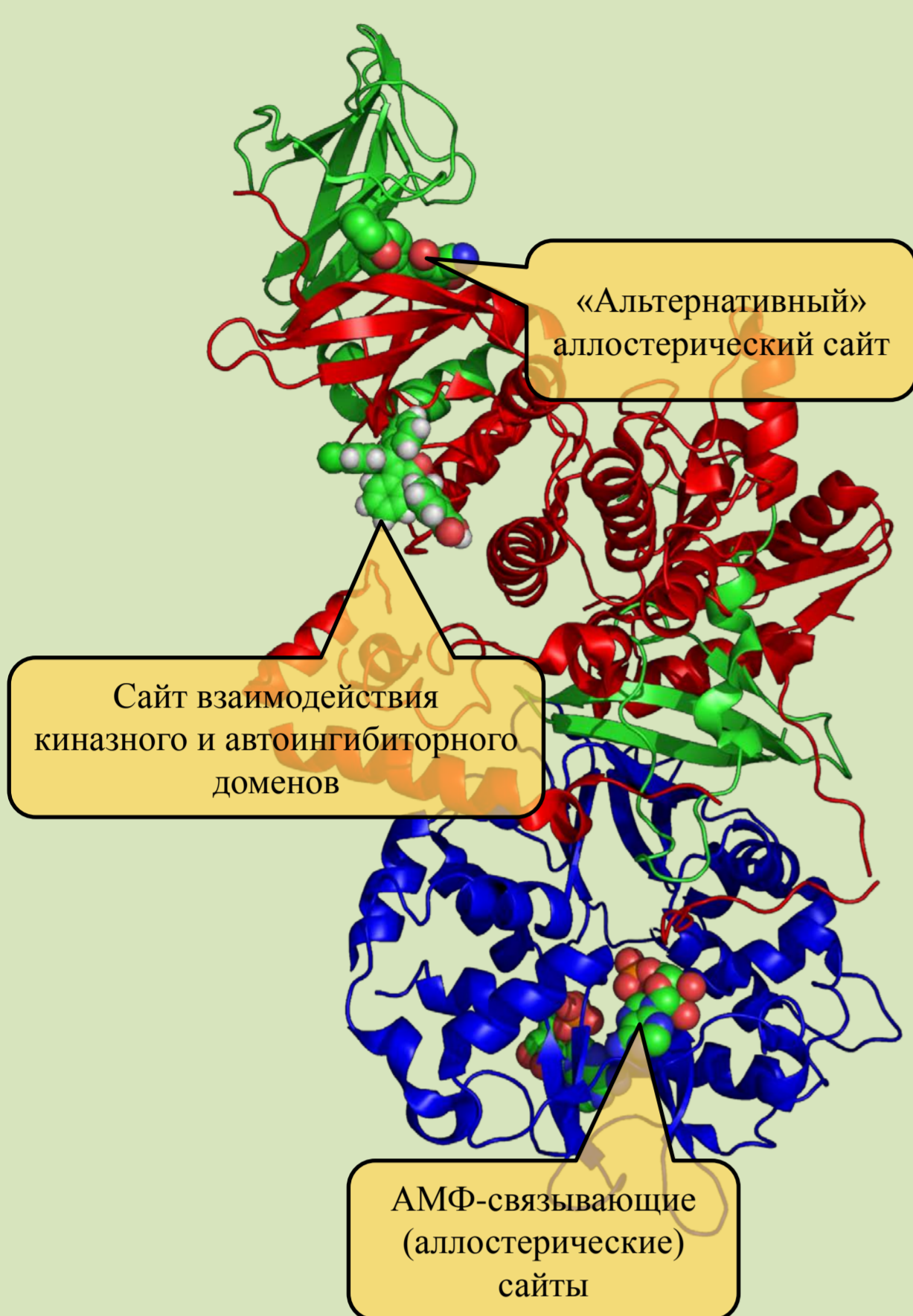
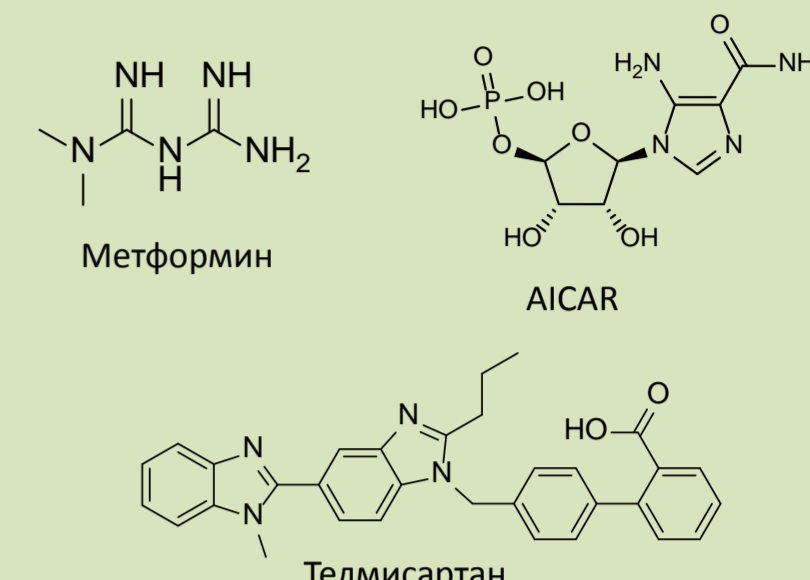


АМФ-активируемая протеинкиназа (АМРК) является основным регулирующим элементом, контролирующим протекание энергопотребляющих и энергопродуцирующих процессов. Экспрессия АМРК осуществляется практически во всех тканях и органах. В ответ на изменение энергетического состояния (снижение уровня АТФ, повышение уровня АМФ) АМРК активируется и блокирует АТФ-потребляющие процессы, в то же время стимулируя процессы, направленные на производство АТФ. За счет подобного переключения между энергопотребляющими и энергопродуцирующими процессами АМРК поддерживает энергетический гомеостаз как на клеточном уровне, так и на уровне организма в целом.

За последние годы благодаря интенсивным исследованиям в области процесса активации АМРК был очерчен достаточно широкий круг заболеваний, связанный прямо или косвенно с нарушением энергетического баланса, для которых фармакологическая активация АМРК может иметь или уже имеет терапевтическое значение. Среди них метаболический синдром, диабет второго типа, ожирение, ишемическая болезнь сердца, сердечная недостаточность, атеросклероз, инсульт и даже рак. Активаторы АМРК также известны в качестве стимуляторов мышечной активности.



Гетеротримерный комплекс АМРК: красным обозначена каталитическая α -субъединица, зеленым – регуляторная β -субъединица, синим – регуляторная γ -субъединица.

Считается, что активация киназного комплекса зависит от двух факторов: фосфорилирования активирующими киназами (АМРКК) и связывания с АМФ. Первый фактор заключается в фосфорилировании основного активационного сайта Thr-172 и представляет собой так называемый АМФ-независимый путь активации. Второй фактор определяется связыванием АМФ по АМФ-связывающим сайтам, что приводит к конформационным изменениям всего комплекса, т.е. аллостерической активации. 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. С другой стороны, аллостерически активный комплекс может дополнительно активироваться за счет фосфорилирования. Однако, описаны случаи, когда активация АМРК достигается только за счет одного фактора.

- В настоящее время существует три фармакологически значимых подхода к активации АМРК:
- разработка АМФ-миметиков, взаимодействующих с АМРК по АМФ-связывающимся сайтам;
 - разработка ингибиторов взаимодействия автоингибиторного и киназного доменов;
 - поиск соединений, взаимодействующих по «альтернативному» аллостерическому сайту.

Основные методы оценки активности АМРК являются определение степени ее фосфорилирования по активационному сайту Thr-172 и степени фосфорилирования основного субстрата АМРК – АСС (ацетил-КоА-карбоксилаза). Однако, оба метода не отражают реальной киназной активности АМРК, так как:

- 1) фосфорилирование активационного сайта АМРК не является необходимым условием активации;
- 2) фосфорилирование АСС может осуществляться другими киназами, помимо АМРК.

Для изучения процессов активации/инактивации АМРК в ответ на различные стрессовые условия был разработан FRET-биосенсор [1], в основе которого лежит синтетический субстрат АМРК – smA. Основная особенность smA заключается в том, что он является «идеальным» субстратом для АМРК, т.е. при переходе в активное состояние АМРК фосфорилирует его в первую очередь.

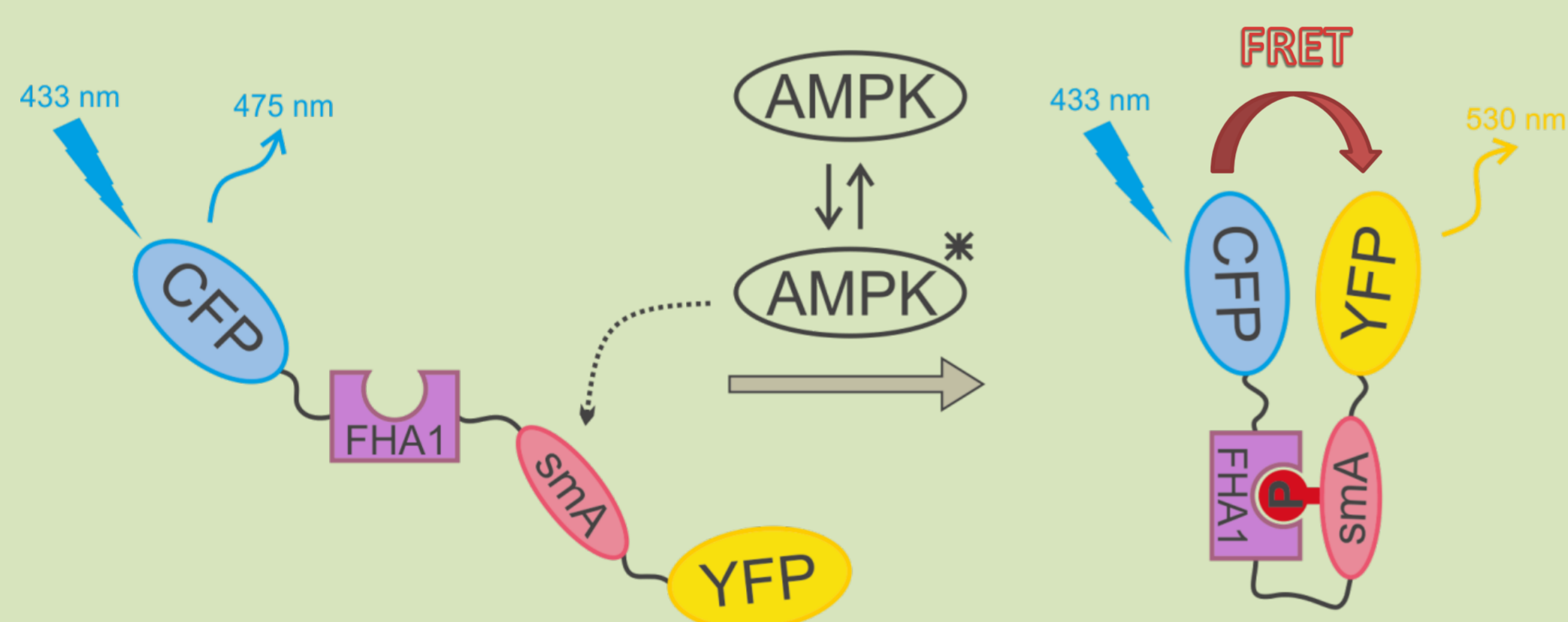
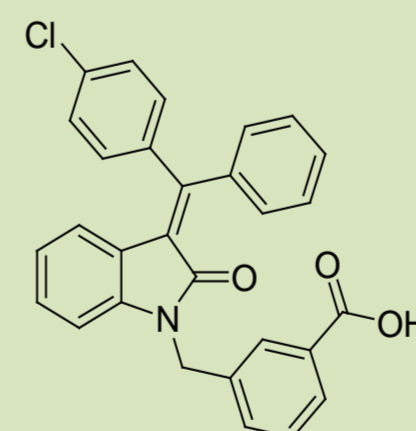
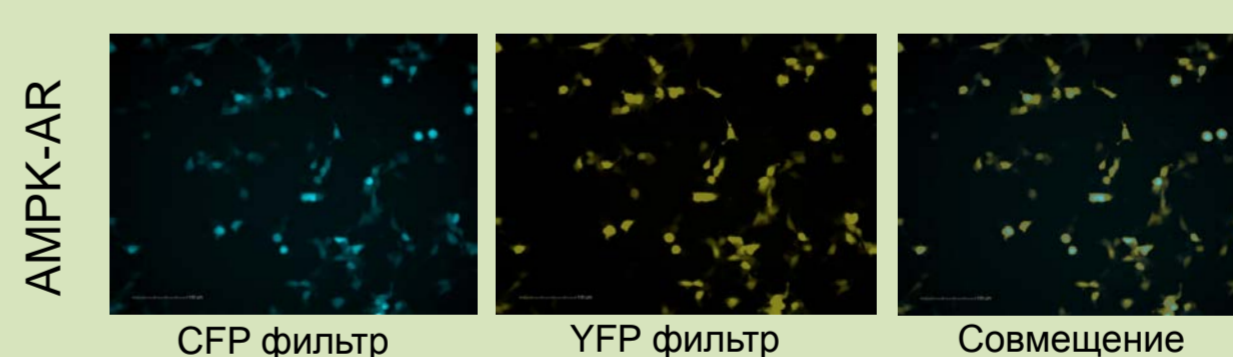


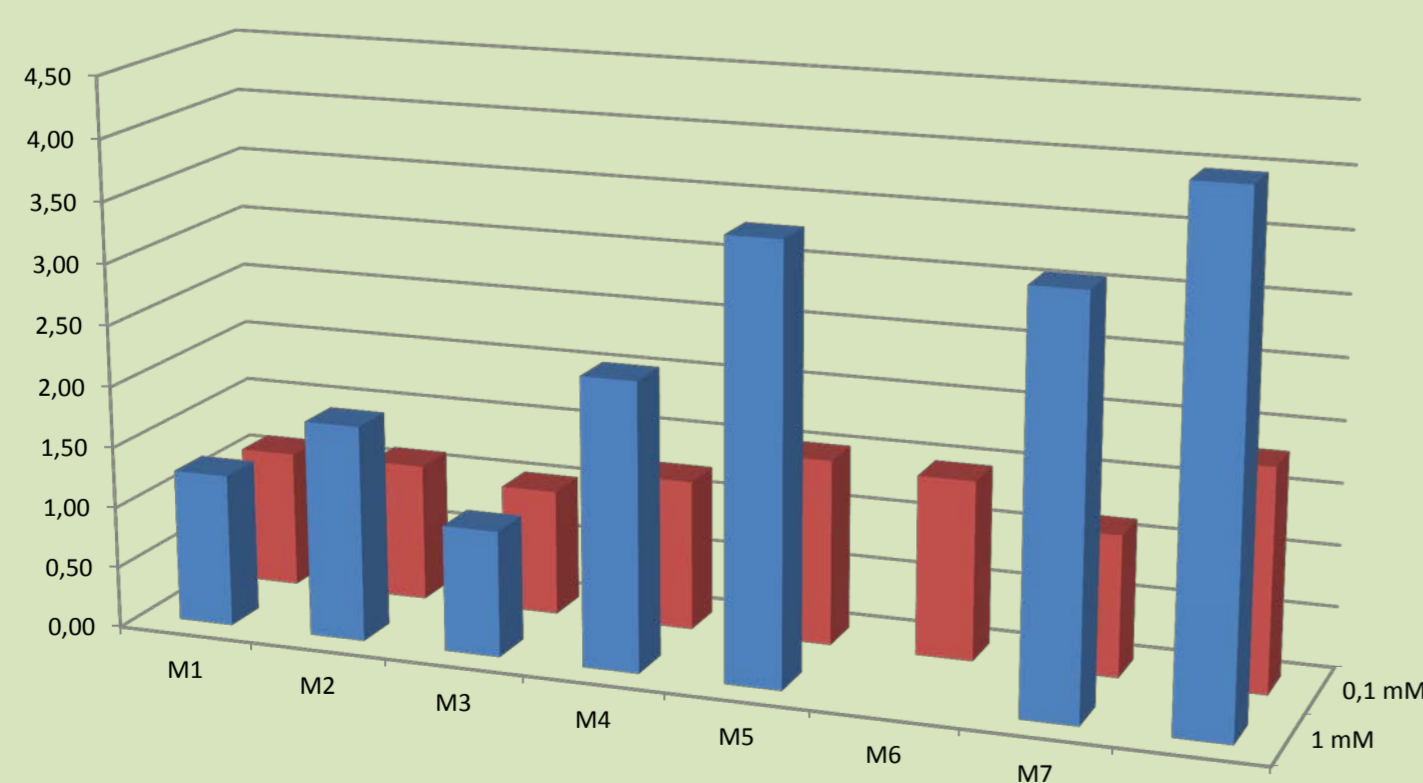
Схема функционирования FRET-биосенсора для оценки активации АМРК: FHA1 = forkhead-associated domain – домен, распознающий фосфотреонин) smA = substrate motif of AMPK – «идеальный» субстрат АМРК (GSGEGSTKMRRVAT*LVDLGTGGSEL)

Нами была создана стабильная клеточная линия, экспрессирующая FRET-биосенсор для оценки активации АМРК. Для создания тест-системы использовались клетки H1299. Был разработан протокол эксперимента, условия которого адаптированы для проведения скрининга на мультимодальном ридере ClarioStar с использованием 96- и 384-луночных планшетов.



Compound 24

В качестве позитивного контроля наиболее эффективным оказалось использование наряду с AICAR и 2-дезоксиглюкозой соединения C24, активатора АМРК, действующего путем ингибирования взаимодействия киназного и автоингибиторного доменов.



$$\text{«АКТИВНОСТЬ»} = \frac{YFP_{\text{экс}} - YFP_{\text{контр}}}{CFP_{\text{экс}} - CFP_{\text{контр}}}$$

ОСНОВНЫЕ ПРЕИМУЩЕСТВА РАЗРАБОТАННОЙ ТЕСТ-СИСТЕМЫ

- Отражает непосредственную активность АМРК независимо от механизма активации;
- Созданная тест-система обладает существенно большим динамическим диапазоном по сравнению с ранее описанными;
- Максимальный активирующий эффект достигается через 20-30 минут от начала эксперимента;
- Позволяет автоматизировать испытания больших библиотек соединений.