

Zuwendungsempfänger: Christian-Albrechts-Universität Kiel	Förderkennzeichen: FKZ0312838A
Vorhabenbezeichnung: Teilprojekt 6.2.2.7 Analyse der AMP-aktivierten Proteinkinase beim Schwein	
Laufzeit des Vorhabens: 01.04.2003-31.03.2005	
Berichtszeitraum: 01.04.2003-31.03.2005	

I.

1. Aufgabenstellung

Das Netzwerk Nahrungsfette und Stoffwechsel (Genvariabilität, -regulation, -funktion und funktionelle Lebensmittelinhaltsstoffe) befasst sich mit den Zusammenhängen zwischen Fettzufuhr, Fettverdauung, Fettstoffwechsel und dem Metabolischen Syndrom. Das Metabolische Syndrom wird dabei nicht nur durch Ernährungsfaktoren, sondern auch wesentlich durch genetische, konstitutionelle Faktoren determiniert. Deshalb sollte die Variabilität, Regulation und Funktion der Gene untersucht werden, die eine Rolle in der Achse Ernährung-Verdauung-Stoffwechsel spielen.

Die AMP-aktivierte Proteinkinase spielt eine maßgebliche Rolle bei der Regulation des Muskelstoffwechsels und hat sich als ein interessantes Ziel bei der Therapie des metabolischen Syndroms herauskristallisiert. Die durch die Aktivierung des Enzyms hervorgerufenen Stoffwechseländerungen sind vorteilhaft für Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2. Ein Hauptcharakteristikum dieser Erkrankung ist die Insulinresistenz des Skelettmuskels. Die AMPK stimuliert einerseits über einen insulinunabhängigen Mechanismus die Glukoseaufnahme in den Muskel, andererseits verstärkt sie aber auch die Insulinsensitivität desselben. Da zur Zeit noch wenig über die molekularen Mechanismen der Aktivierung und Regulation der AMPK bekannt ist, sollten Hampshire Schweine unterschiedlicher Genotypen (RN^- / RN^- versus rn^+ / rn^+) als Modell dienen, tiefere Einblicke in die Regulation des Muskelstoffwechsels durch die AMPK zu gewinnen.

2. Voraussetzungen zur Durchführung des Vorhabens

Die im Rahmen des Projekts beantragte Postdoktoranden-Stelle konnte am 01.07.2003 besetzt werden.

3. Planung und Ablauf des Vorhabens

Die in der ersten Antragsphase für drei Jahre zugesagte Finanzierung der wissenschaftlichen Mitarbeiterstelle mußte aufgrund des späteren Beginn des Projektes nach einer Förderdauer von 2 Jahren für das letzte Jahr neu beantragt werden. Da eine weitere Finanzierung des Projekts nicht genehmigt wurde, konnte dieses nicht wie geplant zu Ende geführt werden. Aus dem gleichen Grund konnten die bereits gewonnenen DNA- und Gewebeproben der Schweine nicht abschließend analysiert werden.

4. Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde

Eine große Anzahl von Hampshire Schweinen weist eine dominante Mutation (*RN*-) auf, für die ein erhöhter Glykogengehalt der Muskelzelle kennzeichnend ist. In eigenen Vorarbeiten konnte gezeigt werden, dass die *RN*-Mutation in einer muskelspezifischen γ -Untereinheit der AMPK lokalisiert ist.

Zum Nachweis des molekularen Mechanismus der *RN*-Mutation der Hampshire-Schweine wurde die Translokation des Glukosetransporters GLUT4 mittels subzellulärer Membranfraktionierung nach der Methode von Tong et al. (2000) nachgewiesen.

5. Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Es fand ein Austausch der Ergebnisse mit dem Projekt 6.2.1.2 statt aufgrund der ähnlichen Ziele der Projekte und einer ähnlichen methodischen Ausrichtung.

II.

1. Aufzählung der wichtigsten wissenschaftlich-technischen Ergebnisse und anderer wesentlicher Ereignisse

Die dominante *RN*-Mutation bei Schweinen der Rasse Hampshire in *PRKAG3* ist assoziiert mit einem erhöhten Glykogengehalt in der Skelettmuskulatur. Diese Mutation in der muskelspezifischen Isoform der AMPK γ 3 führt unserer Hypothese nach zu einer konstitutiven Aktivierung des Holoenzym AMPK.

Der Verlust der AMP-Abhängigkeit könnte zu einer vermehrten Translokation des Glukosetransporters GLUT4 aus intrazellulären Speichern zur Plasmamembran der Skelettmuskelzellen führen, wodurch sich der erhöhte Glykogengehalt erklären ließe.

Skelettmuskulatur von Hampshire Schweinen der Genotypen *RN/RN* und *rn⁺/rn⁺* wurde direkt nach der Schlachtung entnommen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Zur Trennung von intrazellulären Membranen und Plasmamembranen wurde eine Dichtegradientenzentrifugation durchgeführt. Nach Bestimmung des Gesamtproteingehalts mit der BCA-Methode wurden jeweils 50 μ g jeder Membranfraktion auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und der GLUT4 Gehalt im Western Blot analysiert. Zur Überprüfung der Reinheit der Membranfraktionen diente ein Western Blot mit einem Antikörper gegen die Na⁺/K⁺-ATPase α 1, einem Marker für Plasmamembranen.

Mittels der subzellulären Membranfraktionierung und anschließendem GLUT4 Western Blot konnte gezeigt werden, dass bei Hampshire Schweinen des Genotyps *RN/RN* mehr GLUT4 in der Plasmamembran vorliegt verglichen mit Schweinen des Genotyps *rn⁺/rn⁺*.

Die verschiedenen Isoformen der AMPK beim Schwein wurden, soweit nicht bekannt, durch Screening einer PAC-Bank und mittels RH-Kartierung auf SSC5 (AMPK γ 1) und auf SSC18 (AMPK γ 2) kartiert.

Schutzrechtsanmeldungen sind bis zu diesem Projektzeitpunkt noch nicht erfolgt. Die wirtschaftlichen, wissenschaftlichen und/oder technischen Erfolgsaussichten haben sich gegenüber Projektbeginn nicht geändert.