, jednak możliwym

wyjaśnieniem jest fosforylacja substratu receptora insulinowego 1 (insulin receptor substrate 1 – IRS1) przez AMPK. Wykazano, że inkubacja mysich miocytów C2C12 z AICAR powoduje wzrost fosforylacji seryny 789 IRS1, a przez to wzrost aktywności szlaku insulinowego z udziałem kinazy 3-fosfatydyloinozytolu [29]. AMPK może poprawiać wrażliwość na insulinę także poprzez hamowanie szlaku molekularnego mTOR/kinazy S6. Białka mTOR/raptor/GβL zwane kompleksem mTOR (cel rapamycyny w komórkach ssaków, mammalian target of rapamycin) mają aktywność kinazy serynowo-treoninowej i zdolne są do fosforylacji tyrozyny 389 kinazy S6K1 [55]. Białko to zdolne jest do fosforylacji seryny 1101 IRS1, czego następstwem jest inhibicja IRS1 i szlaku insulinowego [70]. Białka kompleksu mTOR aktywowane są przez nadmiar kwasów tłuszczowych, glukozy oraz aminokwasów [73]. Uważa się, że aktywność szlaku angażującego kompleks mTOR może być główną przyczyną występowania oporności na insulinę u osób otyłych. W przypadku miocytów C2C12 zauważono, że aktywacja AMPK przez adiponektynę, skutkowałą zwiększoną wrażliwością na insulinę, a efekt ten skorelowany był z obniżeniem poziomu mTOR/S6K1 [73].

6. WNIOSKI I PERSPEKTYWY

AMPK jest białkiem wpływającym na przebieg wielu ważnych procesów metabolicznych komórki. Poprzez regulację szlaków, takich jak transport glukozy i utlenianie kwasów tłuszczowych, enzym ten odgrywa istotną rolę

w utrzymaniu homeostazy energetycznej organizmu. To, że aktywacja AMPK zwiększa tempo transportu glukozy do mięśni szkieletowych niezależnie od działania insuliny, budzi nadzieję na opracowanie skutecznego leczenia zaburzeń metabolicznych, w tym otyłości, oporności na insulinę oraz cukrzycy typu 2. Przeprowadzone badania wykazały, że stosowana od ponad 40 lat w leczeniu cukrzycy typu 2 metformina, poza aktywacją szlaku insulinowego, wzmacnia także aktywność AMPK. Działanie metforminy na białka szlaku insulinowego słabnie jednak z czasem i do terapii trzeba włączać egzogennie podawaną insulinę. Duże nadzieje na poprawę takiego stanu rzeczy wiąże się z tkanekowoswoistą aktywacją AMPK. Dotychczas odkryto kilka substancji aktywujących AMPK, których zastosowanie w zwierzęcych modelach cukrzycy typu 2 przyniosło obiecujące rezultaty. Wśród nich znalazły się naturalnie występujące w diecie alkaloidy i polifenole, a także związki syntetyczne, np. analogi nukleotydów [87]. Uważa się, że idealnym podejściem byłoby opracowanie aktywatora właściwego dla izoformy AMPK zawierającej mięśniowo swoistą podjednostkę $\gamma 3$. Specyficzna aktywacja AMPK w mięśniach może pozwolić na przywrócenie właściwego metabolizmu glukozy, mimo nieprawidłowo funkcjonującego szlaku insulinowego. Praktyczne wykorzystanie aktywatorów AMPK w leczeniu insulinooporności wymaga jednak dokładnego poznania mechanizmu działania tego enzymu oraz określenia, czy specyficzna aktywacja AMPK będzie bezpieczna z punktu widzenia utrzymania homeostazy metabolicznej mięśnia.

PIŚMIENNICTWO

- [1] Abu-Elheiga L., Brinkley W. R., Zhong L., Chirala S.S., Woldegiorgis G., Wakil S.J.: The subcellular localization of acetyl-CoA carboxylase 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2000; 97: 1444–1449
- [2] Abu-Elheiga L., Matzuk M.M., Abo-Hashema K.A., Wakil S.J.: Continuous fatty acid oxidation and reduced fat storage in mice lacking acetyl-CoA carboxylase 2. *Science*, 2001; 291: 2613–2616
- [3] Aschenbach W.G., Hirshman M.F., Fujii N., Sakamoto K., Howlett K.F., Goodyear L.J.: Effect of AICAR treatment on glycogen metabolism in skeletal muscle. *Diabetes*, 2002; 51: 567–573
- [4] Barnes B.R., Marklund S., Steiler T.L., Walter M., Hjälm G., Amarger V., Mahlapuu M., Leng Y., Johansson C., Galuska D., Lindgren K., Abrink M., Stapleton D., Zierath J.R., Andersson L.: The 5'-AMP-activated protein kinase $\gamma 3$ isoform has a key role in carbohydrate and lipid metabolism in glycolytic skeletal muscle. *J. Biol. Chem.*, 2004; 279: 38441–38447
- [5] Beg Z.H., Allmann D.W., Gibson D.M.: Modulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity with cAMP and with protein fractions of rat liver cytosol. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1973; 54: 1362–1369
- [6] Bergeron R., Ren J.M., Cadman K.S., Moore I.K., Perret P., Pypaert M., Young L.H., Semenkovich C.F., Shulman G.I.: Chronic activation of AMP kinase results in NRF-1 activation and mitochondrial biogenesis. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 2001; 281: E1340–E1346
- [7] Bonen A., Dyck D.J., Ibrahim A., Abumrad N.A.: Muscle contractile activity increases fatty acid metabolism and transport and FAT/CD36. *Am. J. Physiol.*, 1999; 276: E642–E649
- [8] Bonen A., Luiken J.J., Arumugam Y., Glatz J.F., Tandon N.N.: Acute regulation of fatty acid uptake involves the cellular redistribution of fatty acid translocase. *J. Biol. Chem.*, 2000; 275: 14501–14508
- [9] Bruss M.D., Arias E.B., Lienhard G.E., Cartee G.D.: Increased phosphorylation of Akt substrate of 160 kDa (AS160) in rat skeletal muscle in response to insulin or contractile activity. *Diabetes*, 2005; 54: 41–50
- [10] Carling D., Hardie D.G.: The substrate and sequence specificity of the AMP-activated protein kinase. Phosphorylation of glycogen synthase and phosphorylase kinase. *Biochim. Biophys. Acta*, 1989; 1012: 81–86
- [11] Carlson C.A., Kim K.H.: Regulation of hepatic acetyl coenzyme A carboxylase by phosphorylation and dephosphorylation. *J. Biol. Chem.*, 1973; 248: 378–380
- [12] Chavez J.A., Roach W.G., Keller S.R., Lane W.S., Lienhard G.E.: Inhibition of GLUT4 translocation by Tbc1d1, a Rab GTPase-activating protein abundant in skeletal muscle, is partially relieved by AMP-activated protein kinase activation. *J. Biol. Chem.*, 2008; 283: 9187–9195
- [13] Corton J.M., Gillespie J.G., Hardie D.G.: Role of the AMP-activated protein kinase in the cellular stress response. *Curr. Biol.*, 1994; 4: 315–324
- [14] Devlin J.T., Horton E.S.: Effects of prior high-intensity exercise on glucose metabolism in normal and insulin-resistant men. *Diabetes*, 1985; 34: 973–979
- [15] Dobrzyn A., Dobrzyn P.: Stearoyl-CoA desaturase – a new player in skeletal muscle metabolism regulation. *J. Physiol. Pharmacol.*, 2006; 57(Suppl.10): 31–42
- [16] Dobrzyn A., Dobrzyn P., Miyazaki M., Ntambi J.M.: Polyunsaturated fatty acids do not activate AMP-activated protein kinase in mouse tissues. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2005; 332: 892–896
- [17] Dobrzyn P., Dobrzyn A., Miyazaki M., Cohen P., Asilmaz E., Hardie D.G., Friedman J.M., Ntambi J.M.: Stearoyl-CoA desaturase 1 deficiency increases fatty acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase in liver. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2004; 101: 6409–6414
- [18] Drew B.G., Fidge N.H., Gallon-Beaumier G., Kemp B.E., Kingwell B.A.: High-density lipoprotein and apolipoprotein AI increase endothelial NO synthase activity by protein association and multisite phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2004; 101: 6999–7004
- [19] Fryer L.G., Parbu-Patel A., Carling D.: The Anti-diabetic drugs rosiglitazone and metformin stimulate AMP-activated protein kinase through distinct signaling pathways. *J. Biol. Chem.*, 2002; 277: 25226–25232
- [20] Geraghty K.M., Chen S., Harthill J.E., Ibrahim A.F., Toth R., Morrice N.A., Vandermoere F., Moorhead G.B., Hardie D.G., MacKintosh C.: Regulation of multisite phosphorylation and 14-3-3 binding of AS160 in response to IGF-1, EGF, PMA and AICAR. *Biochem. J.*, 2007; 407: 231–241

- [21] Glund S., Deshmukh A., Long Y.C., Moller T., Koistinen H.A., Caidahl K., Zierath J.R., Krook A.: Interleukin-6 directly increases glucose metabolism in resting human skeletal muscle. *Diabetes*, 2007; 56: 1630–1637
- [22] Goodyear L.J., Kahn B.B.: Exercise, glucose transport, and insulin sensitivity. *Annu. Rev. Med.*, 1998; 49: 235–261
- [23] Hada Y., Yamauchi T., Waki H., Tsuchida A., Hara K., Yago H., Miyazaki O., Ebinuma H., Kadowaki T.: Selective purification and characterization of adiponectin multimer species from human plasma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2007; 356: 487–493
- [24] Han R., Lai R., Ding Q., Wang Z., Luo X., Zhang Y., Cui G., He J., Liu W., Chen Y.: Apolipoprotein A-I stimulates AMP-activated protein kinase and improves glucose metabolism. *Diabetologia*, 2007; 50: 1960–1968
- [25] Hawley S.A., Selbert M.A., Goldstein E.G., Edelman A.M., Carling D., Hardie D.G.: 5'-AMP activates the AMP-activated protein kinase cascade, and Ca²⁺/calmodulin activates the calmodulin-dependent protein kinase I cascade, via three independent mechanisms. *J. Biol. Chem.*, 1995; 270: 27186–27191
- [26] Horman S., Vertommen D., Heath R., Neumann D., Mouton V., Woods A., Schlattner U., Wallimann T., Carling D., Hue L., Rider M.H.: Insulin antagonizes ischemia-induced Thr172 phosphorylation of AMP-activated protein kinase α -subunits in heart via hierarchical phosphorylation of Ser485/491. *J. Biol. Chem.*, 2006; 281: 5335–5340
- [27] Hulver M.W., Berggren J.R., Carper M.J., Miyazaki M., Ntambi J.M., Hoffman E.P., Thyfault J.P., Stevens R., Dohm G.L., Houmard J.A., Muoio D.M.: Elevated stearoyl-CoA desaturase-1 expression in skeletal muscle contributes to abnormal fatty acid partitioning in obese humans. *Cell Metab.*, 2005; 2: 251–261
- [28] Jäger S., Handschin C., St-Pierre J., Spiegelman B. M.: AMP-activated protein kinase (AMPK) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of PGC-1 α . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2007; 104: 12017–12022
- [29] Jakobsen S.N., Hardie D.G., Morrice N., Tornqvist H.E.: 5'-AMP-activated protein kinase phosphorylates IRS-1 on Ser-789 in mouse C2C12 myotubes in response to 5-aminoimidazole-4-carboxamide riboside. *J. Biol. Chem.*, 2001; 276: 46912–46916
- [30] Janovská A., Hatzinikolas G., Staikopoulos V., McInerney J., Mano M., Wittert G.A.: AMPK and ACC phosphorylation: effect of leptin, muscle fibre type and obesity. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 2008; 284: 1–10
- [31] Jensen T.E., Rose A.J., Jorgensen S.B., Brandt N., Schjerling P., Wojtaszewski J.F., Richter E.A.: Possible CaMKK-dependent regulation of AMPK phosphorylation and glucose uptake at the onset of mild tetanic skeletal muscle contraction. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 2007; 292: E1308–E1317
- [32] 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., Wojtaszewski J.F.: The α 2-5'AMP-activated protein kinase is a site 2 glycogen synthase kinase in skeletal muscle and is responsive to glucose loading. *Diabetes*, 2004; 53: 3074–3081
- [33] Jorgensen S.B., Trebak J.T., Viollet B., Schjerling P., Vaulont S., Wojtaszewski J.F., Richter E.A.: Role of AMPK α 2 in basal, training-, and AICAR-induced GLUT4, hexokinase II, and mitochondrial protein expression in mouse muscle. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 2007; 292: E331–E339
- [34] Jorgensen S.B., Viollet B., Andreelli F., Frosig C., Birk J.B., Schjerling P., Vaulont S., Richter E.A., Wojtaszewski J.F.: Knockout of the α 2 but not α 1 5'-AMP-activated protein kinase isoform abolishes 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1- β -4-ribofuranoside but not contraction-induced glucose uptake in skeletal muscle. *J. Biol. Chem.*, 2004; 279: 1070–1079
- [35] Koh H.J., Arnolds D.E., Fujii N., Tran T.T., Rogers M.J., Jessen N., Li Y., Liew C.W., Ho R.C., Hirshman M.F., Kulkarni R.N., Kahn C.R., Goodyear L.J.: Skeletal muscle-selective knockout of LKB1 increases insulin sensitivity, improves glucose homeostasis, and decreases TRB3. *Mol. Cell. Biol.*, 2006; 26: 8217–8227
- [36] Kramer H.F., Witczak C.A., Fujii N., Jessen N., Taylor E.B., Arnolds D.E., Sakamoto K., Hirshman M.F., Goodyear L.J.: Distinct signals regulate AS160 phosphorylation in response to insulin, AICAR, and contraction in mouse skeletal muscle. *Diabetes*, 2006; 55: 2067–2076
- [37] Kurth-Kraczek E.J., Hirshman M.F., Goodyear L.J., Winder W.W.: 5' AMP-activated protein kinase activation causes GLUT4 translocation in skeletal muscle. *Diabetes*, 1999; 48: 1667–1671
- [38] Li L., Chen H., McGee S.L.: Mechanism of AMPK regulating GLUT4 gene expression in skeletal muscle cells. *Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi*, 2008; 25: 161–167
- [39] Long Y.C., Barnes B.R., Mahlapuu M., Steiler T.L., Martinsson S., Leng Y., Wallberg-Henriksson H., Andersson L., Zierath J.R.: Role of AMP-activated protein kinase in the coordinated expression of genes controlling glucose and lipid metabolism in mouse white skeletal muscle. *Diabetologia*, 2005; 48: 2354–2364
- [40] McBride A., Hardie D.G.: AMP-activated protein kinase – a sensor of glycogen as well as AMP and ATP? *Acta Physiol.*, 2009; 196: 99–113
- [41] McGee S.L., Howlett K.F., Starkie R.L., Cameron-Smith D., Kemp B.E., Hargreaves M.: Exercise increases nuclear AMPK α 2 in human skeletal muscle. *Diabetes*, 2003; 52: 926–928
- [42] Minokoshi Y., Kim Y.B., Peroni O.D., Fryer L.G., Müller C., Carling D., Kahn B.B.: Leptin stimulates fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nature*, 2002; 415: 339–343
- [43] Mora S., Pessin J.E.: The MEF2A isoform is required for striated muscle-specific expression of the insulin-responsive GLUT4 glucose transporter. *J. Biol. Chem.*, 2000; 275: 16323–16328
- [44] Morris D.L., Rui L.: Recent advances in understanding leptin signaling and leptin resistance. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 2009; 297: E1247–E1259
- [45] Muoio D.M., Dohm G.L., Fiedorek F.T. Jr., Tapscott E.B., Coleman R.A.: Leptin directly alters lipid partitioning in skeletal muscle. *Diabetes*, 1997; 46: 1360–1363
- [46] Murrant C.L., Reid M.B.: Detection of reactive oxygen and reactive nitrogen species in skeletal muscle. *Microsc. Res. Tech.*, 2001; 55: 236–248
- [47] Musi N., Goodyear L.J.: AMP-activated protein kinase and muscle glucose uptake. *Acta Physiol. Scand.*, 2003; 178: 337–345
- [48] Nielsen J.N., Wojtaszewski J.F.: Regulation of glycogen synthase activity and phosphorylation by exercise. *Proc. Nutr. Soc.*, 2004; 63: 233–237
- [49] Nieto-Vazquez I., Fernández-Veledo S., de Alvaro C., Lorenzo M.: Dual role of interleukin-6 in regulating insulin sensitivity in murine skeletal muscle. *Diabetes*, 2008; 57: 3211–3221
- [50] Pehmoller C., Trebak J.T., Birk J.B., Chen S., Mackintosh C., Hardie D.G., Richter E.A., Wojtaszewski J.F.: Genetic disruption of AMPK signaling abolishes both contraction- and insulin-stimulated TBC1D1 phosphorylation and 14-3-3 binding in mouse skeletal muscle. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 2009; 297: E665–E675
- [51] Pimenta A.S., Gaidhu M.P., Habib S., So M., Fedici S., Mirpourian M., Mushev M., Curi R., Ceddia R.B.: Prolonged exposure to palmitate impairs fatty acid oxidation despite activation of AMP-activated protein kinase in skeletal muscle cells. *J. Cell. Physiol.*, 2008; 217: 478–485
- [52] Rafaeloff-Phail R., Ding L., Conner L., Yeh W.K., McClure D., Guo H., Emerson K., Brooks H.: Biochemical regulation of mammalian AMP-activated protein kinase activity by NAD and NADH. *J. Biol. Chem.*, 2004; 279: 52934–52939
- [53] Roepstorff C., Vistisen B., Donsmark M., Nielsen J. N., Galbo H., Green K.A., Hardie D.G., Wojtaszewski J.F., Richter E.A., Kiens B.: Regulation of hormone-sensitive lipase activity and Ser563 and Ser565 phosphorylation in human skeletal muscle during exercise. *J. Physiol.*, 2004; 560: 551–562
- [54] Roman E.A., Reis D., Romanatto T., Maimoni D., Ferreira E.A., Santos G.A., Torsoni A.S., Velloso L.A., Torsoni M.A.: Central leptin action improves skeletal muscle AKT, AMPK, and PGC1 α activation by hypothalamic PI3K-dependent mechanism. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 2010; 314: 62–69
- [55] Saitoh M., Pullen N., Brennan P., Cantrell D., Dennis P.B., Thomas G.: Regulation of an activated S6 kinase 1 variant reveals a novel mammalian target of rapamycin phosphorylation site. *J. Biol. Chem.*, 2002; 277: 20104–20112
- [56] Sakamoto K., Holman G.D.: Emerging role for AS160/TBC1D4 and TBC1D1 in the regulation of GLUT4 traffic. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 2008; 295: E29–E37
- [57] Sampath H., Ntambi J.M.: The fate and intermediary metabolism of stearic acid. *Lipids*, 2005; 40: 1187–1191
- [58] Sanders M.J., Grondin P.O., Hegarty B.D., Snowden M.A., Carling D.: Investigating the mechanism for AMP activation of the AMP-activated protein kinase cascade. *Biochem. J.*, 2007; 403: 139–148
- [59] Sandström M.E., Zhang S.J., Bruton J., Silva J.P., Reid M.B., Westerblad H., Katz A.: Role of reactive oxygen species in contraction-mediated glucose transport in mouse skeletal muscle. *J. Physiol.*, 2006; 575: 251–262

- [60] Scott J.W., Hawley S.A., Green K.A., Anis M., Stewart G., Scullion G.A., Norman D.G., Hardie D.G.: CBS domains form energy-sensing modules whose binding of adenosine ligands is disrupted by disease mutations. *J. Clin. Invest.*, 2004; 113: 274–284
- [61] Sim A.T., Hardie D.G.: The low activity of acetyl-CoA carboxylase in basal and glucagon-stimulated hepatocytes is due to phosphorylation by the AMP-activated protein kinase and not cyclic AMP-dependent protein kinase. *FEBS Lett.*, 1988; 233: 294–298
- [62] Smith A.C., Bruce C.R., Dyck D.J.: AMP kinase activation with AICAR further increases fatty acid oxidation and blunts triacylglycerol hydrolysis in contracting rat soleus muscle. *J. Physiol.*, 2005; 565: 547–553
- [63] Steinberg G.R., Michell B.J., van Denderen B.J., Watt M.J., Carey A.L., Fam B.C., Andrikopoulos S., Proietto J., Görgün C.Z., Carling D., Hotamisligil G.S., Febbraio M.A., Kay T.W., Kemp B.E.: Tumor necrosis factor α -induced skeletal muscle insulin resistance involves suppression of AMP-kinase signaling. *Cell Metab.*, 2006; 4: 465–474
- [64] Steinberg G.R., Rush J.W., Dyck D.J.: AMPK expression and phosphorylation are increased in rodent muscle after chronic leptin treatment. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 2003; 284: E648–E654
- [65] Steinberg G.R., Smith A.C., Van Denderen B.J., Chen Z., Murthy S., Campbell D.J., Heigenhauser G.J., Dyck D.J., Kemp B.E.: AMP-activated protein kinase is not down-regulated in human skeletal muscle of obese females. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2004; 89: 4575–4580
- [66] Suter M., Riek U., Tuerk R., Schlattner U., Wallimann T., Neumann D.: Dissecting the role of 5'-AMP for allosteric stimulation, activation, and deactivation of AMP-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.*, 2006; 281: 32207–32216
- [67] Towler M.C., Hardie D.G.: AMP-activated protein kinase in metabolic control and insulin signaling. *Circ Res.*, 2007; 100: 328–341
- [68] Toyoda T., Hayashi T., Miyamoto L., Yonemitsu S., Nakano M., Tanaka S., Ebihara K., Masuzaki H., Hosoda K., Inoue G., Otake A., Sato K., Fushiki T., Nakao K.: Possible involvement of the $\alpha 1$ isoform of 5'AMP-activated protein kinase in oxidative stress-stimulated glucose transport in skeletal muscle. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 2004; 287: E166–E173
- [69] Treebak J.T., Glund S., Deshmukh A., Klein D.K., Long Y.C., Jensen T.E., Jorgensen S.B., Viollet B., Andersson L., Neumann D., Wallimann T., Richter E.A., Chibalin A.V., Zierath J.R., Wojtaszewski J.F.: AMPK-mediated AS160 phosphorylation in skeletal muscle is dependent on AMPK catalytic and regulatory subunits. *Diabetes*, 2006; 55: 2051–2058
- [70] Tremblay F., Brule S., Hee Um S., Li Y., Masuda K., Roden M., Sun X.J., Krebs M., Polakiewicz R.D., Thomas G., Marette A.: Identification of IRS-1 Ser-1101 as a target of S6K1 in nutrient- and obesity-induced insulin resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2007; 104: 14056–14061
- [71] Verhoeven A.J., Woods A., Brennan C.H., Hawley S.A., Hardie D.G., Scott J., Beri R.K., Carling D.: The AMP-activated protein kinase gene is highly expressed in rat skeletal muscle. Alternative splicing and tissue distribution of the mRNA. *Eur. J. Biochem.*, 1995; 228: 236–243
- [72] Viollet B., Lantier L., Devin-Leclerc J., Hebrard S., Amouyal C., Mounier R., Foretz M., Andreelli F.: Targeting the AMPK pathway for the treatment of Type 2 diabetes. *Front. Biosci.*, 2009; 14: 3380–3400
- [73] Wang C., Mao X., Wang L., Liu M., Wetzel M.D., Guan K.L., Dong L.Q., Liu F.: Adiponectin sensitizes insulin signaling by reducing p70 S6 kinase-mediated serine phosphorylation of IRS-1. *J. Biol. Chem.*, 2007; 282: 7991–7996
- [74] Wang Y., Li X., Guo Y., Chan L., Guan X.: α -Lipoic acid increases energy expenditure by enhancing adenosine monophosphate-activated protein kinase-peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator- α signaling in the skeletal muscle of aged mice. *Metabolism*, 2010; 59: 967–976
- [75] Watt M.J., Dzamko N., Thomas W.G., Rose-John S., Ernst M., Carling D., Kemp B.E., Febbraio M.A., Steinberg G.R.: CNTF reverses obesity-induced insulin resistance by activating skeletal muscle AMPK. *Nat. Med.*, 2006; 12: 541–548
- [76] Watt M.J., Holmes A.G., Pinnamaneni S.K., Garnham A.P., Steinberg G.R., Kemp B.E., Febbraio M.A.: Regulation of HSL serine phosphorylation in skeletal muscle and adipose tissue. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 2006; 290: E500–E508
- [77] Watt M.J., Steinberg G.R., Chen Z.P., Kemp B.E., Febbraio M.A.: Fatty acids stimulate AMP-activated protein kinase and enhance fatty acid oxidation in L6 myotubes. *J. Physiol.*, 2006; 574: 139–147
- [78] Winder W.W., Hardie D.G.: Inactivation of acetyl-CoA carboxylase and activation of AMP-activated protein kinase in muscle during exercise. *Am. J. Physiol.*, 1996; 270: E299–E304
- [79] Winder W.W., Holmes B.F., Rubink D.S., Jensen E.B., Chen M., Holloszy J.O.: Activation of AMP-activated protein kinase increases mitochondrial enzymes in skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.*, 2000; 88: 2219–2226
- [80] Winder W.W., Thomson D.M.: Cellular energy sensing and signaling by AMP-activated protein kinase. *Cell Biochem. Biophys.*, 2007; 47: 332–347
- [81] Witczak C.A., Fujii N., Hirshman M.F., Goodyear L.J.: Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase kinase- α regulates skeletal muscle glucose uptake independent of AMP-activated protein kinase and Akt activation. *Diabetes*, 2007; 56: 1403–1409
- [82] Witczak C.A., Sharoff C.G., Goodyear L.J.: AMP-activated protein kinase in skeletal muscle: from structure and localization to its role as a master regulator of cellular metabolism. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2008; 65: 3737–3755
- [83] Woods A., Johnstone S.R., Dickerson K., Leiper F.C., Fryer L.G., Neumann D., Schlattner U., Wallimann T., Carlson M., Carling D.: LKB1 is the upstream kinase in the AMP-activated protein kinase cascade. *Curr. Biol.*, 2003; 13: 2004–2008
- [84] Xiao B., Heath R., Saiu P., Leiper F.C., Leone P., Jing C., Walker P.A., Haire L., Eccleston J.F., Davis C.T., Martin S.R., Carling D., Gamblin S.J.: Structural basis for AMP binding to mammalian AMP-activated protein kinase. *Nature*, 2007; 449: 496–500
- [85] Yamauchi T., Nio Y., Maki T., Kobayashi M., Takazawa T., Iwabu M., Okada-Iwabu M., Kawamoto S., Kubota N., Kubota T., Ito Y., Kamon J., Tsuchida A., Kumagai K., Kozono H., Hada Y., Ogata H., Tokuyama K., Tsunoda M., Ide T., Murakami K., Awazawa M., Takamoto I., Froguel P., Hara K., Tobe K., Nagai R., Ueki K., Kadowaki T.: Targeted disruption of AdipoR1 and AdipoR2 causes abrogation of adiponectin binding and metabolic actions. *Nat. Med.*, 2007; 13: 332–339
- [86] Young M.E., Radda G.K., Leighton B.: Activation of glycogen phosphorylase and glycogenolysis in rat skeletal muscle by AICAR – an activator of AMP-activated protein kinase. *FEBS Lett.*, 1996; 382: 43–47
- [87] Zhou G., Sebbat I.K., Zhang B.B.: AMPK activators – potential therapeutics for metabolic and other diseases. *Acta Physiol.*, 2009; 196: 175–190

Autorzy deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.