

Kluczowa rola kinazy białkowej aktywowanej przez AMP (AMPK) w procesach starzenia

Anna Michalik*

Robert Jarzyna✉

Zakład Regulacji Metabolizmu, Instytut Biochemii, Wydział Biologii Uniwersytetu Warszawskiego

✉ Zakład Regulacji Metabolizmu, Instytut Biochemii, Wydział Biologii UW, ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa; tel.: (22) 554 32 04, e-mail: rjarzyna@biol.uw.edu.pl

*Studentka Wydziału Biologii Uniwersytetu Warszawskiego

Artykuł otrzymano 13 czerwca 2016 r.
Artykuł zaakceptowano 12 sierpnia 2016 r.

Słowa kluczowe: AMPK, starzenie, długowieczność

Wykaz skrótów: AICAR – 5-aminoimidazo-4-karboksyamidorybozyd; AMPK – kinaza białkowa aktywowana przez AMP; ATM (ang. *ataxia telangiectasia mutated*) – kinaza białkowa serynowo-treoninowa aktywowana przez przerwanie obu nici DNA; CaMKK – kinaza kinaz Ca^{2+} /kalmodulino zależnych β ; CDK – kinaza białkowa zależna od cyklin; CR – restrykcja kaloryczna; CRTC-1 – koaktywator transkrypcji regulowany przez czynnik CREB; EGCG – galusan epigallokatechiny; FoxO – czynnik transkrypcyjny FoxO; IGF-1 – insulinopodobny czynnik wzrostu 1; IL – interleukina; LKB1 – kod nadany przez Chugai Pharmaceutical kinazie serynowo-treoninowej 11; mTOR – ssaczy cel rapamycyny; Namp1 – fosforybozylotransferaza nikotynamidu; NF- κ B – czynnik transkrypcyjny κ B; p21 – białko p21; p53 – białko p53; PGC1 α – koaktywator proliferatora peroksyosomów; PP2C – fosfataza 2C; Raptor – regulacyjne białko związane z TOR; ROS – reaktywne formy tlenu; S6K – kinaza fosforylująca białko rybosomalne S6; Sir2 – sirtuina drożdżowa, białko Sir; SIRT – sirtuina; TGF- β – transformujący czynnik wzrostu β ; TNF- α – czynnik martwicy nowotworu α ; TORC – kompleks białka mTOR; TSC – tuberyna; ULK1 – kinaza serynowo-treoninowa

STRESZCZENIE

Starzenie jest jednym z najintensywniej i najdłużej badanych, a mimo to wciąż nie do końca poznanych aspektów w biologii. Okazuje się, że istotną rolę w wielu procesach starzenia pełni kinaza białkowa aktywowana przez AMP (AMPK), jednak fakt ten jest często pomijany w pracach związanych ze starzeniem. W niniejszej pracy podsumowano informacje dotyczące udziału AMPK w procesach starzenia. Wskazano na udział AMPK w regulacji mechanizmów starzenia zależnych od: restrykcji kalorycznej, mTOR, p53, sirtuin, autofagii, stanów zapalnych oraz efektów wywołanych przez polifenole.

WPROWADZENIE

Od najdawniejszych czasów ludzie poszukują sposobów na długie, pozabawione chorób życie. Opublikowane pod koniec 2012 roku wyniki, zebrane w latach 1970-2010, dotyczące długości życia ludności z całego świata, pokazały, że mimo dość istotnych różnic, m.in. w dostępie do opieki medycznej czy pożywienia między poszczególnymi krajami, średnia wieku, jak i liczba osób w podeszłym wieku wzrasta [1]. Nie oznacza to jednak, że spowolnieniu uległ sam proces starzenia. Wpływ na wzrost długości życia ma tu w głównej mierze znaczący spadek liczby przedwczesnych zgonów. Aby zrozumieć komórkowe i molekularne przyczyny starzenia, należy wyjaśnić i zrozumieć funkcjonowanie wielorakich mechanizmów, powodujących akumulację uszkodzeń oraz sieć systemów działających, by uszkodzenia te usuwać. Starzenie, mimo że od wieków jest przedmiotem wielu badań na całym świecie, jest nie do końca poznany aspekt biologii żywych organizmów [2]. W naturalnym środowisku zwierzęta rzadko mają szanse dożyć wieku maksymalnego, charakterystycznego dla swojego gatunku, ponieważ narażone są na wiele innych, niezwiązanych z tym procesem zjawisk, takich jak głód, choroby czy drapieżnictwo. Dlatego też badanie molekularnych przyczyn starzenia zachodzi zazwyczaj w warunkach kontrolowanych. Dzięki takim badaniom, prowadzonym na różnych gatunkach, możemy zdefiniować starzenie jako zwiększające się wraz z upływem czasu prawdopodobieństwo zgonu, spowodowane stopniową utratą integralności i funkcjonalności procesów zachodzących w obrębie komórki [3].

Starzenie jest skomplikowanym, heterogennym i wieloczynnikowym procesem, który jest konsekwencją zarówno wpływu genów, jak i środowiska. Jest regulowane przez wiele molekularnych szlaków, które są zachowane w ewolucji [4]. Za sam proces starzenia odpowiada bardzo wiele złożonych, jednak wciąż nie dość dobrze poznanych mechanizmów [5]. Wiadomo, że jest związane z nagromadzeniem się uszkodzonych białek i organelli komórkowych, dysfunkcją mitochondriów i zaburzeniem równowagi metabolicznej. Zmiany te, występujące na poziomie komórkowym, pociągają za sobą zmiany w poszczególnych tkankach, a co za tym idzie w całym organizmie, prowadząc do spadku długości życia [6,7].

W latach 60. minionego wieku Leonard Hayflick i Paul Moorhead przeprowadzili badanie dotyczące starzenia komórkowego. Wykazali oni, że fibroblasty wyizolowane z płuc, hodowane *in vitro*, przestają się dzielić w momencie przejścia przez określoną liczbę podziałów, ale nie prowadzi to do ich śmierci. Zmienia się natomiast ich morfologia. Jednak mogą one żyć i względnie dobrze funkcjonować w hodowli jeszcze przez długi czas, choć wykazują tym więcej oznak starzenia, im bliżej jest im do osiągnięcia określonego limitu podziałów. Zmiany te dotyczą między innymi wielkości i rozplaszczania komórki, wzrostu ziarnistości czy skracania telomerów. Zaobserwowanie faktu, że komórki tracą potencjał replikacyjny, a w rezultacie starzeją się, umożliwiło opisanie tego zjawiska jako wyczerpania zdolności replikacyjnych. Nazwano je od imienia głównego odkrywcy limitem Hayflicka, definiowanym jako maksymalna licz-

ba podziałów, charakterystyczna dla komórki. Odkrycie to obaliło dogmat w biologii, który głosił, że normalne komórki, hodowane w warunkach laboratoryjnych, mogą dzielić się w nieskończoność [8,9].

Niedługo potem okazało się, że był to przełom w badaniach nad procesami starzenia, który rzucił nowe światło i nadał sens badaniu sieci skomplikowanych mechanizmów i powiązań. Dziś wiemy, że starzenie komórek zaobserwowane przez Hayflicka spowodowane jest skracaniem się telomerów [10]. Mimo to wiele aspektów dotyczących tego procesu jest wciąż niejasnych. Badacze poszukują odpowiedzi na pytanie, co tak naprawdę odpowiada za nieodwracalne zmiany w organizmie, postępujące z wiekiem. Pomimo istnienia wielu teorii, żadna z nich zdaje się nie dawać odpowiedzi na wszystkie pytania dotyczące mechanizmów starzenia.

TEORIE STARZENIA

O starzeniu możemy mówić, gdy zostaną spełnione dwa główne kryteria, które są uniwersalne dla organizmów żywych, od drożdży, aż po ssaki. Po pierwsze prawdopodobieństwo śmierci wzrasta wraz z wiekiem organizmu. Poza tym u wszystkich przedstawicieli danego gatunku muszą pojawiać się charakterystyczne dla postępującego starzenia zmiany fenotypowe. To drugie kryterium umożliwia odróżnienie samego procesu starzenia od chorób, których częstość występowania wzrasta wraz z wiekiem, takich jak nowotwory, choroby układu krążenia czy cukrzyca typu II. Najistotniejszą różnicą jest to, że fenotyp charakterystyczny dla zaawansowanego wieku występuje u wszystkich osobników danego gatunku, podczas gdy choroby dotyczą tylko niektórych z nich. Tłumacząc przyczyny starzenia powinno się uwzględniać także nasilające się ryzyko wystąpienia wspomnianych chorób [11].

Użyto wielu strategii i modeli, aby zrozumieć naturę mechanizmów leżących u podstaw starzenia. Aby wyjaśnić mechanizmy starzenia, każda z hipotez powinna wyjaśniać trzy warunki: dlaczego organizmy ulegają postępującemu i nieodwracalnemu upośledzeniu funkcji fizjologicznych w późnym życiu, dlaczego oczekiwana oraz średnia długość życia różnią się między gatunkami oraz dlaczego eksperymentalne diety, takie jak restrakcja kaloryczna, opóźniają pojawienie się wielu fizjologicznych zmian związanych z wiekiem oraz wydłużają średnią i maksymalną długość życia u zwierząt [12].

Jednym z popularniejszych założeń dotyczących przyczyn starzenia jest teoria wolnych rodników, inaczej zwana teorią stresu oksydacyjnego, zaproponowana już w 1956 roku przez Denhama Harmana. Zakłada ona, że normalnie produkowane w komórce reaktywne formy tlenu (ROS, ang. *reactive oxygen species*,) odpowiedzialne są za powstawanie licznych uszkodzeń w składnikach znajdujących się w komórce. Wysoka reaktywność tych cząsteczek uszkadza białka, lipidy i kwasy nukleinowe. Uszkodzenia te, kumulując się, prowadzą do zmian aktywności niektórych szlaków metabolicznych w komórkach i tkankach, co w efekcie powoduje rozwój procesu starzenia, pojawienie się chorób, których częstość występowania wzrasta wraz z wiekiem i

śmierć organizmu [13,14]. ROS są produkowane głównie w mitochondriach, przede wszystkim jako produkt uboczny reakcji łańcucha oddechowego. Z tego względu organella te są jednocześnie najbardziej wrażliwymi na działanie ROS strukturami [15].

Rozszerzeniem teorii wolnorodnikowej jest mitochondrialna teoria starzenia, która głosi, że nagromadzenie ROS prowadzi do mutacji mitochondrialnego DNA i uszkodzeń innych części mitochondriów. W rezultacie czynniki te prowadzą do przyspieszenia procesu starzenia [16,17]. Jednakże liczne badania przeprowadzone w ostatnich latach wskazują, że zmiany wywołane akumulacją wolnych rodników nie muszą aktywować procesów starzenia [18-20]. Niemniej jednak wydaje się, że zaburzenia mitochondrialne odgrywają istotną rolę w procesie starzenia [21].

Przyczyny starzenia upatruje się także w niestabilności genomu, powodowanej akumulacją uszkodzeń DNA, gromadzących się w ciągu życia [22]. Integralność i stabilność genomu może ulec zmianom w odpowiedzi na zewnętrzne czynniki biologiczne, chemiczne czy zagrożenia powstające wewnątrz genomu, takie jak błędy podczas replikacji, których szkodliwe działanie musi być neutralizowane. Zmiany spowodowane tymi czynnikami mogą wywierać wiele efektów na genom, powodując zachodzenie mutacji punktowych, translokacji, zmian w obrębie chromosomów czy skracania się telomerów [22,23]. Z tego względu organizmy wykształciły kompleksową sieć mechanizmów naprawy DNA, które zapewniają im zdolność do radzenia sobie z uszkodzeniami spowodowanymi przez różnorodne czynniki [24]. Systemy zapewniające stabilność genomu zawierają specyficzne mechanizmy utrzymujące odpowiednią długość i funkcjonalność telomerów oraz zapewniają integralność mitochondrialnego DNA [25,26].

Na uwagę zasługuje też teoria głosząca, że starzenie jest związane ze skracaniem się telomerów, czyli krótkich powtarzających się sekwencji obecnych na końcach chromosomów. O ile podczas replikacji nic wiodąca ulega syntezie w sposób ciągły, o tyle polimeraza DNA nie jest zdolna kompletnej syntezy telomerów na nici opóźnionej DNA, gdyż dobudowuje ona nukleotydy tylko w kierunku 5' → 3' i wymaga do reakcji starterów. Nic ta syntetyzowana jest w kawałkach, zwanych fragmentami Okazaki. Po każdym cyklu replikacyjnym, podczas łączenia fragmentów Okazaki i usuwania starterów, telomery ulegają skracaniu na końcach o określoną liczbę zasad. Aby uniknąć procesu skracania organizmy wykształciły wyspecjalizowaną do tego celu telomerazę. Jednakże większość komórek somatycznych u ssaków nie wytwarza telomerazy, co w konsekwencji prowadzi do stopniowej utraty sekwencji nukleotydowych z końców chromosomów. Zjawisko skracania telomerów tłumaczy ograniczoną zdolność do proliferacji komórek, czyli istnienie limitu Hayflicka. Wiadomo też, że limit ten nie dotyczy komórek o wysokiej aktywności telomerazy, a w badaniach przeprowadzonych na myszach wykazano, że stymulacja telomerazy znacząco wydłuża ich życie [27]. Z tego powodu teoria telomerowa stała się jedną z bardziej prawdopodobnych hipotez tłumaczących proces starzenia [28].

KINAZA BIAŁKOWA AKTYWOWANA PRZEZ AMP (AMPK)

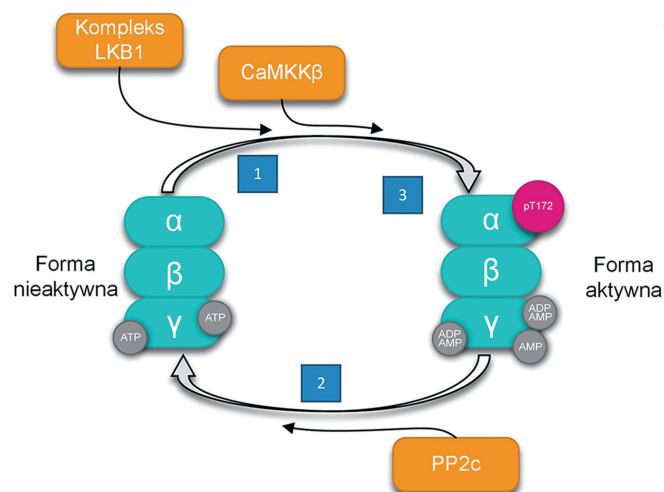
Kinaza białkowa aktywowana przez AMP (AMPK, ang. *AMP-activated protein kinase*,) to enzym o strukturze pierwszorzędowej zachowanej w ewolucji, biorący udział w procesach odpowiedzialnych za utrzymanie homeostazy energetycznej na poziomie komórki, jak i całego organizmu u eukariotów. Wykazano również, że u zwierząt AMPK bierze udział w regulowaniu równowagi energetycznej w całym organizmie poprzez reagowanie na sygnały hormonalne i substraty energetyczne w centralnym układzie nerwowym oraz tkankach obwodowych, modulując pobieranie pokarmu oraz zużycie energii [29].

AMPK jest to kinaza serynowo-treoninowa występująca w komórkach w postaci heterotrimeru zbudowanego z podjednostki α -katalitycznej oraz dwóch podjednostek regulatorowych – β i γ , w stosunku 1:1:1. Ze względu na istnienie wielu izoform każdej z tych podjednostek ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$, $\beta 2$, $\gamma 1$, $\gamma 2$, $\gamma 3$), kodowanych w odrębnych genach oraz dodatkowo dzięki alternatywnemu splicingowi ($\gamma 2$ i $\gamma 3$), podjednostki te mogą tworzyć ze sobą co najmniej 12 klas heterotrimerycznych kompleksów. Synteza konkretnych kompleksów w organizmie uzależniona jest od lokalizacji w określonych kompartmentach komórki oraz od tkanek, w których występują (specyficzność tkankowa) [30,31].

W regulacji aktywności AMPK kluczową funkcję przypisuje się fosforylacji i defosforylacji reszty treoniny w pozycji 172 w katalitycznej podjednostce α [32]. Kontrolowanie tej aktywności zachodzi również poprzez związanie allosterycznych aktywatorów w postaci AMP i ADP, które wiążą się z centrum katalitycznym enzymu, zwiększając zdolność fosforylacji treoniny w pozycji 172 przez kinazy wyższego rzędu (kompleks LKB1, CaMKK β), a także utrudniając jej defosforylację fosfatazom (PP2C). System ten jest czujnikiem zmian stosunku nukleotydów adeninowych względem siebie w komórce (Ryc. 1) [33].

AMPK ma wiele specyficznych substratów i odpowiada na zmiany stężenia substratów energetycznych oraz sygnały wysyłane przez hormony. W sytuacji spadku stężenia ATP w komórce, a co za tym idzie wzrostu stężeń AMP i ADP (np. w czasie głodu, przy wysiłku fizycznym czy podczas hipoksji) [29], AMPK ulega aktywacji i wyłącza szlaki anaboliczne (zużywające ATP), równocześnie uruchamiając szlaki kataboliczne (dostarczające ATP) [34]. AMPK stymuluje m.in. wychwyt glukozy w mięśniach, utlenianie kwasów tłuszczowych, glikolizę w mięśniu sercowym czy powstawanie nowych mitochondriów w mięśniach. Aktywacja AMPK prowadzi do zahamowania szlaków wiążących się ze zużywaniem energii, takich jak: synteza kwasów tłuszczowych, czy cholesterolu w wątrobie, jak i sekrecja insuliny z komórek β trzustki (Ryc. 2) [29].

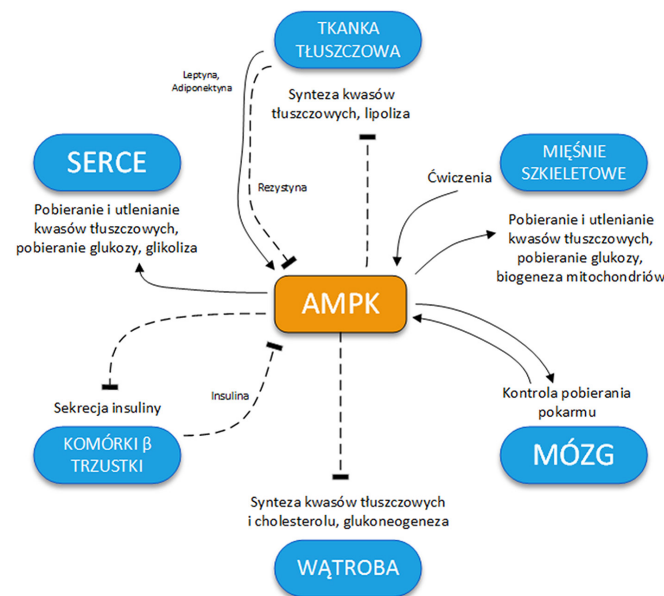
AMPK uczestniczy w regulacji homeostazy energetycznej nie tylko na poziomie komórkowym, lecz także na poziomie całego organizmu. Bierze udział w licznych procesach, które mają związek ze starzeniem, długowiecznością oraz pojawieniem się chorób, których częstość występowania wzrasta wraz z wiekiem. Jej wysoką aktywność daje się



Rycina 1. Trzy mechanizmy regulacji AMPK przez zmiany stężeń nukleotydów adeninowych w komórce. 1) Fosforylacja α -Thr172 pod wpływem wzrostu stężeń AMP i ADP i spadku stężenia ATP. 2) Stymulowanie defosforylacji α -Thr172 przez ATP, hamowanie jej przez AMP i ADP, a tym samym dezaktywowanie AMPK przez fosfatazy. 3) Bezpośrednia allosteryczna aktywacja AMPK za pośrednictwem AMP. ATP ma działanie antagonistyczne względem AMP. Na podstawie [33], zmienione.

zauważyć m.in. przy zastosowaniu restrykcji kalorycznej oraz innych związanych ze starzeniem procesach fizjologicznych w komórce oraz całym organizmie. Uważa się też, że stanowi ona atrakcyjny cel terapeutyczny w leczeniu wielu chorób metabolicznych, włącznie z otyłością, cukrzycą typu II, a także chorobami układu krążenia [33].

W sytuacjach stresu metabolicznego AMPK stymuluje produkcję energii z glukozy i kwasów tłuszczowych, a hamuje pobieranie energii wykorzystywanej do syntezy cholesterolu, glikogenu oraz białek [35]. Łatwo też zauważyć, że restrykcja kaloryczna może istotnie zwiększać aktywność



Rycina 2. Rola AMPK w kontroli metabolizmu energetycznego całego organizmu. Na podstawie [29], zmienione.

AMPK, podczas gdy nadmierna podaż kalorii może znacznie ją upośledzać, jednocześnie indukując insulinoporność w wielu tkankach, co może prowadzić do wystąpienia chorób metabolicznych takich jak otyłość, cukrzyca typu II czy choroby sercowo-naczyniowe [34].

ROLA AMPK W PROCESACH STARZENIA

Utrata fizjologicznej integralności, prowadząca do upośledzenia funkcji życiowych i zwiększonej podatności na zgon, określana jako starzenie, jest zasadniczym czynnikiem prowadzącym do takich schorzeń jak rak, cukrzyca typu II, choroby sercowo-naczyniowe i choroby neurodegeneracyjne. Badania dotyczące starzenia wykazały bezprecedensowy postęp w przeciągu kilku lat, w szczególności odkrycie, że szybkość starzenia w znacznym stopniu jest kontrolowana przez zachowane ewolucyjnie procesy genetyczne i biochemiczne. Obecnie głównym wyzwaniem jest przeanalizowanie i powiązanie ze sobą tych procesów w przebiegu starzenia [28].

AMPK bierze udział w licznych procesach, które mają związek ze starzeniem, długowiecznością oraz pojawieniem się chorób, których częstość występowania wzrasta wraz z wiekiem. Jej udział daje się zauważyć w reakcjach, na które wpływa m.in. na zastosowanie restrykcji kalorycznej oraz inne związane ze starzeniem procesy fizjologiczne w komórce oraz całym organizmie. Wydajna kontrola homeostazy metabolicznej, zwiększona odporność na stres oraz sprawne działanie na poziomie komórkowym są oznakami dobrego zdrowia i długowieczności. AMPK jest zaangażowana w regulację wszystkich tych cech poprzez zintegrowaną sieć przekazywania sygnałów w komórce. Wiele badań przeprowadzonych na organizmach niższych wykazało, że wzrost aktywności AMPK może wpływać na wydłużenie życia [37].

RESTRYKCJA KALORYCZNA A DŁUGOŚĆ ŻYCIA

Restrykcja kaloryczna (CR) definiowana jest jako obniżenie kaloryczności pokarmu przy jednoczesnym zapewnieniu wszystkich niezbędnych składników do rozwoju i funkcjonowania organizmu. Dowiedziono, że jej zastosowanie u zwierząt modelowych takich *C. elegans*, muszki owocowej, gryzoni czy małp, opóźnia procesy starzenia oraz zwiększa ich średnią i maksymalną długość życia [38]. U ssaków CR znacznie poprawia parametry fizjologiczne związane ze starzeniem, a także opóźnia pojawienie się chorób związanych z wiekiem, od chorób neurodegeneracyjnych po nowotwory [39,40]. Należy jednak pamiętać o tym, że restrykcja nie może być zbyt duża, gdyż może wówczas prowadzić do patologicznych zmian wywołanych niedożywieniem, a w konsekwencji do zwiększonej śmiertelności. Mimo że ciągle otrzymujemy coraz więcej dowodów na skuteczność zastosowania restrykcji kalorycznej u zwierząt, o tyle ciągle brakuje dostatecznych informacji, przemawiających za jej podobnym działaniem u ludzi. U reżusów może przedłużyć życie nawet o 30%, ale na tej podstawie mimo wszystko ciężko powiedzieć czy byłaby równie skuteczna u ludzi [41]. Badanie wpływu CR u ludzi jest bardzo trudne ze względu na problemy ze znalezieniem chętnych do poddania się wymagającej takich wyrzeczeń diecie.

Mimo licznych badań przeprowadzonych na wielu organizmach, do tej pory nie jest do końca wiadome na jakie procesy,

zachodzące w organizmie, oddziałuje zastosowanie niskokalorycznej diety. U *C. elegans* zmiany w dostępności glukozy wpływają na zmiany w długości życia tego organizmu. I tak, wzrost dostępności tego substratu zmniejsza żywotność *C. elegans*, natomiast znaczne ograniczenie podaży glukozy powoduje wydłużenie jego życia poprzez indukcję oddychania tlenowego w mitochondriach. Okazało się też, że mutacja w genie *aaak-2*, homologu AMPK u nicienia, znosi efekt wydłużania życia przy zastosowaniu CR poprzez zaburzenie przebiegu glikolizy w komórce. Świadczy to o niezaprzeczalnej istotnej roli AMPK w zastosowaniu CR u tego organizmu modelowego [42]. Również metformina, aktywator AMPK, przedłuża życie *C. elegans*, imitując efekt restrykcji kalorycznej [43].

Aktywacja AMPK jest jednym z mechanizmów wykazujących pozytywne efekty na zdrowie i długie życie, który aktywowany jest poprzez ograniczone spożycie kalorii [44]. W przypadku ograniczenia spożycia kalorii aktywacja wątrobowej AMPK u ssaków spowalnia glukoneogenezę, z kolei w mięśniach stymuluje wychwyt glukozy poprzez wzrost syntezy transporterów glukozy, np. GLUT4 [45]. Ponadto podawanie metforminy wydłużało życie myszy, co związane jest ze wzrostem aktywacji AMPK. Wskazuje to na to, że modulowanie aktywności AMPK może być potencjalnie wykorzystane jako cel dla wywołania efektów podobnych do tych związanych z restrykcją kaloryczną [46]. AMPK może poprawiać jakość i długość życia poprzez przywracanie równowagi energetycznej, prowadząc między innymi do zwiększania utleniania kwasów tłuszczowych czy proteolizy [47,48].

Obecnie bazą do wysnuwania hipotez o pozytywnej odpowiedzi organizmu ludzkiego na CR są dane ukazane w pracy Willcoxa i wsp. z 2006 roku [49], w której opisał on jak CR wpływa na zdrowie i długość życia Japończyków z wyspy Okinawa. Mieszkańcy tej wyspy wyróżniają się na tle innych Japończyków znacznie wyższą średnią długością życia, a także dużo wyższym odsetkiem stulatków. Ponadto pojawienie się u nich chorób związanych z wiekiem, takich jak choroby sercowo-naczyniowe czy nowotworowe, zachodzi o wiele rzadziej i w późniejszym wieku. Częstość zgonów z powodu chorób naczyniowo-mózgowych oraz chorób serca wynosiła 59%, a nowotworów 69% w stosunku do liczby takich zgonów odnotowanych w pozostałej części Japonii. Za przyczynę tego zjawiska uważa się stosowanie przez mieszkańców Okinawy tradycyjnej niskokalorycznej diety. W porównaniu do dzieci w wieku szkolnym w całej Japonii, dieta dzieci z Okinawy stanowiła zaledwie 62% rekomendowanego dziennego spożycia kalorii. U dorosłych z kolei, pomimo podobnych zawartości tłuszczu i białka w diecie, podaż kalorii była o 20% mniejsza niż średnia dla Japończyków. Dzięki przykładowi mieszkańców Okinawy możemy przypuszczać, że restrykcja kaloryczna może mieć istotny wpływ na wydłużenie życia u ludzi, jednakże nie jest to wystarczający dowód dla potwierdzenia tej hipotezy, gdyż należy tu pamiętać o możliwym wpływie czynników genetycznych i środowiskowych na długość życia [50,51].

UDZIAŁ AMPK W REGULACJI AKTYWNOŚCI SIRTUIN

W ciągu ostatnich lat, w badaniach dotyczących wpływu restrykcji kalorycznej na długość życia organizmów modelowych oraz niemodelowych zwierząt, uwaga skupiona

jest na istotnej roli sirtuin w tym procesie. Białka Sir, inaczej sirtuiny czy Sir2, należą do NAD-zależnych deacetylaz. To zachowane w ewolucji enzymy, których obecność wykazano u wszystkich przebadanych eukariontów, od drożdży po ssaki oraz u wielu organizmów prokariotycznych [52].

Wielu badaczy wskazuje na funkcje sirtuin jako czynników mających wpływ na tempo procesu starzenia, a co za tym idzie na długość życia. Wykazano, że mają one swój udział w kontroli starzenia, odgrywając rolę w procesach uruchamianych w niekorzystnych warunkach, umożliwiających przeżycie organizmów [53]. Wykazano, że nadekspresja genów kodujących sirtuiny powodowała wydłużenie życia u wielu organizmów, drożdży, muszek owocowych, nicieni, gryzoni czy ssaków naczelnych, z kolei delecja tych genów prowadziła do skrócenia długości życia, ale także powodowała utratę podatności na restrykcję kaloryczną. Oprócz tego zaobserwowano, że w sytuacjach niedostatecznej podaży kalorii aktywność sirtuin wzrasta [54]. Zależność ta posłużyła do poszukiwania możliwości wykorzystania składników chemicznych, a konkretnie niektórych polifenoli (np. resweratrolu) do aktywowania sirtuin przez ich działania zbliżone do tego wywołanego restrykcją kaloryczną. Może to w przyszłości pozwolić na wykorzystanie aktywatorów sirtuin w leczeniu chorób związanych z wiekiem. Sirtuiny aktywowane są w warunkach niedoborów energetycznych, np. podczas głodzenia lub wysiłku fizycznego, gdzie dochodzi do wzrostu stężenia NAD, który jest kofaktorem sirtuin oraz aktywacji ich licznych substratów. Zarówno głodzenie, jak i wysiłek fizyczny są również aktywatorami AMPK. U ssaków dotychczas zidentyfikowano siedem sirtuin, homologów drożdżowej Sir2, z czego najlepiej poznana i najczęściej badana jest SIRT1 [55].

SIRT1

U ssaków SIRT1 i inne sirtuiny w odpowiedzi na CR pośredniczą w biogenezie mitochondriów, funkcjach metabolicznych, regulacji masy ciała czy tolerancji glukozy. Z kolei u myszy zbadano, że nadprodukcja SIRT1 w mózgu wpływa pozytywnie na ich długość życia [56-58]. Natomiast myszy pozbawione genu *sirt1* nie były podatne na CR oraz działanie agonisty sirtuiny [59]. Mimo że te dane wskazują na wiodącą rolę sirtuin w restrykcji kalorycznej to, biorąc pod uwagę inne doniesienia, okazuje się, że zaangażowanie sirtuin w wydłużanie życia poprzez CR jest dyskusyjne. U organizmów niższych udział SIRT1 zależy od warunków laboratoryjnych przeprowadzanego eksperymentu. Zauważono, że u *C. elegans* ortolog SIRT1, Sir-2.1 jest wymagany do wydłużenia życia poprzez niewielką mutację w genie *eat2*, ale nie podczas innych eksperymentów przeprowadzanych na tym genie [57,60,61].

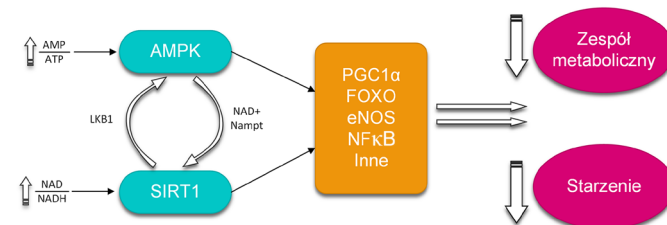
Wykazano, że SIRT1 odpowiada na zmiany zachodzące na poziomie metabolizmu komórkowego, bierze udział w odpowiedzi na warunki stresowe (restrykcję kaloryczną, wysiłek fizyczny) i w ten sposób wpływa bezpośrednio na transkrypcję, apoptozę, autofagię i procesy starzenia [62,63]. Jeśli chodzi o odpowiedź na uszkodzenia DNA, SIRT1 deacetyluje czynnik transkrypcyjny FoxO3, co wpływa na zatrzymanie cyklu komórkowego oraz zahamowanie apoptozy zależnej od FoxO, by umożliwić naprawę DNA. Zapobieganie apoptozie ma znaczenie w terapii chorób neurodegeneracyjnych oraz sercowo-naczyniowych. Pozbawienie komórek *sirt1* upośledza ich

odpowiedź na uszkodzenia powstałe w DNA i zaburza działanie systemu naprawy DNA. W zależności tej, wiążącej się ze wzrostem liczby komórek ulegających apoptozie, upatruje się potencjalnej możliwości walki z nowotworami. SIRT1 może regulować ekspresję bezpośrednio, deacetylując histony, ale także pośrednio, biorąc udział w oddziaływaniach z innymi enzymami, regulując kluczowe procesy komórkowe [64].

AMPK oraz sirtuiny wykryte zostały u wszystkich organizmów eukariotycznych, co więcej istnieją przesłanki mówiące o tym, że enzymy te współwystępowały ze sobą w procesie ewolucji [65,66]. Pomimo że oba enzymy były intensywnie badane, podobieństwa w ich regulacji i działaniu w tak zróżnicowanych procesach, jak metabolizm komórkowy, procesy zapalne i funkcje mitochondrialne okazały się oczywiste dopiero ostatnio. AMPK i SIRT1 regulują się nawzajem i mają wiele wspólnych docelowych cząsteczek, a zaburzenia ich działania mogą predestynować do zespołu metabolicznego i powiązanych z nim chorób u ludzi i organizmów modelowych. Rozpatrywane są jako cel terapeutyczny dla leczenia tych schorzeń (Ryc. 3) [67].

W badaniach przeprowadzonych m.in. na komórkach HepG2 wykazano, że przy wysokim stężeniu glukozy w pożywce dochodzi do zmniejszenia aktywności AMPK, podczas gdy przy inkubacji komórek z pirogionianem efekt jest przeciwny. Zaobserwowane zmiany w aktywności AMPK nie były związane ze zmianami energetycznymi, czyli stosunkiem stężeń AMP/ADP:ATP, ale towarzyszyły zmianom w dostępności i aktywności SIRT1. Zgodnie z tym okazało się, że poziom fosforylacji AMPK jest zmniejszany podczas inkubacji z nikotynoamidem, inhibitorem SIRT1, podczas gdy resweratrol (przypuszczalny aktywator SIRT1) przyczyniał się do zwiększenia stopnia ufosforylowania enzymu bez zmiany równowagi energetycznej komórki. Wpływ resweratrolu na aktywność AMPK został także zaobserwowany podczas badań na mioblastach C2C12 oraz inkubowanych szczurzych tkankach mięśniowych, co świadczy, że efekty te nie są tkankowo lub komórkowo specyficzne [68].

Z kolei wyniki badań Fulco i współpracowników [69] pokazały, że obniżenie stężenia glukozy w pożywce (5 vs. 25mM) hamowało różnicowanie linii mioblastów C2C12, do czego prowadził spadek ATP w komórce oraz aktywacja AMPK, co z kolei powodowało aktywację SIRT1. Zaprezentowano także, że aktywacja SIRT1 została osiągnięta przez syntetyczny



Rycina 3. Hipotetyczny cykl wzajemnej regulacji SIRT1 i AMPK. Wzrost aktywności AMPK spowodowany deficytem energetycznym lub innymi czynnikami prowadzi do aktywacji SIRT, prawdopodobnie przez wzrost stężenia NAD⁺ i/lub aktywności Nampt. Z kolei SIRT1 deacetyluje LKB1, która z kolei aktywuje AMPK. Wspólna aktywacja AMPK i SIRT1 prowadzi do deacetylacji i fosforylacji wymienionych na rysunku docelowych białek. Może to prowadzić do zmniejszenia podatności na wystąpienie zespołu metabolicznego i opóźnienia procesów starzenia. Na podstawie [67], zmienione.

aktywator AMPK, AICAR. Zarówno restrykcja glukozy, jak i zwiększona transkrypcja enzymu NAD, Nampt (fosforyborylotransferaza nikotynamidu), indukowana przez AICAR, wywołały spadek stężenia nikotynoamidu i wzrost stosunku stężeń NAD:NADH oraz aktywację SIRT1. W tym przypadku regulacji AMPK poprzez glukozę zaobserwowane zostały zmiany stanu energetycznego w komórce [69].

Zaprezentowane wyniki potwierdzają silny związek pomiędzy SIRT1 a AMPK w komórkach ssaków, wykazany poprzez równoczesną regulację obu związków w odpowiedzi na różne stężenie glukozy oraz aktywatorów i inhibitorów. Dzięki temu, że AMPK i SIRT1 regulują się nawzajem przypuszcza się, że mogą być one składowymi zamkniętego cyklu regulacji [68].

SIRT3

SIRT3, tak jak SIRT4 i SIRT5, obecna jest w macierzy mitochondrialnej. Odpowiada za deacetylację wielu białek, występujących w mitochondriach, regulując ich funkcjonowanie oraz hamując wystąpienie różnorodnych patologii związanych ze starzeniem. Ostatnie doniesienia skupiają się wokół możliwości regulowania niektórych funkcji mitochondrialnych przez SIRT3 pośrednio, a nie poprzez bezpośrednią deacetylację specyficznych mitochondrialnych substratów [70]. W badaniach na myszach wykazano, że niedostatek SIRT3 w normalnych warunkach nie jest odczuwalny, natomiast w warunkach stresowych, np. związanych z niedożywieniem lub w zaawansowanym wieku rola sirtuin w hamowaniu wystąpienia licznych patologii jest bardzo istotna [71].

Dokładne zrozumienie mechanizmów regulujących funkcjonowanie SIRT3 stało się kluczowym punktem badań nad tym białkiem. W zależności tej zaczęto upatrywać związku we wspólnej regulacji między SIRT3 a AMPK. Wiele badań przeprowadzonych w niezależnych laboratoriach wykazało wpływ SIRT3 na aktywność i fosforylację AMPK. Warto zaznaczyć, że antyoksygen LKB1 jest jedną z głównych kinaz katalizujących reakcję fosforylacji reszty treoniny w pozycji 172 w katalitycznej podjednostce α AMPK, ale swój udział w tym procesie mają także reaktywne formy tlenu (ROS) [72]. Dodatkowo AMPK ma wpływ na regulację funkcji mitochondrialnych. Wzmaga aktywację PGC1 α , koaktywatora transkrypcji, który promuje biogenezę mitochondriów i ekspresję wielu genów mitochondrialnych kodowanych jądrowo [73]. Z tego względu zarówno niski poziom ATP, jak i wzrost stężenia ROS w komórkach z deficytem SIRT3 pozwoliły wysnuć przypuszczenia, że niedostatek SIRT3 związany jest ze wzrostem aktywności AMPK. Jednakże okazuje się, że efekt ten jest odwrotny. Komórki oraz tkanki ze stwierdzonym deficytem SIRT3 wykazują także zmniejszenie fosforylacji AMPK oraz niski poziom PGC1 α . Deficyt SIRT3 upośledza osiągnięcie pełnej aktywności PGC1 α koniecznej do tworzenia mitochondriów i ekspresji genów zaangażowanych w proces detoksykacji ROS [74].

Nie jest do końca jasne jak SIRT3 wpływa na AMPK. Niektóre badania sugerują, że SIRT3 może deacetylować i aktywować LKB1, kinazę katalizującą reakcję fosforylacji AMPK [75]. Inne, że sirtuina ta może deacetylować czyn-

nik transkrypcyjny FoxO3A, który bezpośrednio promuje syntezę PGC1 α [76]. To, że SIRT3 wpływa na kluczowe regulatory związane z biogenezą i funkcjonowaniem mitochondriów, takich jak AMPK czy PGC1 α może mieć istotne konsekwencje dla wielu badań nad tą sirtuiną. Wydaje się, że SIRT3 wpływa nie tylko bezpośrednio na specyficzne mitochondrialne substraty, ale także pośrednio na modulowanie aktywności regulatorów mitochondriów. I tak, brak SIRT3 może negatywnie wpłynąć na procesy mające związek z aktywnością AMPK, takie jak autofagia czy odpowiedź na restrykcję kaloryczną, a co za tym idzie może mieć ujemny skutek na funkcjonowanie całego organizmu, m.in. na przedwczesne starzenie [77,78]. Jednakże kwestia ta wymaga przeprowadzenia wielu badań dotyczących mechanizmu i regulacji pomiędzy tymi związkami.

ROLA AMPK W REGULACJI BIAŁKA mTOR

Podczas poszukiwania sposobów na osiągnięcie efektów zbliżonych do tych wywołanych restrykcją kaloryczną, lecz w mniej radykalny i drastyczny sposób, dokonano odkrycia niezwyklej właściwości rapamycyny. Jest to immunosupresant, stosowany w transplantologii, a jego pochodne wykorzystywane są w terapii przeciwnowotworowej. Dzięki badaniom właściwości tej substancji zidentyfikowano geny białek TOR w wielu organizmach, także u ssaków.

Białko mTOR (ang. *mammalian target of rapamycin kinase*) jest kinazą serynowo-treoninową, o sekwencji zachowanej w ewolucji, biorącą udział w wielu procesach od wzrostu, poprzez autofagię, po starzenie komórkowe. Wzrost jej aktywności obserwowany jest w procesach charakterystycznych dla starzenia, z kolei jej spadek prowadzi do aktywacji procesu autofagii [28,79]. Białko mTOR występujące u ssaków jest składnikiem dwóch odrębnych kompleksów enzymatycznych, mTORC1 i mTORC2, różniących się między sobą zarówno budową, jak i pełnioną funkcją w komórce. Jeśli chodzi o budowę to oba kompleksy mają wiele wspólnych podjednostek, jednak różnią się kluczowymi podjednostkami, które determinują specyficzne aktywności tych kompleksów. W TORC1 obecne jest białko Raptor, z kolei w skład TORC2 wchodzi białka Rictor i Sin1. Oba te kompleksy działają poprzez fosforylację i aktywację odrębnych efektorów, w szczególności poprzez fosforylację i aktywację składników z grupy kinaz AGC [80]. TORC1 odpowiada za kontrolę wielu procesów związanych ze wzrostem komórki i zmianami w dostępności pożywienia i energii. Z kolei kompleks TORC2 (do tej pory poznany dużo słabiej) bierze udział w regulacji funkcjonowania cytoszkieletu [81].

Znacznie więcej wiadomo na temat mechanizmu działania kompleksu mTORC1. Jest on aktywowany przez insulinę i inne czynniki wzrostowe (m.in. insulinopodobny czynnik wzrostu 1, IGF-1) oraz poprzez składniki pokarmowe np. aminokwasy czy glukozę, a hamowany przez AMPK. Uważa się, że w odpowiedzi na te sygnały mTORC1 kontroluje syntezę białek poprzez przynajmniej dwa substraty, kinazę katalizującą reakcję fosforylacji białka rybosomów S6 (S6Ks) i czynnik inicjujący translację, 4E-binding protein (4E-BP1). Kompleks ten stymuluje także biosyntezę lipidów, hamuje degradację na drodze autofagii i reguluje metabolizm glukozy. Mnogość procesów sterowanych przy

współdziałanie mTORC1 pokazuje, że jest on kluczowym regulatorem modulującym procesy anaboliczne i kataboliczne w odpowiedzi na dostępność składników pokarmowych, sygnały wzrostowe i status energetyczny komórki [82].

mTOR jest elementem kontrolującym procesy autofagii, biosyntezy lipidów czy rybosomów. Wysoka aktywacja tego kompleksu prowadzi do hamowania autofagii w sytuacji dostępności wystarczającej ilości pożywienia. Dowiedziono, że fosforylacja ULK1 i ATG13, czyli podjednostek wchodzących w skład kompleksu inicjującego autofagię, może reprezentować mechanizm leżący u podstaw hamowania procesu autofagii przez mTORC1 [83].

Pierwsze wskazówki pokazujące, że mTOR może regulować procesy starzenia pochodzą z badań przeprowadzonych na *S. cerevisiae*, gdzie wykazano, że delecja genu kodującego drożdżowy ortolog S6K, SCH9, powodowała wydłużenie życia tych organizmów o 50% [84]. Kolejne badania dotyczące mutacji w genach związanych z funkcjonowaniem samego mTOR lub kompleksu mTORC1 na organizmach modelowych, takich jak *C. elegans* i *D. melanogaster* wykazały, że mutacje te wpływają na wydłużenie życia u tych zwierząt [85,86]. Dodatkowo w badaniach dotyczących działania rapamycyny wykazano, że jej zastosowanie wydłuża życie u drożdży, nicieni, muszek owocowych oraz myszy, potwierdzając tym samym, że mTOR jest ewolucyjnie zachowanym, kluczowym regulatorem długości życia [87].

Wiadomo, że wraz z wiekiem aktywność mTOR wzrasta, a w wielu chorobach związanych z wiekiem, takich jak choroba Alzheimera, Parkinsona, choroby układu krążenia, cukrzyca typu II czy w nowotworach, zaobserwowano wzmożoną aktywność szlaku zależnego od mTOR. Wykazano, że stosowanie diety niskokalorycznej wpływa na obniżenie aktywności tej kinazy. Wynika z tego, że poprzez hamowanie aktywności mTOR możliwe jest naśladowanie działania restrykcji kalorycznej, co może korzystnie wpływać na wydłużenie życia. Zależność ta została zaobserwowana u zwierząt modelowych, m.in. nicieni, muszki owocowej czy myszy [82].

AMPK, aktywowana w odpowiedzi na niskie stężenie ATP w komórce, negatywnie reguluje kompleks mTORC1. Do hamowania aktywności mTORC1 przez AMPK może dochodzić przez co najmniej dwa odrębne mechanizmy. W pierwszym z nich AMPK fosforyluje zachowane w ewolucji reszty seryny w białku TSC2, co skutkuje aktywacją tego białka, przez co dochodzi do zahamowania szlaku sygnalizacyjnego mTOR [88]. Z kolei w drugim przypadku AMPK bezpośrednio fosforyluje białko Raptor, które wchodzi w skład kompleksu mTORC1, co upośledza przekazywanie sygnałów w tym kompleksie [89]. Te dane sugerują, że restrykcja kaloryczna może redukować przekazywanie sygnałów w kompleksie mTORC1 częściowo poprzez aktywację AMPK. Jednak sytuacja ta zdaje się być bardziej skomplikowana, gdyż zarówno AMPK jak i mTOR oddziałują z wieloma dodatkowymi czynnikami. Odnotowano także, że aktywacja AMPK wydłuża życie u *C. elegans* za pośrednictwem białka CRTC-1 (ang. *CREB-regulated transcriptional co-activator 1*), a nie przez białko TSC2. Dzieje się tak prawdopodobnie dlatego, że u *C. elegans* nie ma ortologa tego białka i kompleks mTORC1 może być regulowany jedynie na dro-

dze fosforylacji białka Raptor [90]. Warto podkreślić, że o ile istnieje kilka szlaków prowadzących do aktywacji mTOR, o tyle szlak AMPK jest jedynym, który hamuje mTORC1 [89].

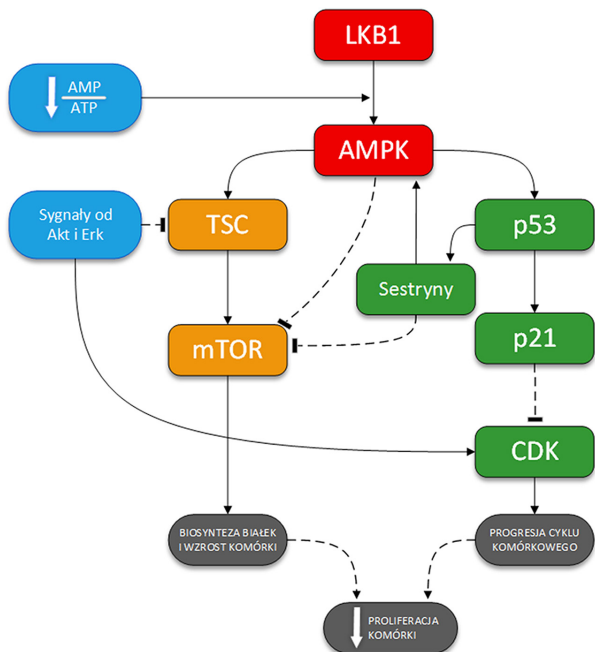
REGULACJA BIAŁKA P53 PRZY UDZIALE AMPK

Czynnik transkrypcyjny p53 został zidentyfikowany w 1979 roku i uważany jest za jeden z najważniejszych supresorów nowotworowych, odpowiadających za zatrzymanie proliferacji i indukcję apoptozy w uszkodzonych komórkach. W warunkach normalnych, gdy komórka nie jest narażona na stres, poziom białka p53 utrzymywany jest na niskim poziomie. W odpowiedzi na wiele sygnałów stresowych p53 wybiórczo reguluje wiele genów i inicjuje zróżnicowane odpowiedzi na stres, włączając w to przejściowe hamowanie cyklu komórkowego, autofagię, apoptozę oraz starzenie, w zależności od poziomu uszkodzeń wywołanych czynnikiem stresowym [91,92].

Występowanie białka p53 w krótko żyjących organizmach niższych, których nie dotyczy nowotworzenie, takich jak muszki owocowe czy nicienie, sugeruje, że supresja nowotworów nie jest pierwotną funkcją tego białka. Wykazano, że odgrywa ono istotną rolę w regulacji procesów starzenia i długowieczności u nicieni, muszek owocowych, myszy i ludzi. Wpływ p53 na starzenie u ludzi został w ostatnim czasie potwierdzony w wielu badaniach [93].

Komórki ssaków są bardzo wrażliwe na wszelkie formy czynników stresowych, włączając w to zmiany środowiskowe, jak i te zachodzące wewnątrz komórki. Konsekwencją tego jest wywołanie w nich odwracalnego zahamowania cyklu komórkowego, starzenia lub apoptozy. Mimo że wiele szlaków odpowiedzi na stres zostało już zbadanych, to te, które związane są z odpowiedzią regulatorów podziałów na stres metaboliczny, są wciąż słabo poznane [94]. Wiadomo, że wiele czynników stresowych może uruchomić proces fosforylacji w domenie transaktywacyjnej w p53. Dostępność glukozy bezpośrednio reguluje proliferację komórki, a odpowiedź ta jest związana z aktywowaniem AMPK za pośrednictwem białka ATM. W 2005 Jones i wsp. zbadali jak AMPK w odpowiedzi na różną dostępność glukozy wpływa na ścieżkę związaną z białkiem p53, które jest regulatorem proliferacji komórki i jej przetrwania. Głównym celem AMPK w tej ścieżce regulacji jest białko p53, które jest aktywowane przez AMPK, poprzez fosforylację seryny 15 w domenie transaktywacyjnej p53, co wpływa na aktywację białka p21, które hamuje kinazy CDK, co w efekcie przyczynia się do zaindukowania odwracalnego zahamowania podziałów komórkowych w odpowiedzi na niedobory glukozy w komórce. Ta aktywność p53 jest istotna dla przetrwania normalnych komórek podczas krótkotrwałego braku glukozy (Ryc. 4) [95].

Wyniki najnowszych badań pokazują, że p53 może także zapobiegać wzrostowi komórek poprzez oddziaływanie ze ścieżką mTOR. p53 hamuje przekazywanie sygnału przez mTOR na różne sposoby. Reguluje aktywność sestrzyn, które hamują aktywność mTOR bezpośrednio, a także stymulują syntezę AMPK, co z kolei prowadzi do inaktywacji mTOR [93]. AMPK może regulować translację przez hamowanie rybosomalnej kinazy S6 (S6K), fosforylować TSC2 w odpowiedzi na głodzenie, co prowadzi do stabilizacji kompleksu

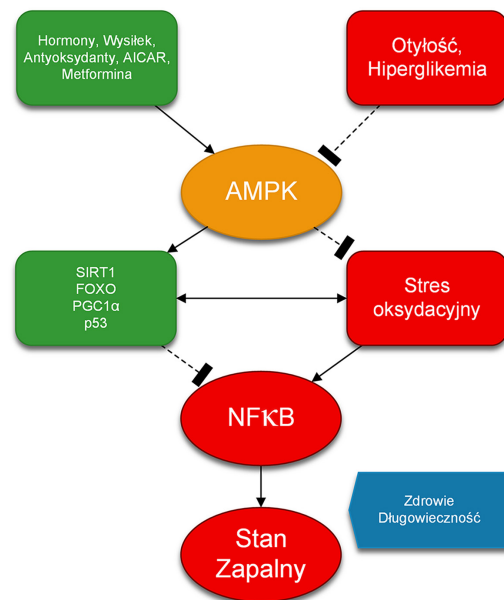


Rycina 4. Mechanizmy prowadzące do zahamowania cyklu komórkowego poprzez aktywację AMPK. Wzrost aktywacji kinaz Akt i ERK przyspiesza proliferację komórki, aktywując zarówno kinazy zależne od cyklin (CDK) do progresji cyklu komórkowego, jak i ścieżki mTOR do promowania biosyntezy białek, wzrostu i proliferacji komórek. Aktywacja AMPK hamuje sygnał stymulujący wzrost przez aktywację osi p53-p21, jak i sygnalizację mTOR, prowadząc do zahamowania proliferacji komórki. Na podstawie [126], zmienione.

TSC1-TSC2 i hamowania mTOR i S6K. W aktywacji AMPK upatruje się związku ze zmniejszeniem poziomu translacji, co może powodować wydłużanie fazy G1 cyklu komórkowego, a w konsekwencji prowadzić do spowolnienia proliferacji komórek [95,96]. Biorąc pod uwagę istnienie limitu Hayflicka dla komórek, czyli określonej liczby podziałów, po przekroczeniu której komórka ulega śmierci, takie spowolnienie może w efekcie prowadzić do opóźnienia podziałów komórkowych, a w konsekwencji do wydłużenia życia.

ROLA AMPK W CHRONICZNYM STANIE ZAPALNYM

Stan zapalny jest elementem odpowiedzi komórek układu odpornościowego, która jest indukowana w odpowiedzi na czynniki, takie jak atak patogenów czy uszkodzenia tkanek. Jednakże, mimo swoich pozytywnych funkcji, przewlekły stan zapalny może być bardzo szkodliwy dla organizmu. Może on przyczyniać się do wystąpienia wielu chorób takich jak otyłość, cukrzyca typu II, miażdżyca, pojawienia się nowotworów, a także prowadzić do przyspieszenia procesu starzenia. Główną tego przyczyną jest obecność podwyższonego poziomu cytokin prozapalnych w surowicy krwi, takich jak interleukiny 1 i 6 (IL-1, IL-6) czy TNF- α , co spowodowane jest z kolei aktywacją makrofagów i limfocytów T, które wydzielają te cytokiny w odpowiedzi na działanie stresu [97]. Z kolei indukcja aktywności AMPK pośredniczy w syntezie cytokin przeciwzapalnych, a co za tym idzie w kompensowaniu wzrastającego poziomu cytokin prozapalnych i hamowaniu ich syntezy [98,99]. Taka sytuacja obserwowana jest u osób w podeszłym wieku, gdzie obserwuje się zarówno podwyższenie poziomu cytokin prozapalnych, ale i wzrost cytokin przeciwzapalnych – IL-10 i TGF- β . Świadczy to o tym, że starzenie i długowiecz-



Rycina 5. Efekty aktywacji AMPK na hamowanie ścieżki sygnałowej NF- κ B i supresję stanu zapalnego. Kolorem zielonym zaznaczone są ścieżki aktywowane przez AMPK, na czerwono zaś hamowane. Niektóre hormony, polifenole, leki i aktywność fizyczna prowadzą do aktywowania AMPK, z kolei otyłość i hiperglikemia hamują aktywność AMPK. AMPK natomiast stymuluje aktywację SIRT1, PGC-1 α , p53 i FoxO, które mogą w efekcie hamować ścieżkę NF- κ B poprzez różne mechanizmy. Ponadto AMPK redukuje stres oksydacyjny, który może prowadzić do aktywacji ścieżki NF- κ B. Regulacja ta może prowadzić do poprawy zdrowia i długowieczności. Na podstawie [104], zmienione.

ność związane są z dążeniem do zachowania równowagi pro- i przeciwzapalnej [100].

Ścieżka sygnałowa NF- κ B jest głównym szlakiem, który zaangażowany jest w immunologiczną odpowiedź organizmu, zarówno wrodzoną, jak i nabytą. Wykazano w licznych badaniach, że aktywacja AMPK reguluje funkcjonowanie ścieżki NF- κ B. W wielu dotychczas przeprowadzonych badaniach ujawniono, że nadmierne spożycie kalorii prowadzi do chronicznego stanu zapalnego, szczególnie w tkance tłuszczowej [101,102]. AMPK może hamować ścieżkę sygnałową NF- κ B, co prowadzi do zapobiegania syntezie czynników prozapalnych, których nadmierne występowanie charakterystyczne jest dla procesu starzenia oraz w chorobach, których częstość występowania wzrasta wraz z wiekiem. Okazuje się, że sygnały wysyłane przy udziale AMPK mogą hamować odpowiedź stanu zapalnego indukowanego przez czynnik transkrypcyjny NF- κ B. Podjednostki budujące ten czynnik nie są bezpośrednio fosforylowane przez AMPK. W jego hamowanie zaangażowane są różne białka, podlegające regulacji przez AMPK, jak SIRT1, PGC-1 α , p53 czy FoxO [103]. Te z kolei mogą prowadzić do represji syntezy cytokin prozapalnych. Wysyłanie sygnałów przez AMPK zdaje się pozytywnie wpływać na metabolizm, jednocześnie może hamować stan zapalny związany z chronicznym stresem (Ryc. 5) [104]. Co więcej wydaje się, że AMPK odgrywa kluczową rolę w koordynacji sygnałów przeciwzapalnych w makrofagach [98].

WPLYW AMPK NA PRZEBIEG PROCESU AUTOFAGII

Istnieje coraz więcej dowodów na to, że starzenie się jest regulowane przez mechanizmy autofagii. Podczas starzenia

wydajność autofagii spada, co prowadzi do akumulacji toksycznych i uszkodzonych składników w komórce. Interesujące jest to, że te same ścieżki sygnałowe regulują zarówno procesy starzenia, jak i autofagię [105,106]. Zaangażowane są w wiele wspólnych ścieżek sygnałowych (np. AMPK, mTOR), regulowane przez podobne składniki (sirtuiny, FoxO, p53) i indukowane przez wiele podobnych substancji (m.in. kurkuminy czy resweratrol). Tak wiele uderzających podobieństw rodzi wniosek, że długowieczność jest ściśle uzależniona od autofagii [107].

W wielu pracach wykazano, że AMPK jest głównym induktorem autofagii, związanym ze spadkiem tempa metabolizmu w komórce. Dzięki zjawisku autofagii możliwe jest systematyczne i wydajne usuwanie nagromadzających się niesprawnych bądź uszkodzonych białek i organelli komórkowych. Wiele badań potwierdza, że szybkość usuwania wadliwych białek w procesach autofagii w komórce wyraźnie obniża szybkość procesów prowadzących do starzenia się komórek. Badania nad mechanizmami starzenia u *C. elegans* pokazały, że kilka genów związanych z procesem autofagii, m.in. *bec-1*, *atg-7* i *atg-12*, jest niezbędnych do wydłużenia życia u tych organizmów oraz, że autofagia jest kluczowym procesem w regulacji długowieczności. Zaobserwowano także, że wydłużenie życia poprzez restrikcję kaloryczną było także związane ze wzrostem autofagii u *C. elegans* [108].

Autofagia to proces zachowany w ewolucji, polegający na degradacji wadliwych białek, organelli i elementów obecnych w cytoplazmie, przy udziale lizosomów. Dzięki niej uniemożliwiona jest akumulacja różnych uszkodzonych struktur oraz toksyn w przestrzeni komórkowej. W prawidłowej komórce autofagia powinna zapewniać homeostazę między tworzeniem a usuwaniem składników komórkowych. Proces ten jest także indukowany w odpowiedzi na warunki stresowe, takie jak uszkodzenie struktury DNA, niedotlenienie czy głód, co umożliwia ochronę przed śmiercią spowodowaną trudnymi warunkami [109,110].

Ze względu na występowanie różnych mechanizmów dostarczania do lizosomów substratów do degradacji wyróżniamy trzy rodzaje autofagii: makroautofagię, mikroautofagię oraz autofagię zależną od białek opiekuńczych. Najczęściej występująca i najlepiej poznana jest makroautofagia, podczas której dochodzi do tworzenia autofagosomu. Ten rodzaj autofagii kontrolowany jest przez kaskadę produktów genów *Atg* (ang. *autophagy-related genes*). Za jej re-

gulację odpowiadają szlaki szczególnie wrażliwe na zmiany w dostępie składników odżywczych [111].

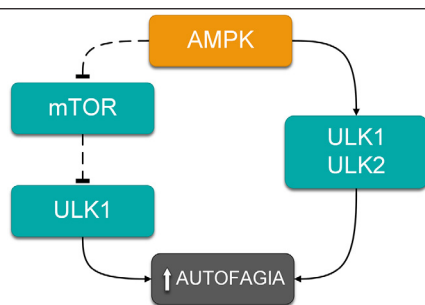
Jednym z kluczowych regulatorów autofagii u ludzi i myszy jest mTOR. Białko to prowadzi do hamowania autofagii w warunkach obfitości składników odżywczych i czynników wzrostu na rzecz proliferacji i aktywności metabolicznej komórki. Innym ważnym regulatorem jest AMPK, która hamuje białko mTOR w odpowiedzi na niski poziom ATP w komórce, prowadząc do wzrostu autofagii. Dzieje się to za pośrednictwem wzrostu aktywności AMPK, która wpływa bezpośrednio na Ulk1 i Ulk2, a także pośrednio poprzez hamowanie aktywności mTOR (Ryc. 6) [112].

Aby utrzymać homeostazę metaboliczną, komórka musi ściśle kontrolować generowanie i konsumpcję ATP. Wzrost stężeń ADP i AMP jest dla komórki sygnałem, że musi ograniczyć przeprowadzanie procesów wymagających dużych nakładów energetycznych. Zmiany stężeń nukleotydów adeninowych są bezpośrednio wyczuwane przez AMPK [113]. W odpowiedzi na stres metaboliczny AMPK aktywuje wewnątrzkomórkowe procesy, by przywrócić homeostazę energetyczną. Wykazano, że AMPK odpowiedzialna jest za indukcję długowieczności u *C. elegans* oraz promuje autofagię w komórkach ludzkich [114]. Dzięki tym obserwacjom możemy przypuszczać, że związek AMPK i autofagii być może będzie mógł być wykorzystany w działaniach dążących do wydłużenia życia.

WPŁYW POLIFENOLI NA STARZENIE ZA POŚREDNICTWEM AMPK

W ciągu ostatnich 20 lat wzrosło zainteresowanie zastosowaniem polifenoli w terapii chorób cywilizacyjnych. Polifenole wykazują działanie przeciwbakteryjne, przeciwgrzybicze czy przeciwnowotworowe, ale okazuje się, że mogą mieć też istotny wpływ na modulowanie procesów starzenia komórkowego. Poprzez regulację wielu szlaków sygnałowych zaangażowanych w starzenie komórkowe, związki te mogą zapobiegać starzeniu, niwelować jego skutki czy mieć udział w terapii chorób wieku podeszłego. Mogą wpływać aktywująco bądź hamująco na takie procesy jak wydzielanie cytokin, produkcję reaktywnych form tlenu, skracanie telomerów czy procesy zależne od stanu energetycznego w komórce. Ważnym aspektem przemawiającym za szerszym badaniem funkcji polifenoli jest ich potencjalnie mała toksyczność i wywoływanie raczej niewielkich skutków ubocznych, a większość z nich stosowana jest od lat w ziołolecznictwie i jako składnik diety [115,41]. Ponadto zwraca się uwagę na funkcję polifenoli w procesie autofagii. Polifenole indukują wiele ścieżek związanych z autofagią, przez co mogą mieć istotny związek z wydłużaniem życia. Na autofagię mogą wpływać, m.in. resweratrol i kurkumina poprzez aktywację ścieżki związanej z sirtuinami i AMPK [116].

Resweratrol jest polifenolem obecnym w dużym stężeniu, m.in. w winogronach, orzechach i jagodach, który chroni je przed infekcjami grzybiczymi i promieniowaniem ultrafioletowym. Wiele badań wykazało korzystny wpływ resweratrolu na zaburzenia, takie jak zespół metaboliczny, cukrzycę typu II czy choroby wieku podeszłego. Poza upatrywaniem związku wysokiej właściwości antyoksydacyj-



Rycina 6. Regulacja autofagii przez AMPK. AMPK może aktywować kinazy Ulk1 i Ulk2 bezpośrednio, co prowadzi do wzrostu autofagii w komórce, a także pośrednio przez hamowanie aktywności białka mTOR.

ných resweratrolu z próbą opóźniania procesów starzenia, przypuszcza się, że polifenol ten może być najbardziej obiecującym kandydatem naśladowującym działanie restrikcji kalorycznej. Wykazano, że tak jak ona, wpływa na aktywację AMPK i sirtuin, przez co jego wpływ na wydłużanie życia zdaje się być jeszcze bardziej prawdopodobny [117].

Okazuje się, że resweratrol aktywuje AMPK poprzez kilka różnych ścieżek. Może redukować poziom ATP w komórce poprzez hamowanie syntazy ATP, ponadto może aktywować AMPK bez zmian pomiędzy stosunkiem AMP i ADP do ATP [118]. Wykazano, że podawanie resweratrolu w niewielkich dawkach może aktywować AMPK poprzez ścieżkę zależną od Sirt1 [119]. W badaniach na myszach z delecją w genie kodującym podjednostkę katalityczną AMPK, będących na wysokokalorycznej diecie z suplementacją resweratrolu, zaobserwowano brak wzrostu tempa metabolizmu oraz redukcji masy ciała, które to pojawiły się u myszy typu dzikiego [120]. Wiadomo, że resweratrol wydłuża życie u *S. cerevisiae*, *C. elegans* i *D. melanogaster* poprzez ścieżkę aktywującą Sir2. Ponadto dowiedziono, że polifenol ten poprawia zdrowie i wydłuża maksymalną długość życia o 59% u ryb [121]. W badaniach przeprowadzonych na myszach dowiedziono, że podczas podawania resweratrolu u myszy, będących na wysokokalorycznej diecie, zaobserwowano wydłużenie życia w stosunku do grupy kontrolnej. Dochodziło u nich do wzrostu aktywacji AMPK, poprawy w funkcjonowaniu mitochondriów i ogólnego zdrowia, ale zmiany te nie zostały zaobserwowane u myszy na standardowej diecie [122].

Kolejnym wartym uwagi polifenolem, jest kurkumina, czyli ekstrakt z rośliny *Curcuma longa*, wykorzystywany szeroko w ziołolecznictwie oraz jako przyprawa do potraw. W wielu badaniach wykazano zróżnicowane funkcje tego związku naturalnego, który ma udział w zwalczaniu stanów zapalnych, cukrzycy typu II, alergii, reumatyzmu, a nawet nowotworów. Co więcej, kurkumina jest przeciwutleniaczem, który może działać jako modulator odpowiedzi obronnej komórki [123].

Kurkumina ma dużą liczbę molekularnych celów działania. Są to m.in. ścieżki związane ze stanem zapalnym, autofagią, proliferacją komórki czy apoptozą. Z tego względu prowadzone są liczne badania nad jej wpływem na choroby neurodegeneracyjne, nowotwory czy procesy starzenia. Wykazano, że działa ona hamującą na ścieżki NF- κ B i mTOR oraz na chroniczny stan zapalny, towarzyszący procesom starzenia i chorobom, których częstość występowania wzrasta wraz z wiekiem. Wspólnym ogniwem łączącym te wszystkie procesy jest regulowanie ich za pośrednictwem AMPK. Przypuszcza się, że dzięki swoim właściwościom kurkumina może przyczynić się do osiągnięcia długowieczności [124,125].

Innym ważnym polifenolem o szerokim spektrum działania na komórkę jest galusan epigallokatechiny (EGCG), aktywny składnik znajdujący się w wyciągu z zielonej herbaty. Oprócz swoich właściwości przeciwnowotworowych i antyoksydacyjnych, EGCG może także prowadzić do osiągnięcia efektów podobnych do tych występujących przy zastosowaniu restrikcji kalorycznej. EGCG indukuje liczne zmiany metaboliczne, między innymi poprzez aktywację AMPK. W efekcie

może opóźniać procesy starzenia oraz pojawienie się chorób, których częstość występowania wzrasta wraz z wiekiem [116].

PODSUMOWANIE

Starzenie się jest jednym z najintensywniej badanych procesów, a mimo to wciąż najsłabiej poznanych. Okazuje się, że na proces ten składa się wiele mniej lub bardziej istotnych czynników. Ważnymi aspektami jest regulacja procesów starzenia przez ścieżki sirtuin, mTOR, p53. Istotne są także chroniczny stan zapalny, autofagia oraz wpływ wywierany przez niektóre naturalne polifenole. Wiadomo także, że jak dotąd jedyną skuteczną możliwością wydłużania życia jest zastosowanie restrikcji kalorycznej. Wspólnym mianownikiem dla wymienionych procesów metabolicznych jest zaobserwowany wzrost aktywności AMPK. Niniejsza praca jest podsumowaniem dotychczasowych odkryć i osiągnięć dotyczących działania tej kinazy na ścieżki regulujące proces starzenia.

Wiadomo, że AMPK ma istotny związek z działaniem sirtuin, w szczególności SIRT1 i SIRT3, których wzrost aktywności związany jest z wydłużaniem życia. Białko mTOR, zaangażowane w procesy prowadzące do wzrostu i podziału komórek, hamowane jest przez AMPK, co w efekcie może prowadzić do długowieczności. Istotnym aspektem jest rola AMPK w regulacji funkcji białka p53. Także proces autofagii, którego zaburzenia są obserwowane podczas postępującego starzenia, powiązać można ze wzrostem aktywności AMPK. Istotnym aspektem jest także działanie naturalnych polifenoli, w tym resweratrolu, kurkuminy i EGCG, które wpływają na liczne mechanizmy związane ze starzeniem, w których niejednokrotnie bierze udział AMPK. Być może zaobserwowanie tych powiązań, dla których jak się okazuje wspólnym mianownikiem jest obecność AMPK, pozwoli rzucić nowe światło na zagadnienia i badania związane ze starzeniem. Istotną kwestią może okazać się poświęcenie większej uwagi roli AMPK w licznych procesach, mających związek ze starzeniem. Wydaje się, że regulując działanie AMPK, możliwe będzie jednoczesne wpłynięcie na liczne, działające pośrednio i bezpośrednio procesy, związane ze starzeniem i długowiecznością. Odkrycie substancji, która efektywnie aktywowałaby AMPK, nie wywołując przy tym szkodliwych skutków ubocznych, mogłoby okazać się przełomem w medycynie i gerontologii i istotnie wpłynąć na poprawę jakości i długości życia.

PIŚMIENNICTWO

1. Wang H, Dwyer-Lindgren L, Lofgren KT, Rajaratnam JK, Marcus JR, Levin-Rector A, Levitz CE, Lopez AD, Murray CJ (2012) Age-specific and sex-specific mortality in 187 countries, 1970–2010: a systematic analysis for the global burden of disease study 2010. *Lancet* 380: 2071–2094
2. Kirkwood TB (2005) Understanding the odd science of aging. *Cell* 119: 437–447
3. Lapointe J, Hekimi S (2010) When a theory of aging ages badly. *Cell Mol Life Sci* 67: 1–8
4. Mouchiroud L, Molin L, Dallière N, Solari F (2010) Life span extension by resveratrol, rapamycin, and metformin: The promise of dietary restriction mimetics for an healthy aging. *Biofactors* 36: 377–382
5. Boccardi V, Paolisso G (2014) Telomerase activation: a potential key modulator for human healthspan and longevity. *Ageing Res Rev* 15: 1–5
6. Allison DB, Antoine LH, Ballinger SW, Bamman MM, Biga P, Darley-Usmar VM, Fisher G, Gohlke JM, Halade GV, Hartman JL, Hunter

- GR, Messina JL, Nagy TR, Plaisance EP, Powell ML, Roth KA, Sandel MW, Schwartz TS, Smith DL, Sweatt JD, Tollefsbol TO, Watts SA, Yang Y, Zhang J, Austad SN (2014) Aging and energetics' ,Top 40' future research opportunities 2010-2013. *F1000Res* 3: 219
7. Bielak-Żmijewska A, Grabowska W, Przybylska D (2014) Rola starzenia komórkowego w starzeniu organizmu i chorobach związanych z wiekiem. *Postępy Biochem* 60: 144-160
8. Hayflick L, Moorhead PS (1961) The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 25: 585-621
9. Hayflick L (1985) The cell biology of aging. *Clin Geriatr Med* 1: 15-27
10. Bodnar AG, Ouellette M, Frolkis M, Holt SE, Chiu CP, Morin GB, Harley CB, Shay JW, Lichtsteiner S, Wright WE (1998) Extension of lifespan by introduction of telomerase into normal human cells. *Science* 279: 349-352
11. Johnson FB, Sinclair DA, Guarente L (1999) Molecular biology of aging. *Cell* 96: 291-302
12. Sohal RS, Weindruch R (1996) Oxidative stress, caloric restriction, and aging. *Science* 273: 59-63
13. Harman D (1956) Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* 11: 298-300
14. Lapointe J, Heikimi S (2010) When a theory of aging ages badly. *Cell Mol Life Sci* 67: 1-8
15. Piotrowska A, Bartnik E (2014) Rola reaktywnych form tlenu i mitochondriów w starzeniu. *Postępy Biochem* 60: 240-247
16. Harman D (1972) The biologic clock: the mitochondria? *J Am Geriatr Soc* 20: 145-147
17. Lagouge M, Larsson NG (2013) The role of mitochondrial DNA mutations and free radicals in disease and ageing. *J Int Med* 273: 529-543
18. Edgar D, Shabalina I, Camara Y, Wredenberg A, Calvaruso MA, Nijtmans L, Nedergaard J, Cannon B, Larsson NG, Trifunovic A (2009) Random point mutations with major effects on protein-coding genes are the driving force behind premature aging in mtDNA mutator mice. *Cell Metab* 10: 131-138
19. Lapointe J, Stepanyan Z, Bigras E, Hekimi S (2009) Reversal of the mitochondrial phenotype and slow development of oxidative biomarkers of aging in long-lived *Mcl1*^{+/+} mice. *J Biol Chem* 284: 20364-20374
20. Sanz A, Fernández-Ayala DJM, Stefanatos RKA, Jacobs HT (2010) Mitochondrial ROS production correlates with, but does not directly regulate lifespan in *Drosophila*. *Aging* 2: 200-223
21. Lapointe J, Hekimi S (2008) Early mitochondrial dysfunction in long-lived *Mcl1*^{+/+} mice. *J Biol Chem* 283: 26217-26227
22. Moskalev AA, Shaposhnikov MV, Plyusnina EN, Zhavoronkov A, Budovsky A, Yanai H, Fraifeld VE (2013) The role of DNA damage and repair in aging through the prism of Koch-like criteria. *Aging Res Rev* 12: 661-684
23. Hoeijmakers JH (2009) DNA damage, aging, and cancer. *New Eng J Med* 361: 1475-1485
24. Lord CJ, Ashworth A (2012) The DNA damage response and cancer therapy. *Nature* 481: 287-294
25. Blackburn EH, Greider CW, Szostak JW (2006) Telomeres and telomerase: the path from maize, *Tetrahymena* and yeast to human cancer and aging. *Nature Med* 12: 1133-1138
26. Kazak L, Reyes A, Holt IJ (2012) Minimizing the damage: repair pathways keep mitochondrial DNA intact. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13: 659-671
27. Jaskelioff M, Muller FL, Paik JH, Thomas E, Jiang S, Adams AC, Sahin E, Kost-Alimova M, Protopopov A, Cadiñanos J, Horner JW, Maratos-Flier E, Depinho RA (2011) Telomerase reactivation reverses tissue degeneration in aged telomerase-deficient mice. *Nature* 469: 102-106
28. Lopez-Otin C, Blasco MA, Serrano M, Partridge L, Kroemer G (2013) The hallmarks of aging. *Cell* 153: 1184-1207
29. Kahn BB, Alquier T, Carling D, Hardie DG (2005) AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism. *Cell Metab* 1: 15-25
30. Woods A, Vertommen D, Neumann D, Turk R, Bayliss J, Schlattner U, Wallimann T, Carling D, Rider MH (2003) Identification of phosphorylation sites in AMP-activated Protein Kinase (AMPK) for upstream AMPK Kinases and study of their roles by site-directed mutagenesis. *J Biol Chem* 278: 28434-28442
31. Riek U, Scholz R, Konarev P, Rufer A, Suter M, Nazabal A, Ringler P, Chami M, Muller SA, Neumann D, Forstner M, Hennig M, Zenobi R, Engel A, Svergun D, Schlattner U, Wallimann T (2008) Structural properties of AMP-activated protein kinase: dimerization, molecular shape, and changes upon ligand. *J Biol Chem* 283: 18331-18343
32. Xiao B, Sanders MJ, Carmena D, Bright NJ, Haire LF, Underwood E, Patel BR, Heath RB, Walker PA, Hallen S, Giordanetto F, Martin SR, Carling D, Gamblin SJ (2013) Structural basis of AMPK regulation by small molecule activators. *Nature Commun* 4: 3017
33. Oakhill JS, Scott JW, Kemp BE (2012) AMPK functions as an adenylate charge-regulated protein kinase. *Trends Endocrinol Metab* 23: 124-132
34. Steinberg GR, Kemp BE (2009) AMPK in health and disease. *Physiol Rev* 89: 1025-1078
35. Hardie DG (2011) AMP-activated protein kinase – an energy sensor that regulates all aspects of cell function. *Genes Dev* 25: 1895-1908
36. Lage R, Diéguez C, Vidal-Puig A, López M (2008) AMPK: a metabolic gauge regulating whole-body energy homeostasis. *Trends Mol Med* 14: 539-549
37. Salminen A, Kaarniranta K (2012) AMP-activated protein kinase (AMPK) controls the aging process via an integrated signaling network. *Ageing Res Rev* 11: 230-241
38. Moroz N, Carmona JJ, Anderson E, Hart AC, Sinclair DA, Blackwell TK (2014) Dietary restriction involves NAD⁺-dependent mechanisms and a shift toward oxidative metabolism. *Aging Cell* 1075-1085
39. Robertson LT, Mitchell JR (2013) Benefits of short-term dietary restriction in mammals. *Exp Gerontol* 48: 1043-1048
40. Taormina G, Mirisola MG (2014) Calorie restriction in mammals and simple model organisms. *Biomed Res Int* 2014: 308690
41. Dudkowska M, Kucharkiewicz K (2014) Związki pochodzenia naturalnego modulujące starzenie i śmierć komórek. *Postępy Biochem* 60: 207-220
42. Schulz TJ, Zarse K, Voigt A, Urban N, Birringer M, Ristow M (2007) Glucose restriction extends *Caenorhabditis elegans* life span by inducing mitochondrial respiration and increasing oxidative stress. *Cell Metab* 6: 280-293
43. Onken B, Driscoll M (2010) Metformin induces a dietary restriction-like state and the oxidative stress response to extend *C. elegans* Healthspan via AMPK, LKB1, and SKN-1. *PLoS One* 18: 5
44. Canto C, Auwerx J (2011) Calorie Restriction: Is AMPK a Key Sensor and Effector? *Physiology* 26: 214-224
45. McCarty MF (2004) Chronic activation of AMP-activated kinase as a strategy for slowing aging. *Med Hypotheses* 63: 334-339
46. Martin-Montalvo A, Mercken EM, Mitchell SJ, Palacios HH, Mote PL, Scheibye-Knudsen M, Gomes AP, Ward TM, Minor RK, Blouin MJ (2013) Metformin improves healthspan and lifespan in mice. *Nature Commun* 4: 2192
47. Canto C, Gerhart-Hines Z, Feige JN, Lagouge M, Noriega L, Milne JC, Elliott PJ, Puigserver P, Auwerx J (2009) AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD⁺ metabolism and SIRT1 activity. *Nature* 458: 1056-1060
48. Solon-Biet SM, Mitchell SJ, de Cabo R, Raubenheimer D, Le Couteur DG, Simpson SJ (2015) Macronutrients and caloric intake in health and longevity. *J Endocrinol* 226: 17-28
49. Willcox DC, Willcox BJ, Todoriki H, Curb JD, Suzuki M (2006) Caloric restriction and human longevity: what can we learn from the Okinawans? *Biogerontology* 7: 173-177
50. Kagawa Y (1978) Impact of westernization on the nutrition of Japanese: changes in physique, cancer, longevity and centenarians. *Prev Med* 7: 205-217
51. Heilbronn LK, Ravussin E (2003) Calorie restriction and aging: review of the literature and implications for studies in humans. *Am J Clin Nutr* 78: 361-369
52. Blander G, Guarente L (2004) The Sir2 family of protein deacetylases. *Annu Rev Biochem* 73: 417-435

53. Koubova J, Guarente L (2003) How does calorie restriction work? *Genes Develop* 17: 313-321
54. Kaerberlein M, McVey M and Guarente L (1999) The SIR2/3/4 complex and SIR2 alone promote longevity in *Saccharomyces cerevisiae* by two different mechanisms. *Genes Dev* 13: 2570-2580
55. Frye RA (2000) Phylogenetic classification of prokaryotic and eukaryotic Sir2-like proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 273: 793-798
56. Haigis MC, Sinclair DA (2010) Mammalian sirtuins: biological insights and disease relevance. *Annu Rev Pathol* 5: 253-295
57. Guarente L (2013) Introduction: sirtuins in aging and diseases. *Methods Mol Biol* 1077: 3-10
58. Satoh A, Brace CS, Rensing N, Clifton P, Wozniak DF, Herzog ED, Yamada KA, Imai S (2013) Sirt1 extends life span and delays aging in mice through the regulation of Nk2 homeobox 1 in the DMH and LH. *Cell Metab* 18: 416-430
59. Le Couteur DG, McLachlan AJ, Quinn RJ, Simpson SJ, de Cabo R (2012) Aging biology and novel targets for drug discovery. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 67: 168-174
60. Mair W, Panowski SH, Shaw RJ, Dillin A (2009) Optimizing dietary restriction for genetic epistasis analysis and gene discovery in *C. elegans*. *PLoS One* 4: 4535
61. Burnett C, Valentini S, Cabreiro F, Goss M, Somogyvári M, Piper MD, Hoddinott M, Sutphin GL, Leko V, McElwee JJ, Vazquez-Manrique RP, Orfila AM, Ackerman D, Au C, Vinti G, Riesen M, Howard K, Neri C, Bedalov A, Kaerberlein M, Soti C, Partridge L, Gems D (2011) Absence of effects of Sir2 overexpression on lifespan in *C. elegans* and *Drosophila*. *Nature* 477: 482-485
62. Brooks CL, Gu W; (2009) How does SIRT1 affect metabolism, senescence and cancer? *Nature Rev, Cancer* 9: 122-127
63. Powell, MJ, Casimiro MC; Cordon-Cardo C; He X, Yeow WS, Wang C, McCue PA, McBurney MW, Pestell RG (2011) Disruption of a SIRT1-dependent autophagy checkpoint in the prostate results in prostatic intraepithelial neoplasia lesion formation. *Cancer Res* 71: 964-975
64. Simmons GE Jr, Pruitt WM, Pruitt K (2015) Diverse roles of SIRT1 in cancer biology and lipid metabolism. *Int J Mol Sci* 16: 950-965
65. Hardie DG (2007) AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8: 774-785
66. Canto C, Auwerx J (2009) PGC-1, SIRT1 and AMPK, an energy sensing network that controls energy expenditure. *Curr Opin Lipidol* 20: 98-105
67. Ruderman NB, Xu J, Nelson L, Cacicedo JM, Saha AK, Lan F, Ido Y (2010) AMPK and SIRT1: a long-standing partnership? *Am J Physiol Endocrinol Metab* 298: 751-760
68. Suchankova G, Nelson LE, Gerhart-Hines Z, Kelly M, Gauthier MS, Saha AK, Ido Y, Puigserver P, Ruderman NB (2009) Concurrent regulation of AMP-activated protein kinase and SIRT1 in mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* 378: 836-841
69. Fulco M, Cen Y, Zhao P, Hoffman EP, McBurney MW, Sauve AA, Sartorelli V (2008) Glucose restriction inhibits skeletal myoblast differentiation by activating SIRT1 through AMPK-mediated regulation of Namp1. *Dev Cell* 14: 661-673
70. Zwaans BM, Lombard DB (2014) Interplay between sirtuins, MYC and hypoxia-inducible factor in cancer associated metabolic reprogramming. *Dis Model Mech* 7: 1023-1032
71. Lombard DB, Alt FW, Cheng HL, Bunkenborg J, Streeper RS, Mostoslavsky R, Kim J, Yancopoulos G, Valenzuela D, Murphy A, Yang Y, Chen Y, Hirschey MD, Bronson RT, Haigis M, Guarente LP, Farese RV Jr, Weissman S, Verdin E, Schwer B (2007) Mammalian sir2 homolog sir3 regulates global mitochondrial lysine acetylation. *Mol Cell Biol* 27: 8807-8814
72. Hardie DG, Ross FA, Hawley SA (2012) Ampk: A nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. *Nature Rev Mol Cell Biol* 13: 251-262
73. Lin J, Handschin C, Spiegelman BM (2005) Metabolic control through the pgc-1 family of transcription coactivators. *Cell Metab* 1: 361-370
74. Kong X, Wang R, Xue Y, Liu X, Zhang H, Chen Y, Fang F, Chang Y (2010) Sirtuin 3, a new target of pgc-1alpha, plays an important role in the suppression of ros and mitochondrial biogenesis. *PLoS ONE* 5: 11607
75. Pillai VB, Sundaresan NR, Kim G, Gupta M, Rajamohan SB, Pillai JB, Samant S, Ravindra PV, Isbatan A, Gupta MP (2010) Exogenous nad blocks cardiac hypertrophic response via activation of the-sirt3-lkb1-amp-activated kinase pathway. *J Biol Chem* 285: 3133-3144
76. Olmos Y, Valle I, Borniquel S, Tierrez A, Soria E, Lamas S, Monsalve M (2009) Mutual dependence of foxo3a and pgc-1alpha in the induction of oxidative stress genes. *The J Biol Chem* 284: 14476-14484
77. Kincaid B, Bossy-Wetzel E (2013) Forever young: SIRT3 a shield against mitochondrial melt down, aging, and neurodegeneration. *Front Aging Neurosci* 5: 48
78. Lombard DB, Zwaans BM (2014) SIRT3: as simple as it seems? *Gerontology* 60: 56-64
79. Albert V, Hall MN (2015) mTOR signaling in cellular and organismal energetic. *Curr Opin Cell Biol* 33: 55-66
80. Zoncu R, Efeyan A, Sabatini DM (2011) mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12: 21-35
81. Pan D, Matsuura Y (2012) Structures of the pleckstrin homology domain of *Saccharomyces cerevisiae* Avo1 and its human orthologue Sin1, an essential subunit of TOR complex 2. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* 68: 386-392
82. Johnson SC, Rabinovitch PS, Kaerberlein M (2013) mTOR is a key modulator of ageing and age-related disease. *Nature* 493: 338-345
83. Hosokawa N, Hara T, Kaizuka T, Kishi C, Takamura A, Miura Y, Iemura S, Natsume T, Takehana K, Yamada N, Guan JL, Oshiro N, Mizushima N (2009) Nutrient-dependent mTORC1 association with the ULK1-Atg13-FIP200 complex required for autophagy. *Mol Biol Cell* 20: 1981-1991
84. Fabrizio P, Pozza F, Pletcher SD, Gendron CM, Longo VD (2001) Regulation of longevity and stress resistance by Sch9 in yeast. *Science* 292: 288-290
85. Kapahi P, Zid BM, Harper T, Koslover D, Sapin V, Benzer S (2004) Regulation of lifespan in *Drosophila* by modulation of genes in the TOR signaling pathway. *Curr Biol* 14: 885-890
86. Jia K, Chen D, Riddle DL (2004) The TOR pathway interacts with the insulin signaling pathway to regulate *C. elegans* larval development, metabolism and life span. *Develop* 131: 3897-3906
87. Miller RA, Harrison DE, Astle CM, Baur JA, Boyd AR, de Cabo R, Fernandez E, Flurkey K, Javors MA, Nelson JF, Orihuela CJ, Pletcher S, Sharp ZD, Sinclair D, Starnes JW, Wilkinson JE, Nadon NL, Strong R (2011) Rapamycin, but not resveratrol or simvastatin, extends life span of genetically heterogeneous mice. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 66: 191-201
88. Inoki K, Zhu T, Guan KL (2003) TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. *Cell* 115: 577-590
89. Gwinn DM, Shackelford DB, Egan DF, Mihaylova MM, Mery A, Vazquez DS, Turk BE, Shaw RJ (2008) AMPK phosphorylation of rapTOR mediates a metabolic checkpoint. *Mol Cell* 30: 214-226
90. Mair W, Morante I, Rodrigues APC, Manning G, Montminy M, Shaw RJ, Dillin A (2011) Lifespan extension induced by AMPK and calcineurin is mediated by CRTC-1 and CREB. *Nature* 470: 404-408
91. Tucci P (2012) Caloric restriction: is mammalian life extension linked to p53? *Aging* 4: 525-534
92. Korwek Z, Alster O (2014) Znaczniki starzenia komórkowego. *Postepy Biochem* 60: 248-262
93. Rufini A, Tucci P, Celardo I, Melino G (2013) Senescence and aging: the critical roles of p53. *Oncogene* 32: 5128-5143
94. Thoreen CC, Sabatini DM (2005) AMPK and p53 help cells through lean times. *Cell Metab* 1: 287-288
95. Jones RG, Plas DR, Kubek S, Buzzai M, Mu J, Xu Y, Birnbaum MJ, Thompson CB (2005) AMP-activated protein kinase induces a p53-dependent metabolic checkpoint. *Mol Cell* 18: 283-293

96. Feng Z, Lin M, Wu R (2011) The Regulation of Aging and Longevity: A New and Complex Role of p53. *Genes Cancer* 2: 443-452
97. Hotamisligil GS, Erbay E (2008) Nutrient sensing and inflammation in metabolic diseases. *Nat Rev Immunol* 8: 923-934
98. Sag D, Carling D, Stout RD, Suttles J (2008) Adenosine 5-monophosphate-activated protein kinase promotes macrophage polarization to an anti-inflammatory functional phenotype. *J Immunol* 181: 8633-8641
99. Galic S, Fullerton MD, Schertzer JD, Sikkema S, Marcinko K, Walkley CR, Izon D, Honeyman J, Chen ZP, van Denderen B J, Kemp BE, Steinberg GR (2011) Hematopoietic AMPK β 1 reduces mouse adipose tissue macrophage inflammation and insulin resistance in obesity. *J Clin Invest* 120: 4903-4915
100. Sikora E (2014) Starzenie i długowieczność. *Postepy Biochem* 60: 124-137
101. Adler AS, Sinha S, Kawahara TL, Zhang JY, Segal E, Chang HY (2007) Motif module map reveals enforcement of aging by continual NF- κ B activity. *Genes Dev* 21: 3244-3257
102. Salminen A, Kaarniranta K (2009) NF- κ B signaling in the aging process. *J Clin Immunol* 29: 397-405
103. Salminen A, Kaarniranta K (2010) Genetics vs. entropy: longevity factors suppress the NF- κ B-driven entropic aging process. *Ageing Res Rev* 9: 298-314
104. Salminen A, Hyttinen JM, Kaarniranta K (2011) AMP-activated protein kinase inhibits NF- κ B signaling and inflammation: impact on healthspan and lifespan. *J Mol Med* 89: 667-676
105. De Meyer GR, De Keulenaer GW, Martinet W (2010) Role of autophagy in heart failure associated with aging. *Heart Failure Rev* 15: 423-430
106. Topisirovic I, Sonenberg N (2010) Cell biology. Burn out or fade away? *Science* 327: 1200-1201
107. Petrovski G, Das DK (2010) Does autophagy take a front seat in lifespan extension? *J Cell Mol Med* 14: 2543-2551
108. Gems D, Partridge L (2013) Genetics of longevity in model organisms: debates and paradigm shifts. *Ann Rev Physiol* 75: 621-644
109. Levine B, Klionsky DJ (2004) Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev Cell* 463-477
110. Liu B, Cheng, Liu Q, Bao JK, Yang JM (2010) Autophagic pathways as new targets for cancer drug development. *Acta Pharmacologica Sinica* 31: 1154-1164
111. Dereń-Wagemann I, Kielbiński M, Kuliczowski K (2013) Autofagia - proces o dwóch obliczach. *Acta Haematologica Polonica* 44: 383-391
112. Alers S, Löffler AS, Wesselborg S, Stork B (2012) Role of AMPK-mTOR-Ulk1/2 in the regulation of autophagy: cross talk, shortcuts, and feedbacks. *Mol Cell Biol* 32: 2-11
113. Russell RC, Yuan HX, Guan KL (2014) Autophagy regulation by nutrient signaling. *Cell Research* 24: 42-57
114. Liang J, Shao SH, Xu ZX, Hennessy B, Ding Z, Larrea M, Kondo S, Dumont DJ, Gutterman JU, Walker CL, Slingerland JM, Mills GB (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
115. Marchal J, Pifferi F, Aujard F (2013) Resveratrol in mammals: effects on aging biomarkers, age-related diseases, and life span. *Ann N Y Acad Sci* 1280: 67-73
116. Howitz KT, Bitterman KJ, Cohen HY, Lamming DW, Lavu S, Wood JG, Zipkin RE, Chung P, Kisielewski A, Zhang LL, Scherer B, Sinclair DA (2003) Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature* 425: 191-196
117. Price NL, Gomes AP, Ling AJ, Duarte FV, Martin-Montalvo A, North BJ, Agarwal B, Ye L, Ramadori G, Teodoro JS, Hubbard BP, Varela AT, Davis JG, Varamini B, Hafner A, Moaddel R, Rolo AP, Coppari R, Palmeira CM, de Cabo R, Baur JA, Sinclair DA (2012) SIRT1 is required for AMPK activation and the beneficial effects of resveratrol on mitochondrial function. *Cell Metab* 15: 675-690
118. Zheng J, Ramirez VD (2000) Inhibition of mitochondrial proton F0F1-ATPase/ATP synthase by polyphenolic phytochemicals. *Br J Pharmacol* 130: 1115-1122
119. Dasgupta B, Milbrandt J (2007) Resveratrol stimulates AMP kinase activity in neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 7217-7222
120. Um JH, Park SJ, Kang H, Yang S, Foretz M, McBurney MW, Kim MK, Viollet B, Chung JH (2010) AMP-activated protein kinase-deficient mice are resistant to the metabolic effects of resveratrol. *Diabetes* 59: 554-563
121. Agarwal B, Baur JA (2011) Resveratrol and life extension. *Ann N Y Acad Sci* 1205: 138-143
122. Baur JA, Pearson KJ, Price NL, Jamieson HA, Lerin C, Kalra A, Prabhu VV, Allard JS, Lopez-Lluch G, Lewis K, Pistell PJ, Poosala S, Becker KG, Boss O, Gwinn D, Wang M, Ramaswamy S, Fishbein KW, Spencer RG, Lakatta EG, Le Couteur D, Shaw RJ, Navas P, Puigserver P, Ingram DK, de Cabo R, Sinclair DA (2006) Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature* 444: 337-342
123. Sharma D, Sethi P, Hussain E, Singh R (2009) Curcumin counteracts the aluminium-induced ageing-related alterations in oxidative stress, Na⁺, K⁺, ATPase and protein kinase C in adult and old rat brain regions. *Biogerontology* 10: 489-502
124. Sikora E, Bielak-Zmijewska A, Mosieniak G, Piwocka K (2010) The promise of slow down ageing may come from curcumin. *Curr Pharm Des* 16: 884-892
125. Sikora E, Scapagnini G, Barbagallo M (2010) Curcumin, inflammation, ageing and age-related diseases. *Immun Ageing* 7: 1-4
126. Motoshima H, Goldstein BJ, Igata M, Araki E (2006) AMPK and cell proliferation-AMPK as a therapeutic target for atherosclerosis and cancer. *J Physiol* 574: 63-71

The key role of AMP-activated protein kinase (AMPK) in aging process

Anna Michalik, Robert Jarzyna✉

Department of Metabolic Regulation, Biochemistry Institute, Faculty of Biology, University of Warsaw, 1 Miecznikowa St., 02-096 Warszawa, Poland

✉e-mail: rjarzyna@biol.uw.edu.pl

Key words: AMPK, aging, longevity

ABSTRACT

Aging is one of the most extensively studied biological process and yet still some of its aspects remain elusive. It appears that AMP – activated protein kinase (AMPK) plays an important role in many processes of aging, but this fact is often neglected in the studies on aging. This work summarizes the information about AMPK participation in the aging process. AMPK participation in the regulation of aging was indicated in the mechanisms dependent on: caloric restriction, mTOR, p53, sirtuins, autophagy, inflammation and the effects caused by polyphenols.