

УДК 576.32

ВЛИЯНИЕ β -GPA НА МАРКЕРЫ АНАБОЛИЧЕСКИХ И КАТАБОЛИЧЕСКИХ СИГНАЛЬНЫХ ПУТЕЙ В *m. soleus* КРЫСЫ НА НАЧАЛЬНОЙ СТАДИИ ГРАВИТАЦИОННОЙ РАЗГРУЗКИ

© 2019 г. Н. А. Вильчинская^a, Е. П. Мочалова^a, И. И. Парамонова^a,
С. П. Белова^a, Т. М. Мирзоев^{a, *}, Б. С. Шенкман^a

^aГосударственный научный центр Российской Федерации –
Институт медико-биологических проблем Российской академии наук,
Хорошевское шоссе, 76А, Москва, 123007, Россия

*e-mail: tmirzoev@yandex.ru

Поступила в редакцию 05.04.2019 г.

После доработки 16.07.2019 г.

Принята к публикации 17.07.2019 г.

Молекулярные механизмы, инициирующие развитие атрофических изменений в постуральной мышце млекопитающих, не определены. Поскольку инактивация скелетной мышцы может приводить к изменению баланса внутримышечных макроэргов, мы предположили, что АМР-активируемая протеинкиназа (АМРК) может играть важную роль в регулировке анаболических и катаболических сигнальных путей в постуральной мышце на начальном этапе функциональной разгрузки. В качестве модулятора баланса макроэргических соединений может выступать бета-гуанидинопропионовая кислота (β -GPA), применение которой способствует уменьшению содержания внутриклеточных макроэргических фосфатов. Цель исследования состояла в оценке сигнальных путей синтеза и распада белка в *m. soleus* крысы после 1-суточной функциональной разгрузки на фоне предварительной обработки животных инъекциями β -GPA. В эксперименте использовали самцов крыс Вистар, которые были разделены на следующие группы: 1) виварный контроль (С), 2) виварный контроль + β -GPA (С+GPA), 3) 1-суточное антиортостатическое вывешивание (НУ), 4) 1-суточное антиортостатическое вывешивание + β -GPA (НУ + GPA). β -GPA вводили ежедневно посредством внутривентральных инъекций (400 мг/кг). Содержание ключевых сигнальных белков (АМРК, АСС, p70S6K, 4E-BP1, FOXO3) определяли методом гель-электрофореза с последующим иммуноблоттингом. Экспрессию мРНК убиквитин-лигазы (MuRF-1 и MAFbx) оценивали с помощью ПЦР в реальном времени. В группе с 1-суточной функциональной разгрузкой и предварительной обработкой β -GPA наблюдалось предотвращение снижения фосфорилирования АМРК, АСС и 4E-BP1, а повышенный уровень фосфорилирования p70S6K снижался до контрольных значений. При этом фосфорилирование АКТ и FOXO3, а также уровень экспрессии MuRF-1 и MAFbx в группе “НУ + GPA” не имели отличий от группы “НУ”. Анализируя полученные данные, можно сделать вывод о том, что активность АМРК может играть важную роль в модуляции анаболического mTORC1-сигналинга в камбаловидной мышце крысы на раннем этапе моделируемой микрогравитации.

Ключевые слова: камбаловидная мышца, гравитационная разгрузка, β -GPA, АМРК, p70S6K, убиквитин-лигазы

DOI: 10.1134/S0233475519060100

ВВЕДЕНИЕ

Хорошо известно, что реальная или моделируемая микрогравитация приводит к значительной атрофии скелетных мышц млекопитающих, при этом наиболее глубокие изменения наблюдаются в антигравитационной камбаловидной мышце (*m. soleus*) [1]. Однако молекулярные механизмы, которые могут инициировать развитие атрофических изменений в постуральной мышце, остаются неопределенными. Поскольку вызванная функциональной разгрузкой инактивация скелетной мышцы приводит к изменению уровня внутримышечных макроэргов [2, 3], мы предпо-

ложили, что ключевой энергетический сенсор – АМР-активируемая протеинкиназа (АМРК) – может играть важную триггерную роль в развитии атрофических процессов в мышце. Известно, что активированная АМРК может блокировать анаболические сигнальные пути и одновременно активировать протеолитические процессы в скелетной мышце [4–6]. Так, показано, что АМРК способна ингибировать протеинкиназу mTORC1 (мишень рапамицина у млекопитающих, комплекс 1) – ключевой регулятор синтеза белка в клетке [7]. Главными субстратами mTORC1 являются рибосомальная киназа p70 (p70s6k) и белок, связывающий инициаторный фактор 4E (4E-BP1)

[8]. Также показано, что активированная АМРК может ингибировать активность протеинкиназы В (АКТ) и инициировать FOXO-зависимую экспрессию мышечно-специфичных убиквитин-лигаз MuRF1 и MAFbx [9, 10]. При этом бета-гуанидинопропионовая кислота (β -GPA) может конкурентно ингибировать проникновение креатина в клетку [11, 12], приводя к уменьшению внутриклеточных макроэргических фосфатов и последующей активации АМРК [12, 13]. Также показано, что в скелетной мышце хроническое действие β -GPA реализуется посредством АМРК-зависимых сигнальных механизмов [14]. В связи с этим цель исследования состояла в оценке сигнальных путей синтеза и распада белка в *m. soleus* крысы после 1-суточной функциональной разгрузки на фоне предварительных инъекций β -GPA животным.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Организация эксперимента. Использовали самцов крыс Вистар массой 190–210 г, которые были случайным образом разделены на следующие группы ($n = 8$ /группа): 1) виварный контроль + физраствор в течение 7 дней (С); 2) виварный контроль + β -GPA в течение 7 дней (С+ GPA); 3) физраствор в течение 6 дней до 1-суточного антиортостатического вывешивания и в день вывешивания (НУ); 4) β -GPA в течение 6 дней до 1-суточного антиортостатического вывешивания и в день вывешивания (НУ + GPA); β -GPA (400 мг/кг) или эквивалентную дозу физраствора вводили ежедневно посредством внутривентральных инъекций. Животных содержали в условиях вивария на стандартном корме и воде *ad libitum*. В исследовании использовали стандартную модель антиортостатического вывешивания, позволяющую имитировать эффекты микрогравитации [15]. Эвтаназии животных проводили посредством внутривентрального введения 10% раствора авертина (10 мл/кг). Все процедуры с животными были одобрены Комиссией по биомедицинской этике ГНЦ РФ – ИМБП РАН (протокол № 447 от 28 марта 2017 г.).

Вестерн-блоттинг. На криостате Leica (Германия) при -20°C замороженную мышечную ткань нарезали (80 срезов толщиной 20 мкм) в пробирки. Затем в пробирки с образцами добавляли охлажденный лизирующий буфер RIPA Lysis Buffer System (sc-24948, Santa Cruz Biotechnology, США) с добавлением 5 мМ EDTA, 1 мМ Na_3VO_4 , 1 мМ DTT, 1 мМ PMSF, 1 мМ аprotинина, 1 мМ лейпептина, 1 мМ пепстатина А и коктейля ингибиторов фосфатаз (40 мкл/мл) (Phosphatase Inhibitor Cocktail B, sc-45045, Santa Cruz Biotechnology, США) из расчета 130 мкл буфера на одну пробу. Затем проводили гомогенизацию и центрифугирование (в течение 15 мин при температуре $+4^{\circ}\text{C}$ и 12000 об/мин). После этого отбирали надосадочную жидкость и определяли концентрацию белка на спектрофотометре UV-2450 (Shimadzu, Япония) методом Брэдфорда, измеряя поглоще-

ние на длине волны 595 нм. Концентрация белка в пробах рассчитывалась по калибровочной кривой. Гомогенаты, полученные из мышечной ткани каждого животного, анализировали по-отдельности. Гель-электрофорез проводили в 10% разделяющем полиакриламидном геле в минисистеме Bio-Rad (США) в течение 1 ч при силе тока 17 мА на один гель. Перенос белков на нитроцеллюлозную мембрану (Bio-Rad, США) осуществляли в системе mini Trans-Blot (Bio-Rad) в течение 2 ч при температуре $+4^{\circ}\text{C}$ и постоянном напряжении 100 В. Для проверки равной загрузки белка на все дорожки нитроцеллюлозную мембрану окрашивали Ponceau S. После этого мембрану отмывали от Ponceau S и блокировали в 4% растворе сухого молока в PBST (PBS + 0.1% Tween 20) при комнатной температуре в течение 1 ч. Затем инкубировали (в течение 15 ч при $+4^{\circ}\text{C}$) с первичными антителами против P-АМРК (Thr 172) (1 : 500; Santa Cruz Biotechnology, США, #33524), t-АМРК (1 : 500, Cell Signalling Technology, США, #2532); P-ACC (Ser 79, 1 : 1000, Cell Signalling Technology, #3661), t-ACC (1 : 2000, Cell Signalling Technology, #3662), P-p70s6k (Thr 389) (1 : 2000, sc-11759, Santa-Cruz), p70s6k (#9202, 1 : 1000, Cell Signaling), P-4E-BP-1 (Thr37/46) (1 : 1000, #2855, Cell Signaling), 4E-BP-1 (1 : 1000, #9452, Cell Signaling), P-АКТ (S473) (1 : 1000, #4058, Cell Signaling), АКТ (1 : 1000, #2920, Cell Signaling), P-FOXO3 (S253) (1 : 1000, sc-11351, Santa Cruz), а также моноклональными антителами Anti-GAPDH (G041, abm, Канада) в разведении 1 : 3000. После этого отмывали мембраны в PBST 5 раз по 5 мин. Затем мембраны инкубировали в течение 1 ч с биотинилированными вторичными анти-кроличьими антителами козы (sc-2004, Santa Cruz) в разведении 1 : 1000. Для выявления GAPDH использовали вторичные анти-мышинные антитела козы в разведении 1 : 20000 (#1706516, Bio-Rad). Далее проводили отмывку в PBST (5 раз по 5 мин). Сначала выявлялась фосфорилированная форма целевого белка, затем проводили стриппирование мембраны, после чего выявлялась полная форма белка. Для стриппирования мембран использовали специальный коммерческий буфер Restore™ Westren Blot Stripping Buffer (#21059, Thermo Scientific, США). Белковые полосы выявляли на мембране с помощью Clarity™ Western ECL Substrate (#1705061, Bio-Rad). Белковые полосы анализировали с использованием блот-сканера C-DiGit (LI-COR Biotechnology, США) и соответствующей программы Image Studio Digits. Сигнал от белковых полос нормировали по референсному белку GAPDH. Вестерн-блоттинг проводили не менее 2 раз.

ПЦР в реальном времени. РНК из мышечной ткани выделяли на микроколонках RNeasy Micro Kit (Qiagen) согласно инструкции производителя. Все образцы РНК были обработаны протеиназой К и ДНКазой I. В обратной транскрипции использовали водный раствор 0.5 мкг РНК, оли-

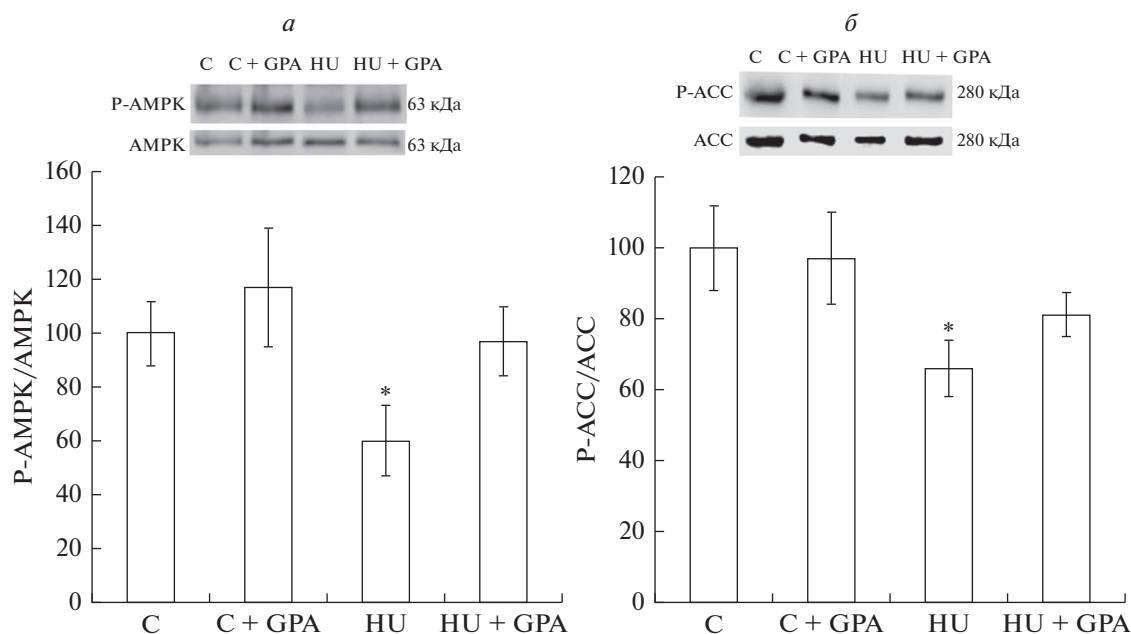


Рис. 1. Статус фосфорилирования AMPK (Thr172) (а) и ACC (Ser79) (б) в камбаловидной мышце крысы, % от контрольной группы (С). * – Статистически значимые отличия от контрольной группы (С).

го(dT)₁₅, гексануклеотиды d(N)₆, обратную транскриптазу MMLV. Обратную транскрипцию проводили при 37°C в течение 60 мин согласно стандартному протоколу. Полученные образцы кДНК хранили при –84°C для проведения ОТ-ПЦР в реальном времени с использованием интеркалирующего красителя SYBR Green I. Данные ОТ-ПЦР анализировали при помощи программы REST (Relative expression software tool) 2009 v.2.0.12 (QIAGEN). Данные, полученные с помощью ПЦР в реальном времени, анализировали с помощью метода 2^{-ΔΔCt} (метод Ливака). В качестве референсных генов использовали гены *GAPDH* и β -актина, экспрессия которых в *m. soleus* в условиях эксперимента была постоянной. праймеров, Для проведения ПЦР использовали следующие праймеры: MuRF1 (5'-GCCAATTTGGT-GCTTTTGT-3'; 5'-AAATTCAGTCCTCTC-CCCGT-3'), MAFbx (5'-CTACGATGTTGCAGC-CAAGA-3'; 5'-GGCAGTCGAGAAGTCCAGTC-3'), β -актин (5'-TCATGAAGTGTGACGTTGACATCC-3'; 5'-GTAAAACGCAGCTCAGTAACAGTC-3'), GAPDH (5'-ACGGCAAGTTCAACGGCACAGT-CAA-3'; 5'-GCTTCCAGAGGGGCCATCCACA-3').

Статистический анализ. Полученные данные анализировали с использованием таких программ, как REST 2009 v.2.0.12 и Microsoft Excel. Данные по содержанию белков представлены в виде средних значений \pm стандартная ошибка среднего значения. Данные по экспрессии генов представлены в виде медиан с указанием максимума, минимума и интерквартильной широты (0.25–0.75). Статистическую значимость различий между группами определяли посредством дисперсионного анализа с последующим применением критерия

Тьюки для множественных сравнений. Значимыми считали отличия при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Предварительные инъекции β -GPA не вызвали у контрольных животных (группа “С + GPA”) каких-либо изменений в статусе фосфорилирования AMPK, ацетил-КоА-карбоксилазы (ACC), киназы рибосомного белка S6 (p70S6K), белка, связывающего фактор инициации трансляции 4E (4E-BP1), протеинкиназы В (АКТ) и транскрипционного фактора FOXO3 по сравнению с контрольной группой (С). Экспрессия мРНК убиквитин-лигаз MuRF-1 и MAFbx в группе “С + GPA” также не отличалась от контрольных значений. Односуточная функциональная разгрузка задних конечностей без предварительной обработки β -GPA привела к статистически значимому ($p < 0.05$) снижению фосфорилирования AMPK (Thr172) на 40% и ACC (Ser79) на 34% (рис. 1), 4E-BP1 (Thr37/46) на 40% (рис. 2б), АКТ (Ser473) на 70% и FOXO3 (Ser253) на 64% (рис. 3) и одновременно увеличению фосфорилирования p70S6K (Thr389) (рис. 2а) на 179%, а также к усилению экспрессии мРНК MuRF-1 и MAFbx в 1.5 и 2 раза, соответственно, (рис. 4) по сравнению с виварным контролем. Однако в группе с 1-суточной функциональной разгрузкой и предварительной обработкой β -GPA не наблюдалось снижение фосфорилирования AMPK, ACC (рис. 1) и 4E-BP1 (рис. 2б), а уровень фосфорилирования p70S6K вернулся к контрольным значениям (рис. 2а). При этом фосфорилирование АКТ и FOXO3 (рис. 3), а также уровень экспрессии MuRF-1 и

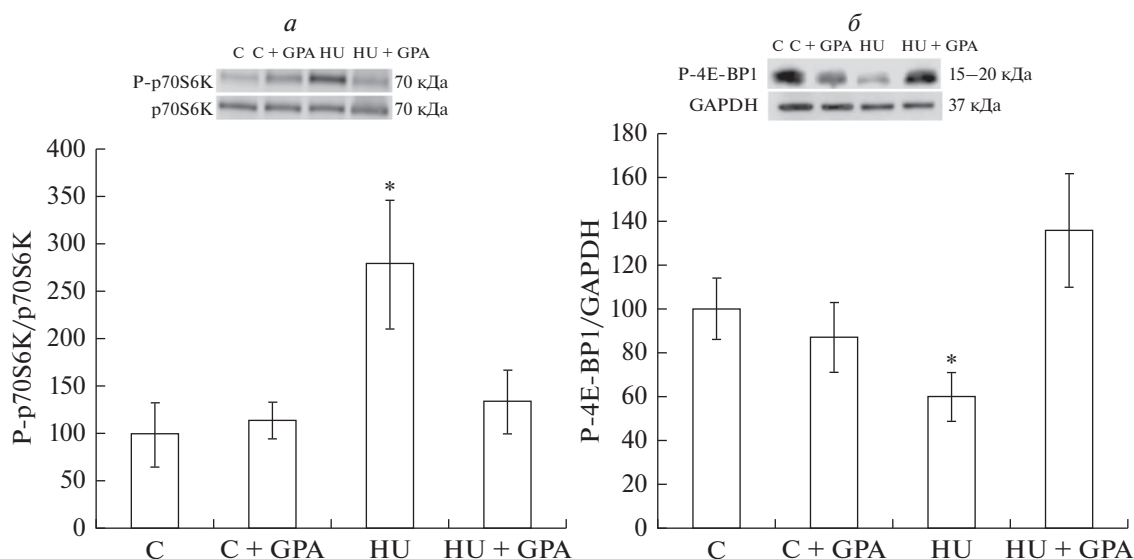


Рис. 2. Статус фосфорилирования p70S6K (Thr389) (а) и 4E-BP1 (Thr37/46) (б) в камбаловидной мышце крысы, % от контрольной группы (С). * – Статистически значимое отличие от контрольной группы (С).

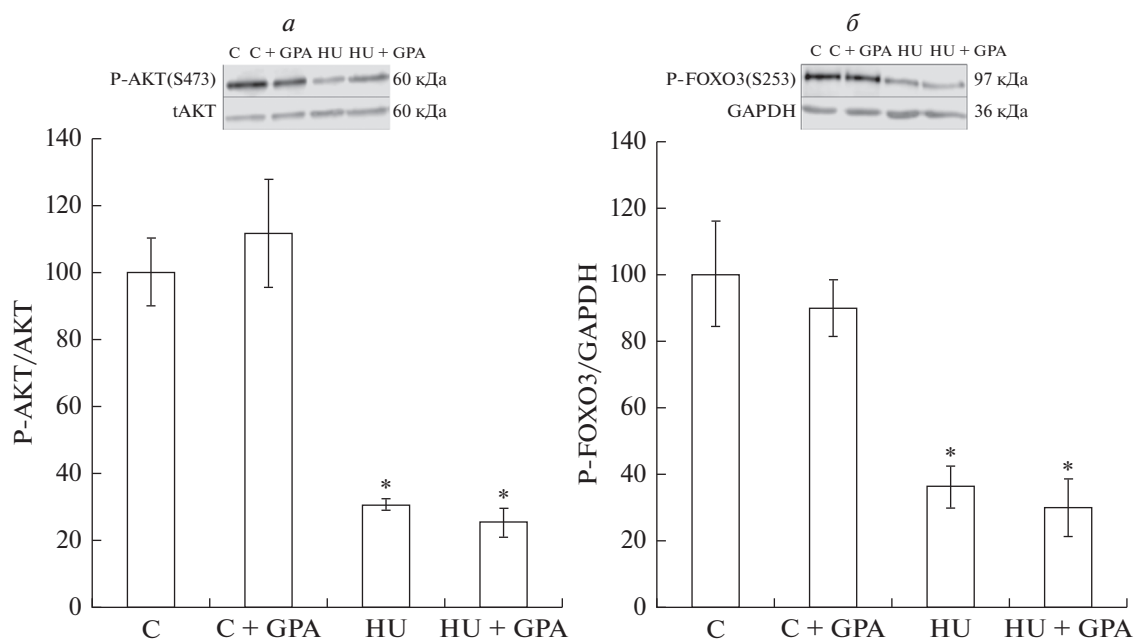


Рис. 3. Содержание фосфорилированных форм АКТ (Ser473) (а) и FOXO3 (Ser253) (б) в камбаловидной мышце крысы, % от контрольной группы (С). * – Статистически значимое отличие от контрольной группы (С).

MAFbx (рис. 4) в группе “HU + GPA” был таким же, как в группе “HU”.

Результаты определения статуса фосфорилирования AMPK, ACC, p70S6k и 4E-BP1 в *m. soleus* крысы на ранних стадиях функциональной разгрузки хорошо согласуются с ранее опубликованными данными, полученными как в нашей лаборатории [16, 17], так и другими авторами [18]. Снижение уровня фосфорилирования FOXO3 и увеличение экспрессии MuRF-1 и MAFbx после 1-суточного антиорто статического вывешивания также полностью соответствует ранее получен-

ным данным [19]. Ранее нами было показано, что предобработка крыс веществом AICAR (активатор АМРК) предотвращала снижение фосфорилирования АМРК в *m. soleus* после 24-часовой гравитационной разгрузки, при этом также предотвращалось увеличение фосфорилирования p70S6K [20]. Новизна полученных в данном исследовании результатов состоит в том, что впервые оценен эффект β -GPA на анаболические и катаболические маркеры в *m. soleus* крысы на раннем сроке функциональной разгрузки. При введении β -GPA Снижение содержания АТР и

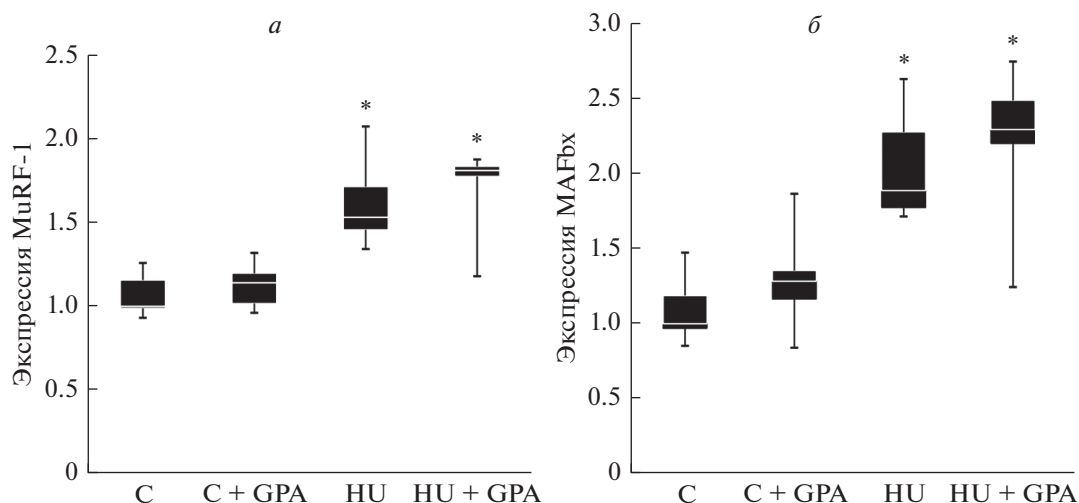


Рис. 4. Уровень экспрессии мРНК убиквитин-лигаз MuRF-1 (а) и MAFbx (б) в камбаловидной мышце крысы; отличие в число раз относительно контрольной группы (С). * – Статистически значимое отличие от контрольной группы (С).

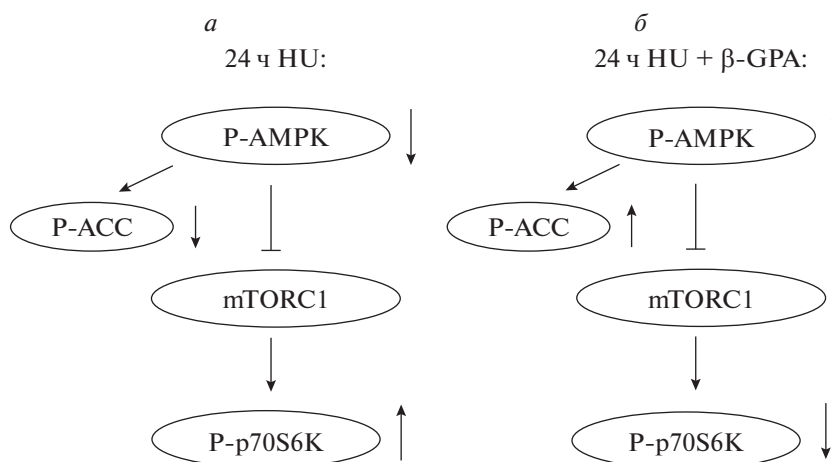


Рис. 5. Гипотетическая схема регуляции анаболического пути mTORC1/p70S6K посредством AMPK в *m. soleus* крысы в условиях 24-часовой функциональной разгрузки (а) и при введении животным β -GPA (б).

увеличение АМР могло привести к закономерному повышению активности АМРК на фоне функциональной разгрузки, что подтверждалось соответствующим увеличением содержания фосфорилированных форм основного субстрата АМРК – фермента АСС. Учитывая важную роль АСС в регуляции белкового метаболизма, логично предположить, что активация АМРК во время разгрузки под действием β -GPA могла способствовать предотвращению повышения фосфорилирования одного из маркеров активности протеинкиназы mTORC1 – белка p70S6K (рис. 5). Результаты определения экспрессии убиквитин-лигаз в группе “HU + GPA” полностью согласуются с ранее полученными в нашей лаборатории данными об уровне экспрессии MuRF-1 и MAFbx после введения соединения AICAR (активатор АМРК) с последующей функциональной разгрузкой в течение 24 ч (неопубликованные данные).

Таким образом, АМРК может играть важную роль в модуляции анаболического mTORC1-сиг-

налинга в камбаловидной мышце крысы на раннем этапе моделируемой микрогравитации.

Исследование поддержано грантом Российского научного фонда (проект № 17-75-20152).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Fitts R. H., Riley D. R., Widrick J. 2000. Physiology of a microgravity environment invited review: Microgravity and skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.* **89**, 823–839.
2. Ohira Y., Saito K., Wakatsuki T., Yasui W., Suetsugu T., Nakamura K., Tanaka H., Asakura T. 1994. Responses of beta-adrenoceptor in rat soleus to phosphorus compound levels and/or unloading. *Am. J. Physiol.* **266**, 1257–1262.
3. Wakatsuki T., Ohira Y., Yasui W., Nakamura K., Asakura T., Ohno H., Yamamoto M. 1994. Responses of contractile properties in rat soleus to high-energy phosphates and/or unloading. *Jpn. J. Physiol.* **44**, 193–204.
4. Hardie D.G. 2011. AMP-activated protein kinase: An energy sensor that regulates all aspects of cell function. *Genes Dev.* **25**, 1895–1908.

5. Carling D. 2017. AMPK signalling in health and disease. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **45**, 31–37.
6. Thomson D.M. 2018. The role of AMPK in the regulation of skeletal muscle size, hypertrophy, and regeneration. *Int. J. Mol. Sci.* **19** (10). pii: E3125. <https://doi.org/10.3390/ijms19103125>
7. Bodine S.C., Stitt T.N., Gonzalez M., Kline W.O., Stover G.L., Bauerlein R., Zlotchenko E., Scrimgeour A., Lawrence J.C., Glass D.J., Yancopoulos G.D. 2001. Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy *in vivo*. *Nat. Cell Biol.* **3**, 1014–1019.
8. Glass D.J. 2003. Signalling pathways that mediate skeletal muscle hypertrophy and atrophy. *Nat. Cell Biol.* **5**, 87–90.
9. Krawiec B.J., Nystrom G.J., Frost R.A., Jefferson L.S., Lang C.H. 2007. AMP-activated protein kinase agonists increase mRNA content of the muscle-specific ubiquitin ligases MAFbx and MuRF1 in C2C12 cells. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **292**, 1555–1567.
10. Nakashima K., Yakabe Y. 2007. AMPK activation stimulates myofibrillar protein degradation and expression of atrophy-related ubiquitin ligases by increasing FOXO transcription factors in C2C12 myotubes. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **71**, 1650–1656.
11. Mahanna D.A., Fitch C.D., Fischer V.W. 1980. Effects of beta-guanidinopropionic acid on murine skeletal muscle. *Exp. Neurol.* **68**, 114–121.
12. Oudman I., Clark J.F., Brewster L.M. 2013. The effect of the creatine analogue beta-guanidinopropionic acid on energy metabolism: a systematic review. *PLoS One.* **8**, e52879.
13. Williams D.B., Sutherland L.N., Bomhof M.R., Basaraba S.A.U., Thrush A.B., Dyck D.J., Field C.J., Wright D.C. 2009. Muscle-specific differences in the response of mitochondrial proteins to β -GPA feeding: An evaluation of potential mechanisms. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **296**, 1400–1408.
14. Zong H., Ren J.M., Young L.H., Pypaert M., Mu J., Birnbaum M.J., Shulman G.I. AMP kinase is required for mitochondrial biogenesis in skeletal muscle in response to chronic energy deprivation. 2002. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **99**, 15983–15987.
15. Morey-Holton E., Globus R. 2002. Hindlimb unloading rodent model: technical aspects. *J. Appl. Physiol.* **92**, 1367–1377.
16. Mirzoev T., Tyganov S., Vilchinskaya N., Lomonosova Y., Shenkman B. 2016. Key markers of mTORC1-dependent and mTORC1-Independent signaling pathways regulating protein synthesis in rat soleus muscle during early stages of hindlimb unloading. *Cell. Physiol. Biochem.* **39**, 1011–1020.
17. Vilchinskaya N.A., Mochalova E.P., Nemirovskaya T.L., Mirzoev T.M., Turtikova O.V., Shenkman B.S. 2017. Rapid decline in MyHC I (beta) mRNA expression in rat soleus during hindlimb unloading is associated with AMPK dephosphorylation. *J. Physiol.* **595**, 7123–7134.
18. Chibalin A.V., Benziane B., Zakyrganova G.F., Kravtsova V.V., Krivoi I.I. 2018. Early endplate remodeling and skeletal muscle signaling events following rat hindlimb suspension. *J. Cell. Physiol.* **233**, 6329–6336.
19. Mochalova E.P., Belova S.P., Shenkman B.S., Nemirovskaya T.L. 2018. The role of transcription factors FoxO3 and myogenin in the regulation of E3-ligases MuRF-1 and MAFbx expression in rat soleus at the early stage of disuse atrophy. *Biol. Membrany.* **35**, 443–447.
20. Vilchinskaya N.A., Mochalova E.P., Belova S.P., Shenkman B.S. 2016. Dephosphorylation of AMP-activated protein kinase in a postural muscle: a key signaling event on the first day of functional unloading. *Biophys.* **61**, 1019–1061.

Effect of β -GPA on the Anabolic and Catabolic Markers in Rat Soleus Muscle at the Initial Stage of Gravitational Unloading

N. A. Vilchinskaya¹, E. P. Mochalova¹, I. I. Paramonova¹, S. P. Belova¹,
T. M. Mirzoev^{1,*}, B. S. Shenkman¹

¹Institute of Biomedical Problems, Russian Academy of Sciences, Khoroshevskoe shosse 76A, Moscow, 123007 Russia

*e-mail: tmirzoev@yandex.ru

Molecular mechanisms initiating the development of atrophic changes in a mammalian postural muscle remain unclear. Since skeletal muscle inactivation can lead to changes in the balance of intramuscular high-energy phosphates, we suggested that AMP-activated protein kinase (AMPK) may play an important role in the regulation of anabolic and catabolic signaling pathways in postural muscle at the initial stage of mechanical unloading. Beta-guanidinopropionic acid (β -GPA) can act as a modulator of the balance of macroergic compounds, which can reduce the content of intracellular high-energy phosphates. The purpose of the study was to assess signaling pathways of protein synthesis and degradation in rat soleus muscle after preliminary treatment with β -GPA followed by 1-day hindlimb unloading. Male Wistar rats that were divided into the following groups: 1) vivarium control (C); 2) vivarium control + β -GPA (C+GPA); 3) 1-day hindlimb unloading (HU); 4) 1-day HU + β -GPA (HU+GPA). β -GPA was administered daily by intraperitoneal injections (400 mg/kg). The content of the key signaling proteins (AMPK, ACC, p70S6K, 4E-BP1, FOXO3) was determined by gel electrophoresis followed by immunoblotting. mRNA expression of ubiquitin ligases (MuRF-1 and MAFbx) was evaluated using real-time PCR. In the group with 1-day unloading and β -GPA pretreatment, a prevention of reduction in phosphorylation of AMPK, ACC and 4E-BP1 was observed, and the increased level of p70S6K phosphorylation returned to control values. The phosphorylation of AKT and FOXO3, as well as the expression level of MuRF-1 and MAFbx in the HU + GPA group did not differ from the HU group. To conclude, the AMPK activity may play an important role in the modulation of anabolic mTORC1-signaling in rat soleus muscle at the early stage of simulated microgravity.

Keywords: soleus muscle, gravitational unloading, β -GPA, AMPK, p70S6K, ubiquitin ligases