

Aus der Medizinischen Klinik mit  
Schwerpunkt Nephrologie und internistische Intensivmedizin  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Das lebensverlängernde Gen *INDY*  
kodiert für einen Austauscher für Zwischenprodukte des Krebs-Zyklus

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Carsten Teichert

aus Koblenz

Datum der Promotion: 09.09.2016



# Inhaltsverzeichnis

---

<b>I. Zusammenfassung</b> .....	<b>5</b>
<b>II. Abstract</b> .....	<b>7</b>
<b>III. Abbildungsnachweis</b> .....	<b>8</b>
<b>IV. Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>10</b>
<b>1. Einleitung</b> .....	<b>12</b>
1.1. Kalorienrestriktion.....	13
1.2. Die Entdeckung sogenannter „Alterungsgene“ .....	15
1.2.1. Reduzierung der Genfunktion durch Mutationen.....	15
1.2.1.1 FOXO3.....	16
1.2.1.2 <i>Chico</i> Gen in <i>Drosophila melanogaster</i> .....	17
1.2.1.3 <i>INDY</i> Gen.....	18
1.2.2. Erhöhung der Genfunktion (Überexpression).....	22
1.2.2.1 Cu,Zn-Superoxid Dismutase (SOD) .....	22
1.2.2.2 Hitzeschockprotein 70 (Hsp70).....	22
1.2.2.3 Katalase .....	23
1.3. Fragestellung der Arbeit.....	24
<b>2. Material und Methoden</b> .....	<b>25</b>
2.1. Der südafrikanische Krallenfrosch <i>Xenopus laevis</i> .....	25
2.1.1. Charakterisierung von Membranproteinen in Verwendung von <i>Xenopus laevis</i> .....	26
2.1.2. Haltung von <i>Xenopus laevis</i> .....	27
2.1.3. Gewinnung der Oozyten von <i>Xenopus laevis</i> .....	28
2.1.4. Entnahme der Oozyten, der operative Eingriff .....	28
2.1.5. Isolierung und Präparation der Oozyten.....	30
2.1.6. Versuchslösungen .....	32
2.2. Präparation der <i>INDY</i> mRNA .....	34
2.3. Uptake- versus Efflux-Technik .....	35
2.4. Statistik.....	36
<b>3. Ergebnisse</b> .....	<b>37</b>
3.1. Wirkung externer Zwischenmetabolite des Krebs-Zyklus auf den [ <sup>14</sup> C]-Citrat-Efflux .....	37
3.2. Wirkung externer Zwischenmetabolite des Krebs-Zyklus auf den [ <sup>14</sup> C]-Succinat-Efflux ..	38

3.3.	Wirkung interner Zwischenmetabolite des Krebs-Zyklus auf den [ <sup>14</sup> C]-Succinat-Uptake.	40
3.4.	Effekt des pH-Wertes auf den Succinat- und Citrat-medierten [ <sup>14</sup> C]-Citrat-Efflux	41
3.5.	Km-Werte / Bindungskapazität und Reaktionsgeschwindigkeiten	42
3.5.1.	Bindungskapazität und Reaktionsgeschwindigkeit von Citrat	43
3.5.2.	Bindungskapazität und Reaktionsgeschwindigkeit von alpha-Ketoglutarat	44
3.5.3.	Bindungskapazität und Reaktionsgeschwindigkeit von Succinat	46
3.5.4.	Bindungskapazität und Reaktionsgeschwindigkeit von Fumarat	48
3.5.5.	Bindungskapazität und Reaktionsgeschwindigkeit von Oxalacetat	50
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>52</b>
4.1.	Lebensverlängernde Kalorienreduktion	52
4.2.	INDY-vermittelter Efflux	53
4.3.	INDY transportiert Dicarboxylate unterschiedlicher Kettenlänge	54
4.4.	Selektive Hemmung des Citrat- und Succinat-Effluxes	55
4.5.	Elektroneutralität des Anionenaustauschers INDY	56
4.6.	Keine Unterschiede in der Umsatzgeschwindigkeit	56
4.7.	Methodische Limitationen der Arbeit	57
4.8.	INDY: mögliches therapeutisches Ziel für die Behandlung von Diabetes Typ II und Adipositas	59
<b>V.</b>	<b>Literatur</b>	<b>61</b>
<b>VI.</b>	<b>Eidesstattliche Versicherung</b>	<b>67</b>
<b>VII.</b>	<b>Anteilerklärung an etwaigen erfolgten Publikationen</b>	<b>68</b>
<b>VIII.</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>69</b>
<b>IX.</b>	<b>Publikationsliste</b>	<b>73</b>
<b>X.</b>	<b>Danksagung</b>	<b>74</b>

## I. Zusammenfassung

---

In der hier vorliegenden Arbeit wurde die Funktionsweise des von INDY vermittelten Membrantransports genauer untersucht. Zu diesem Zweck wurden Oozyten von *Xenopus laevis* als Versuchsobjekt verwendet. In die präparierten Oozyten wurde mittels Mikroinjektion cRNA des Gens *INDY* übertragen, um das INDY Protein in den Oozyten zu exprimieren. Anschließend wurden [<sup>14</sup>C]-Citrat oder [<sup>14</sup>C]-Succinat in die Oozyten injiziert, um sowohl den durch INDY-vermittelte [<sup>14</sup>C]-Citrat-Efflux als auch der [<sup>14</sup>C]-Succinat-Efflux im Austausch mit definierten Zwischenmetaboliten des Krebs-Zyklus zu messen, die der Badlösung zugegeben wurden. In den Versuchsreihen erwies sich INDY als DIDS-sensitiver Transporter, der kationenunabhängig war. Während der Succinat-Efflux sich in den hier gezeigten Versuchen als pH-unabhängig zeigte, war der Citrat-Efflux pH-abhängig, mit einer Steigerung des Effluxes von pH-Wert 6,0 über pH 7,5. INDY transportiert, wie die Ergebnisse nahe legen, Zwischenmetabolite unterschiedlicher Kettenlänge über die Zellmembran, also sowohl Dicarboxylate als auch Tricarboxylate. Aus den hier vorliegenden Ergebnissen kann gefolgert werden, dass INDY als Austauscher von dicarboxylischen und tricarboxylischen Zwischenprodukten des Krebs-Zyklus fungiert. Obwohl der endgültige Beweis aussteht, kann vermutet werden, dass INDY energiearme Metabolite mit einer höheren Kapazität als energiereichere bindet und mit einer höheren Geschwindigkeit über die Zellmembran transportiert. Es kann auch gefolgert werden, dass die Wirkung abnehmender INDY Aktivität, wie sie in den langlebigen *INDY*-Mutanten stattfindet, möglicherweise den Energiestoffwechsel vergleichbar der Kalorienrestriktion, ändert, welche eine Verlängerung der Lebensspanne begünstigt. Die lebensverlängernde und zugleich krankheitsvorbeugende Wirkung entsteht durch die Beteiligung der Alterungsgene wie INDY, die in einem Zusammenhang mit den Alterungsprozessen stehen. Da die Zwischenmetabolite des Krebs-Zyklus Vorstufen der Lipidgenese sind, steht der hier gezeigte Transportmechanismus in Zusammenhang mit der möglichen Entstehung von Adipositas und Diabetes Typ II. Eine Beeinflussung bzw. Herunterregulation der Aktivität von INDY könnte insbesondere der Entstehung dieser Stoffwechselerkrankungen entgegenwirken. INDY hat Ähnlichkeiten mit kürzlich entdeckten Natrium-Dicarboxylat-Kotransportern (z.B. *SLC13A5*), die in der Niere vorkommen (1-3). Dicarboxylat-Kotransporter sind Membranproteine, die im Krebs-

Zyklus, einem der wichtigsten Stoffwechselwege eukaryotischer Zellen, bei Säugetieren für Aufnahme und Wiederaufnahme von Di- und Tricarbonensäuren verantwortlich sind (2).

## II. Abstract

---

In the presented work, the function of the INDY-mediated transport across the plasma membrane was examined more closely. For this purpose, oocytes of *Xenopus laevis* were used as test objects. In the prepared oocytes cRNA of the gene *INDY* were transferred by microinjection to express the INDY protein in these oocytes. Then [<sup>14</sup>C]-citrate or [<sup>14</sup>C]-succinate were injected into these oocytes to test both the INDY-mediated [<sup>14</sup>C]-citrate-efflux and the [<sup>14</sup>C]-succinate-efflux in exchange with defined Krebs-cycle intermediates, which were added to the external medium.

In the experiments, INDY proved itself as a DIDS-sensitive cation-independent transporter. While succinat-efflux was shown to be pH-independent, citrate-efflux was pH-dependent with an increased efflux from pH 6,0 to pH 7,5. INDY mediates metabolites of different chain lengths across the plasma membrane, both Dicarboxylates and Tricarboxylates.

From the findings, it can be concluded that INDY functions as an exchanger of dicarboxylic and tricarboxylic Krebs-cycle intermediates.

Even though definitive proof is pending, it can already be deduced that INDY binds low-energy metabolites with a higher capacity as high-energy metabolites and transports them faster across the plasma membrane. It can also be concluded that the effect of decreasing INDY activity, which takes place in long-lived *INDY*-mutants, possibly changes energy metabolism in relation to caloric restriction which promotes an extension of lifespan.

The simultaneous life extending and disease preventing activity results from the participation of senescence genes as *INDY*, in conjunction with the ageing processes. Because Krebs-cycle intermediates are pre-stages of the lipid genesis, the transport mechanism shown here is connected to the development of Adipositas and type II diabetes.

An influence with respect to downregulation of the activity of *INDY* could specifically counteract the development of these metabolic diseases. INDY has similarities to recently discovered sodium-dicarboxylate co-transporters (e.g. *SLC13A5*) existing in the kidney (1-3). Dicarboxylate co-transporters are membrane proteins which are responsible for uptake and reuptake of di- and tricarboxylic acids in the Krebs-cycle, one of the most important metabolic pathways of eukaryotic cells in mammals (2).

### III. Abbildungsverzeichnis

---

<b>Abbildung 1:</b>	<b>19</b>
<i>Darstellung der Lebensdauer von Indy-Mutanten und Kontrollgruppe bzw. Revertanten von <i>Drosophila melanogaster</i></i>	
<b>Abbildung 2:</b>	<b>21</b>
<i>Lokalisation des INDY Proteins durch die whole-mount X-Gal Färbemethode in Oenozyten und Darm reifer Fruchtfliegen</i>	
<b>Abbildung 3:</b>	<b>29</b>
<i>Operativer Eingriff bei einem adulten <i>Xenopus laevis</i> Weibchen zur Entnahme der Oozyten</i>	
<b>Abbildung 4:</b>	<b>31</b>
<i>Manuelle Zerteilung der läppchenweise entnommenen Oozyten mit Hilfe feiner Pinzetten in kleine Einheiten von 5-10 Oozyten</i>	
<b>Abbildung 5:</b>	<b>32</b>
<i>Reifestadien der Oogenese von Oozyten nach Dumont</i>	
<b>Abbildung 6:</b>	<b>37</b>
<i>Effekte externer Zwischenmetaboliten des Krebs-Zyklus auf den [<sup>14</sup>C]-Citrat-Efflux in INDY-exprimierenden <i>Xenopus</i> Oozyten</i>	
<b>Abbildung 7:</b>	<b>39</b>
<i>Wirkung externer Zwischenmetabolite des Krebs-Zyklus auf den [<sup>14</sup>C]-Succinat-Efflux in INDY-exprimierenden <i>Xenopus</i> Oozyten</i>	
<b>Abbildung 8:</b>	<b>40</b>
<i>Effekte interner Substrate auf den [<sup>14</sup>C]-Succinat-Uptake in INDY-exprimierenden <i>Xenopus</i> Oozyten</i>	
<b>Abbildung 9:</b>	<b>41</b>
<i>Effekt von externem pH auf den Citrat versus Succinat stimulierten [<sup>14</sup>C]-Citrate-Efflux von INDY-exprimierenden <i>Xenopus</i> Oozyten</i>	

- Abbildung 10:** **43/44**  
*Darstellung des gemessenen [<sup>14</sup>C]-Succinat-Uptakes in Abhängigkeit von der im Außenmedium angebotenen Citrat-Konzentration (cpm / mol / Lineweaver-Burk-Plot)*
- Abbildung 11:** **45/46**  
*Darstellung des gemessenen [<sup>14</sup>C]-Succinat-Uptakes in Abhängigkeit von der im Außenmedium angebotenen alpha-Ketoglutarat-Konzentration (cpm / mol / Lineweaver-Burk-Plot)*
- Abbildung 12:** **46/47**  
*Darstellung des gemessenen [<sup>14</sup>C]-Succinat-Uptakes in Abhängigkeit von der im Außenmedium angebotenen Succinat-Konzentration (cpm / mol / Lineweaver-Burk-Plot)*
- Abbildung 13:** **48/49**  
*Darstellung der gemessenen [<sup>14</sup>C]-Succinat-Uptakes in Abhängigkeit von der im Außenmedium angebotenen Fumarat-Konzentration (cpm / mol / Lineweaver-Burk-Plot)*
- Abbildung 14:** **50/51**  
*Darstellung des gemessenen [<sup>14</sup>C]-Succinat-Uptakes in Abhängigkeit von der im Außenmedium angebotenen Oxalacetat-Konzentration (cpm / mol / Lineweaver-Burk-Plot)*

## IV. Abkürzungsverzeichnis

---

ATP	Adenosintri-phosphat
ADP	Adenosindi-phosphat
BamHI	Restriktionsenzym aus <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
Ca	Calcium
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
Cpm	counts per minute
CR	caloric restriction
cRNA	komplementäre Ribonukleinsäure
Cu	Kupfer
cm	Zentimeter
DIDS	4,4'-Diisothiocyano-2,2'-Stilbenedisulfonsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
et al.	und andere
G	Gramm
H	Stunde
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperaziny)-ethansulfonsäure
HRF	HEPES-Ringer Frosch
HSP	Hitzeschockprotein
<i>INDY</i>	Im not dead yet
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KHP	Kernhüllenpuffer
K <sub>m</sub>	Michaelis-Menten-Konstante
KOH	Kaliumhydroxid
L	Liter
M	Mol
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
mg	Milligramm
mM	Millimol
mm	Millimeter

ml	Milliliter
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
mV	Millivolt
Na	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
NAD	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NaOH	Natriumhydroxid
ng	Nanogramm
nl	Nanoliter
N.S.	statistisch nicht signifikant
PAH	Para-aminohippurat
PCR	Polymerasekettenreaktion
pH	potentia hydrogenii
pmol	Picomol
PVP	Polyvinylpyrrolidon
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
SEM	Standardfehler des Mittelwerts
SOD	Superoxid-Dismutase
u.a.	unter anderem
V	Volt
V <sub>max</sub>	Maximale Reaktionsgeschwindigkeit
Zn	Zink
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
u.a.	unter anderem
%	Prozent
°C	Grad Celsius

## 1. Einleitung

---

„Altern ist schon eine Zumutung“, äußerte Lorient, alias Vicco von Bülow, kurz vor seinem 80. Geburtstag in einem Interview im Magazin der Süddeutschen Zeitung (4). Und damit steht er nicht alleine da. Seit jeher ist es ein Traum der Menschheit, das Altern hinauszuzögern oder im Idealfall gesund und vital in die Jahre zu kommen. Bisher ist dies allerdings noch Zukunftsmusik, denn für eine einfache Lösung ist der Prozess des Alterns zu komplex und ein Ergebnis mit vielen unterschiedlichen Beteiligten. Genetische (5, 6) und umweltspezifische Einflüsse (7) scheinen hierbei von immenser Bedeutung zu sein. Das spezifische Körpergewicht (8) sowie der Gehalt an Körperfett (9) spielen beim Alterungsprozess möglicherweise ebenso eine Rolle wie Signalwege, die durch Hormone und Wachstumsfaktoren vermittelt werden (9, 10).

Zur Untersuchung von Alterungsprozessen haben sich in der Wissenschaft vor allem kurzlebige Organismen als sehr geeignet erwiesen. Hierzu gehören neben Hefen der Fadenwurm (Nematode) *Caenorhabditis elegans* und die Taufliege *Drosophila melanogaster*. Neben dem großen Vorteil der Kurzlebigkeit, die den Untersuchungszeitraum überschaubar und kostengünstig hält, zeichnen sich Fadenwurm und Taufliege durch weitere Eigenschaften aus, die sie zu einem prädestinierten Forschungsobjekt in der Erforschung von Alterungsprozessen machen. Hierzu zählt neben der hohen Fruchtbarkeit, der kurzen Generationszeit und der Einfachheit der Kultivierung, auch die Verfügbarkeit von hoch entwickelten Methoden der gentechnischen Untersuchung (11). Aufgrund der Tatsache, dass Hefen, Würmer, Fliegen, Mäuse und Menschen sehr viele grundlegende molekulare Eigenschaften teilen, können Erkenntnisse, die an einem dieser Forschungsobjekte gewonnen werden, wertvolle Informationen für alle anderen Organismen liefern, obwohl es sich doch um so unterschiedliche Organismen handelt (12).

Anfang der achtziger Jahre des vergangenen Jahrhunderts gelang es Wissenschaftlern um Michael Rose von der Universität von Kalifornien in Irvine, mittels Selektion langlebige Fruchtfliegen zu züchten (13). Durch die wiederholte Vernichtung der Eier von Fliegen, die in niedrigem Alter gebrütet hatten, wurden diejenigen selektiert, die erst in fortgeschrittenem Alter brüteten. Über eine Dauer von einhundert Generationen

konnte die Lebensspanne von *Drosophila* auf diese Weise mehr als verdoppelt werden. Die langlebigen Fliegen erwiesen sich als gesund und stark genug, um sich auch in hohem Alter noch fortzupflanzen (13). Viele der langlebigen Exemplare waren außerdem in der Lage Hitze, Hunger und Stress besser zu tolerieren als die ursprünglichen Taufiegen (13).

Diese Experimente gaben einen deutlichen Hinweis darauf, dass der Prozess des Alterns, zumindest teilweise, unter der Kontrolle bestimmter Gene stehen muss. Für die Alterungsforschung eröffneten sich somit neue Möglichkeiten. Mithilfe der genetischen Analyse wurde es möglich, Gene aufzuspüren, die die Lebenszeit eines einzelnen Lebewesens beeinflussen und diese Erkenntnisse in das ungelöste Rätsel um den Alterungsvorgang einzupassen. Einzelne Gene konnten nun als Mitwirkende im Alterungsprozess identifiziert und deren Genprodukte charakterisiert werden (14), was die Vision näher brachte, bald Medikamente entwickeln zu können, die den Alterungsprozess verlangsamen könnten.

Roses Experimente brachten aber einen entscheidenden Nachteil mit sich. Durch die wiederholte Auswahl der langlebigen Fliegen veränderte er die genetische Vielfalt der Tiere so entscheidend, dass es nicht mehr möglich war, zwischen den Genen zu unterscheiden, die für eine Lebensverlängerung verantwortlich zeichneten und denen, die durch die Züchtung selektiert wurden.

## **1.1. Kalorienrestriktion**

Unter dem Begriff Kalorienrestriktion (caloric restriction CR) versteht man die Praktik, die diätetische Energieaufnahme zu reduzieren, mit dem Ziel die Gesundheit zu verbessern und das Altern zu verlangsamen (15). Die Energieaufnahme wird minimiert, im Gegensatz zum Fasten oder Hungern jedoch ohne auf die notwendige Zufuhr von Vitaminen, Mineralien und anderen wichtigen Nährstoffen zu verzichten. Kalorienrestriktion bleibt bis heute die einzige bekannte Möglichkeit, das Leben von Säugetieren reproduzierbar und sicher zu verlängern, auch wenn sich Anzeichen verdichten, dass durch die Reduzierung einzelner Nährstoffe ein ähnlicher Effekt erlangt werden kann (16).

Schon zu Beginn des vergangenen Jahrhunderts, genauer gesagt 1917, berichteten Osborne und Mitarbeiter (17) im Science Magazine von Beobachtungen an Ratten, die darauf hinwiesen, dass durch eine Reduzierung der Futtermenge das Wachstum der Tiere verlangsamt und deren Lebensspanne verlängert werden konnte. Einige Jahre später, in den dreißiger Jahren des zwanzigsten Jahrhunderts, veröffentlichten Clive McCay und Mary Crowell (18) von der Cornell University (Ithaca, NY USA) eine größere, qualitativ höherwertige Studie, die bei stark reduzierter Nahrungsaufnahme eine Lebensverlängerung bei Ratten zeigte. Die Tatsache, dass eine eingeschränkte Nahrungsaufnahme zu einer Verlängerung sowohl der maximalen, als auch der durchschnittlichen Lebensdauer führt, konnte seither in verschiedenen Mäuse- und Rattenstämmen und bei einer Vielzahl anderer Arten, einschließlich Hefen, wirbellosen Tieren, Fischen, Hamstern und Hunden beobachtet werden (19).

Zu der Schlussfolgerung, dass der lebensverlängernde Effekt ursächlich auf eine reduzierte Kalorienzufuhr und nicht auf das Fehlen eines bestimmten Nährstoffes zurückzuführen ist, kamen erstmalig McCay und Mitarbeiter 1939 (20). Bestätigung fanden ihre Ergebnisse in Studien von Iwasaki und Mitarbeiter 1988 und Masoro und Mitarbeiter 1989 (21, 22). Jedoch wurden in anderen Experimenten davon abweichende Feststellungen gemacht: Ratten, die bei einer isokalorischen Diät mit verschiedenen Mischungen an Nährstoffen (23, 24) oder einem reduzierten Proteingehalt (25) gefüttert wurden, zeigten ebenfalls eine Verlängerung ihrer Lebensspanne. Sogar die Reduzierung einer einzigen Aminosäure, namentlich Methionin, führte zur Verlängerung der Lebensdauer bei Ratten (26) und Mäusen (27). Dieser Sachverhalt zeigt, dass zumindest bei Nagetieren nicht immer und ausschließlich Kalorienrestriktion entscheidend für den lebensverlängernden Effekt zu sein scheint.

Weindruch und Walford (28) führten bezüglich des lebensverlängernden Effektes, hervorgerufen durch Kalorienreduktion, beispielhafte und viel zitierte Experimente mit einer Verlangsamung des Alterungsprozesses durch. Die der beobachteten Lebensverlängerung zugrundeliegenden biologischen Mechanismen sind noch nicht bekannt, obwohl es eine Vielzahl von Hypothesen gibt.

## 1.2. Die Entdeckung sogenannter „Alterungsgene“

Ungünstige Lebensbedingungen wie Nahrungsmangel bedeuten Stress für den gesamten Organismus und seine Zellen. Als Reaktion auf den Stress stellt sich der Körper vorübergehend ganz auf Überleben ein. Bleibt die Stressreaktion auf Stressoren langfristig aktiv, wirkt sich die Antwort der Organismen lebensverlängernd und zugleich krankheitsvorbeugend aus (29). Die Wirkung entsteht durch die Beteiligung sogenannter Alterungsgenen, die in einem Zusammenhang mit den Alterungsprozessen stehen. Dies trifft bei so unterschiedlichen Lebewesen wie der Bäckerhefe, dem Fadenwurm, der Taufliege oder der Maus zu (30, 31).

In der neueren Zeit ermöglichen die modernen Methoden der Molekularbiologie (14), einzelne Gene durch Mutationen gezielt auszuschalten oder ihre Funktion durch Überexpression gezielt anzukurbeln. Dies bietet die Möglichkeit, den Einfluss einzelner Gene, beziehungsweise ihrer Genprodukte, auf den Alterungsprozess untersuchen zu können.

### 1.2.1. Reduzierung der Genfunktion durch Mutationen

Erste Mutationen, die zu einer Verlängerung der Lebenszeit in einem Organismus führten, konnten im Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) entdeckt werden. Im Jahr 1983 gelang es Michael Klass, acht mutierte, langlebige Stämme zu isolieren, die jeweils verschiedene sichtbare Defekte aufwiesen, welche seiner Meinung nach verantwortlich für den auftretenden lebensverlängernden Effekt zeichneten (32).

Friedman und Johnson von der Universität von Kalifornien konzentrierten ihre Arbeit auf einen der von Michael Klass isolierten *C. elegans* Stämme. Die 1988 und 1990 publizierten Daten (33, 34) zeigten eine um 50 Prozent verlängerte mittlere Lebenserwartung und eine gar um 110 Prozent verlängerte maximale Lebenserwartung bei den untersuchten *age-1* Mutanten. Friedman und Johnson waren somit die Ersten, die zeigen konnten, dass durch die Mutation eines einzelnen Gens und die daraus resultierende verminderte Expression desselben, die Lebensverlängerung eines gesamten Organismus möglich war. Allerdings war auch in diesem Fall ein negativer

Effekt auffällig. Die Fortpflanzungsleistung von *C. elegans* war signifikant reduziert. Anfang der neunziger Jahre des letzten Jahrhunderts wurde eine weitere Mutation im Fadenwurm entdeckt (35). Dieses *daf-2* genannte, mutierte Gen verdoppelte die Lebensspanne von *C. elegans*, ohne sich negativ auf Fruchtbarkeit oder Aktivität des Wurms auszuwirken.

Erste Rückschlüsse auf die Funktionsweisen beider Gene konnten einige Jahre später mit der Entschlüsselung ihrer Genprodukte gezogen werden. Wissenschaftler um Jason Morris fanden heraus, dass das *age-1* Gen ein Protein kodiert, das mit der von Säugetieren bekannten Phosphatidyl-3-Kinase verwandt ist (36). Das *daf-2* Gen wiederum kodiert nach den Ergebnissen der Arbeitsgruppe um Kitoura Kimura (37) ein Protein, das Verwandtschaft mit einem bei Säugern bekannten Rezeptorprotein aus der Familie der Insulinrezeptoren aufweist. Diese neuen Erkenntnisse wiesen auf eine mögliche Beteiligung des Insulinsignalwegs hin. Seine Herunterregulation scheint einen lebensverlängernden Effekt im Fadenwurm zu bewirken.

#### **1.2.1.1. FOXO3**

Bei dem in populärwissenschaftlichen Veröffentlichungen häufig Methusalemgen genannten Genabschnitt (38) handelt es sich um eine Gensequenz, die für einen Transkriptionsfaktor kodiert (39). Der Transkriptionsfaktor FOXO3 (Forkhead-Box-Protein) gehört einer Proteinfamilie an, von der bis heute 100 Mitglieder bei Säugern bekannt und beschrieben sind (39). Das erste Protein wurde von Detlef Weigel und Herbert Jäckle in *Drosophila* nachgewiesen. Beim Menschen sind neben FOXO3 noch FOXO1, FOXO4 und FOXO6 bekannt (39, 40). Der Proteinname Forkhead lehnt sich an die Ähnlichkeit einer Gabel an, die der Kopf von *Drosophila*embryonen ohne *forkhead* Gen entwickelt. Die Proteinfamilie der FOX-Proteine besitzt eine charakteristische monomere DNA-Bindedomäne, die evolutionär sehr alt ist und sich im Laufe der Evolution kaum verändert hat. Sie besteht aus rund 100 Aminosäuren, die ein Helix-Turn-Helix-Motiv aus drei Helices und zwei charakteristischen großen Schleifen bilden (40-42).

Die Transkriptionsfaktoren wandern in den Zellkern und binden dort über ihre DNA-Bindestelle an spezifische Gensequenzen, die sie gezielt aktivieren, sodass die dahinterliegenden Gene verstärkt transkribiert werden. Sie regulieren über diesen Vorgang Proliferation, Differenzierung und Zellebensdauer.

Menschen, die besonders alt werden, besitzen u.a. nach Untersuchungen der Forscher F. Flachsbar, A. Nebel und S. Schreiber aus Kiel häufiger einen speziellen Genotyp des *FOXO3*-Gens (43). Dieser *FOXO3*-Genotyp scheint einen erheblichen Einfluss auf die Lebenserwartung eines Menschen zu haben.

Der biologische Sinn, bei hohem Nahrungsangebot Signale zur Erhöhung der Zellteilungsaktivität und gleichzeitig zur Verkürzung der Lebensdauer zu erzeugen, sie bei restriktivem Angebot jedoch zu drosseln und damit die Lebensdauer zu verlängern, ist möglicherweise evolutionär begründet. Erhöhtes Nahrungsangebot provoziert ein schnelleres Wachstum und eine frühere Reproduktivität, während Nahrungsmangel zu einer längeren reproduktiven Lebenszeit führt (44, 45).

Allerdings kann *FOXO3* auch die Apoptose, den gerichteten Zelltod, über eine Sensitivierung verschiedener apoptotischer Signalwege anstoßen. Das prominenteste Zielgen stellt hier das für FasL (Fas-Ligand) kodierende dar (46). Die Überexpression von *FOXO*-Proteinen führt somit zu einer erhöhten Apoptoserate (47, 48).

#### **1.2.1.2. *Chico* Gen in *Drosophila melanogaster***

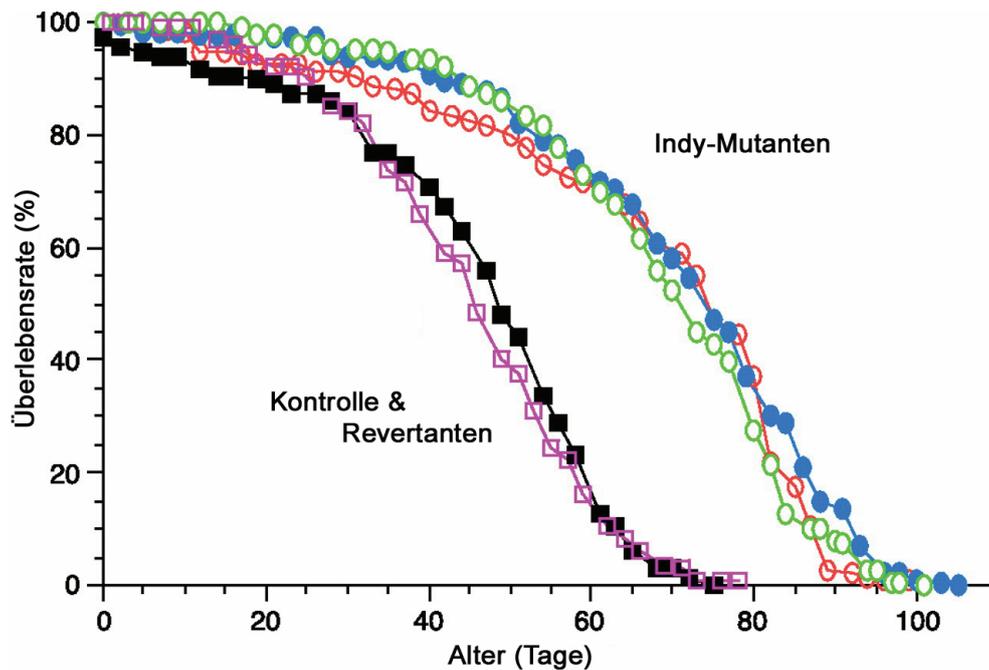
Auch Insulin spielt eine Rolle als Modulator der Langlebigkeit. Untersuchungen der Modellorganismen *C. elegans* und *Drosophila melanogaster* lieferten erste Hinweise auf einen Einfluss des Insulin-Signalweges auf die Lebenserwartung. Während im Fadenwurm *daf-2* Mutanten eine deutlich erhöhte Lebensdauer aufweisen, übernimmt bei der Fruchtfliege die *chico*-Mutante die Rolle (49). Die langlebige Mutante *chico* in *Drosophila* wirkt über eine andere Komponente des Insulinsignalwegs, das Insulin-Rezeptor-Substrat. Die Signalübertragung erfolgt wie bei Säugern durch Bindung des Insulinliganden an seinen Rezeptor (insulin-like receptor). Die Bindung löst eine Kaskade über das Insulin-Rezeptor-Substrat (*chico*), die Phosphatidylinositol-3-Kinase

(PIK3), die cytoplasmatische Serin/Threonin Kinase (Dakt) und den Transkriptionsfaktor FOXO aus. Der Insulinrezeptor scheint eine Rolle zu spielen bei Zellgröße, Zellzahl und Metabolismus. In homozygoten Exemplaren von *Drosophila melanogaster* beträgt sie bis zu 48%, bei Heterozygoten immerhin noch 36% wie die Forschergruppe um Linda Partridge vom University College in London in ihren Experimenten zeigen konnte (49). Die Signalwege sind stark konserviert, wie Vergleiche zwischen den Spezies zeigen (50) und lassen auf seine wichtige Bedeutung rückschließen. Über den Insulin-Signalweg wird die Menge des Nahrungsangebots an den Stoffwechsel vermittelt (51). Untersuchungen haben gezeigt, dass weniger die Gesamtkalorien der Nahrung, als vielmehr ihre Zusammensetzung, bei der durch Insulin regulierten Verlängerung der Lebensdauer eine entscheidende Rolle spielt (52).

### 1.2.1.3. **INDY Gen**

Im Jahr 2000 veröffentlichte die am Health Center in Farmington an der Universität von Connecticut in den USA forschende Arbeitsgruppe um B. Rogina und S.L. Helfand eine Studie im Magazin Science, in welcher sie die Mutation eines Gens in der Fruchtfliege und die daraus resultierenden Folgen beschrieben (1). Diese Studie bildet die Grundlage dieser Arbeit und wird unter diesem Punkt wiedergegeben. Durch Punktmutationen in einem einzelnen Gen konnte die durchschnittliche Lebensdauer der Fruchtfliege nahezu verdoppelt werden. Man gab dem Gen, in Anlehnung an eine Szene aus dem Film „Das Leben des Brian“ (The Life of Brian, 1979) der englischen Komikertruppe Monty Python (53), den Namen *INDY*. Der Name *INDY* steht als Abkürzung für I'm not dead yet (53).

Durch das Einfügen von P-Elementen an insgesamt 5 unterschiedlichen Positionen des *INDY*-Gens wurden 5 unabhängige Insertionsmutationen geschaffen (1). Alle führten zu signifikanten Anstiegen der durchschnittlichen Lebensdauer von *Drosophila*, wobei es bei drei der Mutationen (*INDY*<sup>206</sup>, *INDY*<sup>302</sup>, *INDY*<sup>159</sup>) sogar zu einer Verdopplung dieser Zeitspanne kam. Es konnte nicht nur eine Verdopplung der durchschnittlichen Lebensdauer von ~37 Tage auf ~70 Tage, sondern auch eine Erhöhung der maximalen Lebensdauer um 50 Prozent gezeigt werden, wie in Abbildung 1 dargestellt (1).



**Abbildung 1:**

Signifikanter Anstieg der durchschnittlichen Lebensdauer von *Drosophila melanogaster*. Drei Mutationen im *INDY* Gen (*INDY*<sup>206</sup> (blaue Kreise), *INDY*<sup>302</sup> (grüne Kreise), *INDY*<sup>159</sup> (rote Kreise)) verdoppelten die Lebensdauer von durchschnittlich 37 Tage auf durchschnittlich 70 Tage. Erhöhung der maximalen Lebensdauer um 50 Prozent. Kontrolle (schwarze Quadrate), Revertanten (lila Quadrate). (1)

Da jede Fruchtfliege über 2 Kopien des *INDY*-Gens verfügt, war man in der Lage, sowohl homozygote, als auch heterozygote Tiere zu züchten. Lediglich heterozygote Fliegen, bei denen nur eine Kopie des *INDY*-Gens verändert wurde, zeigten einen signifikanten Anstieg der Lebensdauer. Bei homozygoten Tieren fiel dieser Effekt aus. Diese Beobachtung ließ die Frage aufkommen, ob der lebensverlängernde Effekt möglicherweise nicht durch die Mutation des *INDY*-Gens selbst hervorgerufen wird, sondern durch unspezifische Mutationen, die sich im Zuchtverlauf ansammeln. Um diese Möglichkeit auszuschließen, kreuzte man das *INDY*-Gen dieses *Drosophila*-stammes mit verschiedenen anderen *Drosophila*-Stämmen.

Der Anstieg der durchschnittlichen Lebensdauer betrug, auch vor diesen unterschiedlichen genetischen Hintergründen, zwischen 40 und 80 Prozent. Nur bei einem bestimmten Stamm, der langlebigen Luckinbill-Linie, verlängerte sich die Lebensspanne nur um 15 Prozent (1, 54). Die Kreuzungsexperimente belegen, dass

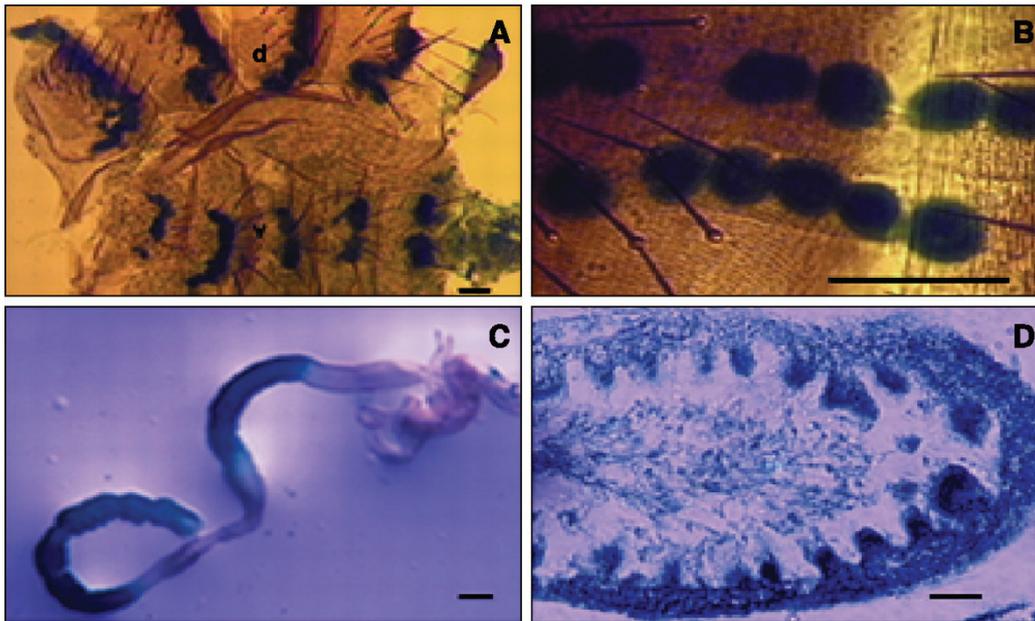
nicht unspezifische, sich zufällig angesammelte Mutationen für die Lebensverlängerung der Taufliege verantwortlich sind, sondern die spezifischen Mutationen im *INDY* Gen.

Obwohl von Fruchtfliegen bekannt ist, dass eine Abnahme der Fortpflanzungsfähigkeit (1, 55, 56) und eine Minderung der körperlicher Aktivität (1, 57) zu einer Verlängerung der Lebensdauer führen können, zeigten die heterozygoten *INDY*-Mutanten eine normale oder sogar eine stärker ausgeprägte Fortpflanzungsfähigkeit und Fruchtbarkeit als die Kontrollgruppe (1).

In frühen Lebensstadien zeigten die langlebigen heterozygoten *INDY*-Fliegen auch keinerlei Unterschiede in anderen Bereichen, wie Flugverhalten, Balzverhalten, Fütterungsverhalten oder negative Gravitaxis im Vergleich mit den Kontrollfliegen (1, 58, 59). In höherem Alter waren sie der Kontrollgruppe in physischen und motorischen Belangen sogar überlegen. Der lebensverlängernde Effekt, wie auch die zuvor erwähnten Eigenschaften, galten für weibliche wie männliche heterozygote *INDY*-Mutanten gleichermaßen (1). Heterozygot weibliche *INDY*-Fliegen zeigten noch ein weiteres erstaunliches Merkmal: Sie waren durchschnittlich 40 Prozent länger in der Lage, lebensfähigen Nachwuchs zu produzieren, als die Kontrollgruppe und dies ohne verzögertes Einsetzen ihrer Fruchtbarkeit (1). Zudem produzierten sie in diesem Zeitraum eine höhere Anzahl an Nachkommen. Im zeitlichen Verlauf der Entwicklung der Nachkommen zeigten sich keine Veränderungen, insbesondere Einschränkungen gegenüber den Kontroll-Fliegen (1).

### **Expression in *Drosophila***

Zur Lokalisation des Genproduktes des *INDY*-Gens, dem *INDY*-Protein, wurde die whole-mount X-Gal Färbemethode verwendet, bei der beta-Galaktosidase als so genanntes Reporter-Protein fungiert und in Zellkernen nachgewiesen werden kann (1, 60). Anhand dieser Färbemethode konnte die Expression von *INDY* in Fettkörper, Mitteldarm und Oenozysten reifer Fruchtfliegen nachgewiesen werden (1).



**Abbildung 2:**

*Darstellung der Lokalisation des INDY Proteins durch die whole-mount X-Gal Färbemethode. Oenozyten (A, B) und Darm (C, D) reifer Fruchtfliegen. Maßstabsbalken in (A) bis (C), 100 µm; in (D), 10 µm. (1)*

Der Fettkörper der Fruchtfliege ist vergleichbar mit der Leber von Wirbeltieren (1, 61, 62) und scheint mitverantwortlich für Verstoffwechselung und Speicherung von Fett, Glykogen und Protein zu sein. Mitteldarm und Oenozyten gelten in *Drosophila* als Orte der Nährstoffaufnahme, des intermediären Stoffwechsels und der Speicherung. Auch an Hinterdarm und Beinen, allesamt Bereiche der Glykogenspeicherung, konnte die Expression von INDY nachgewiesen werden (1, 62).

**Homologie**

Sequenzbasiert wurde nach bekannten Genen gesucht, die Sequenzähnlichkeiten ausweisen. Eine Recherche mit BLAST (basic local alignment search tool) ergab eine 34 prozentige Identität und 50 prozentige Ähnlichkeit von INDY mit eine 572 Aminosäuren langem, bereits bekannten, Protein (1). Bei dem Protein handelt es sich um einen Natrium-Dicarboxylat-Kotransporter, der bei Mensch und Ratte in der Niere vorkommt (1-3). Dicarboxylat-Kotransporter sind Membranproteine, die im Krebs-

Zyklus, einem der wichtigsten Stoffwechselwege eukaryotischer Zellen, bei Säugetieren für Aufnahme und Wiederaufnahme von Di- und Tricarbonsäuren verantwortlich sind (1-3). Di- und Tricarbonsäuren wie Succinat, Citrat und alpha-Ketoglutarat sind Zwischenprodukte des Krebs-Zyklus (1, 63). Man findet die Kotransporter bei Säugetieren in unterschiedlichen Geweben, vor allem in den Bürstensaumzellen von Dünndarm, Dickdarm und Plazenta (1, 64). Des Weiteren in der basolateralen Membran perivenöser Zellen der Leber und in den Epithelzellen des proximalen Tubulus der Niere und den Epithelzellen des Gehirns (1, 2).

## 1.2.2. Erhöhung der Genfunktion (Überexpression)

### 1.2.2.1. Cu,Zn-Superoxid-Dismutase (SOD)

Setzt man den Nematoden *C. elegans* Antioxidantien aus, verlängert sich seine Lebensspanne um 54%, ohne sich negativ auf Reproduktivität oder Körpergröße auszuwirken. Vermittelt wird dies durch die Cu,Zn-Superoxid-Dismutase (SOD) (65). Sie wandelt im eukaryotischen Cytoplasma die sehr reaktionsfreudigen Superoxid-Anionen, die Genom und Proteine durch Oxidation schädigen, in Wasserstoffperoxid um. SOD übernimmt somit Zellschutzfunktion und verhindert Oxidationsschäden der Zellen (65). Die Cu,Zn-Superoxid-Dismutase fehlt nur in einigen anaeroben Organismen, kommt aber ansonsten in allen Organismen vor (66). Bei Fruchtfliegen mit drei Kopien des SOD-Gens erhöht sich die Lebenserwartung wahrscheinlich aufgrund der geringeren Oxidationsschäden um 30 Prozent (67). Der Stoffwechsel und durch Oxidation hervorgerufene Schäden stehen in direktem Zusammenhang und so wirkt sich die Ernährung über die Zellschäden auf die Lebenserwartung der Organismen aus. Ein geringerer Stoffwechsel durch Nahrungsreduktion verringert die möglichen Zellschäden und beugt dem Altern vor (68).

### 1.2.2.2. Hitzeschockprotein 70 (Hsp70)

Hitzeschockproteine (Hsp) werden bei Temperaturerhöhung oder anderem zellulären Stress exprimiert. Sie spielen bei der Proteinfaltung eine Rolle und schützen Proteine vor Denaturierung und Aggregation (69). Ihre Einteilung erfolgt nach ihrem Molekulargewicht. Bekannt sind bislang: Hsp 60, 70, 90 (60, 70, 90 kDa) (69). Erstmals

wurden sie Anfang der 60er Jahre beobachtet und als Hitzeschockantwort beschrieben (70). Später zeigte sich, dass Zellen nicht nur auf den Stressor Hitze, sondern auch auf andere Stressoren mit einer Hitzeschockantwort reagieren (71). Andere Stressoren sind Alkohol, giftige Metalle und eine Reihe von Stoffwechselfgiften. Im Aufbau ähneln sich alle Hsp70-Hitzeschockproteine (72). Hitzeschockproteine wirken lebensverlängernd, indem sie, nach Stresssituationen induziert, einerseits Einfluss auf die Proteinfaltung ausüben und andererseits die Denaturierung der Proteine verhindern (73).

### **1.2.2.3. Katalase**

Die Hauptaufgabe der Katalase ist die Neutralisation des überschüssigen Zellgifts Wasserstoffperoxid zu Wasser und Sauerstoff (69). Sie hat somit antioxidative Wirkung, indem sie die Zelle vor oxidativen Schäden durch übermäßig vorhandene freie Radikale schützt.

Die Katalase, ein relativ großes Enzym, enthält vier Hämgruppen und jedes Katalase-Molekül ist in der Lage pro Sekunde Millionen von Sauerstoffperoxiden inaktivieren. (74).

Dass die Überexpression der antioxidativen Katalase nicht nur die reaktive Sauerstoffspezies reduziert, sondern auch lebensverlängernd wirkt, wurde durch Tierexperimente gezeigt (75). Nematoden mit Mutationen im *age-1* Gen zeigten eine Verdopplung ihrer Lebenszeit, charakterisiert durch erhöhte Enzymspiegel der antioxidativen Superoxid-Dismutase und Katalase (33).

### **1.3. Fragestellung der Arbeit**

In der vorliegenden Arbeit soll die Transportweise des von *INDY* kodierten Proteins *INDY* aufgeklärt werden. Es wird der Frage nachgegangen, ob *INDY* unterschiedliche Substrate des Krebs-Zyklus über die Zellmembran transportiert und von welchen Faktoren, pH-Wert, dieser Transport abhängig ist. Eine weitere zu untersuchende Fragestellung ist, den Zusammenhang zwischen *INDY* und  $K_m$  zu untersuchen. Ziel der Versuche ist es herauszufinden, ob organische Anionen, die von *INDY* transportiert werden, den [ $^{14}\text{C}$ ]-Citrat-Efflux über die Zellmembran stimulieren können.

## 2. Material und Methoden

---

### 2.1. Der südafrikanische Krallenfrosch *Xenopus laevis*

*Xenopus laevis*, der südafrikanische Krallenfrosch, gehört in der Klasse der Amphibien (Lurche), Unterklasse Lissamphibia, zur Ordnung der Anuren (Froschlurche). Die Anuren wiederum gliedern sich in 21 Familien und 3500 Arten. Sie kommen zwar weltweit vor, bevorzugt findet man sie jedoch in den Tropen. Die Befruchtung erfolgt außerhalb des Körpers in deren Folge es zur Eiablage kommt, sie sind somit ovipar (76).

*Xenopus laevis* zählt innerhalb der Anura zur Unterordnung Aglossa (zungenlose Formen), der Familie Pipidae und der Unterfamilie Xenopinae (77). Die Verbreitung der der Gattung *Xenopus* beschränkt sich auf Afrika (77). Von den sechs *Xenopus* Spezies findet nur *Xenopus laevis* als Labortier Verwendung. Bis in die 40er Jahre des 20 zigsten Jahrhunderts wurde *Xenopus laevis* von Apothekern experimentell zur Schwangerschaftstestung eingesetzt (78). Daher stammt auch sein umgangssprachlicher Name, Apothekerfrosch. Apotheker injizierten den Morgenurin einem jungen Krallenfroschweibchen. Laichten diese innerhalb von 48 Stunden, zeigte dies eine Schwangerschaft der Frau, durch das im Urin enthaltene Hormon HCG (Humanes Choriongonadotropin) nachgewiesen, an. Im Laufe der Zeit verlor der Krallenfrosch seine Bedeutung im Schwangerschaftsnachweis und hielt stattdessen Einzug in die Entwicklungsbiologie, wo er noch heute ein häufig verwendetes Tiermodell ist (79).

Auch in den Forschungslaboren klinischer Pharmakologen hat der Krallenfrosch in den letzten Jahren an Bedeutung gewonnen. Hier machen sich die Forscher die in den Hautzellen befindlichen Chromatophoren (80), die den Frosch in der Natur vor Fressfeinden tarnen sollen, als Biosensoren zu Nutze. Da die Zellen auf bestimmte Hormone mit einer Farbänderung reagieren, konnten sie beispielsweise so modifiziert werden, dass Rückstände von Opiaten in Blut- oder Urinproben nachgewiesen werden können (81). So könnte *Xenopus laevis* in Zukunft beim Aufspüren von Dopingsündern im Sport dienen oder bei der Suche nach chemischen Verbindungen für neue Medikamente helfen. Die häufigste und wohl bedeutendste Verwendung in der modernen Forschung finden aber die Oozyten von *Xenopus laevis*.

### 2.1.1. Charakterisierung von Membranproteinen in Verwendung von *Xenopus laevis*

Es ist eine lange Tradition, sich Amphibieneier als System zunutze zu machen. Mit ihrer Hilfe lässt sich die Funktion bestimmter Bestandteile, die man in die Eizelle injiziert hat, bestimmen. So nutzten Briggs und King (82) schon 1952 in ihren wegberreitenden Arbeiten die Eier des Leopardenfroschs *Rana pipiens* für ihre Studien über Kerntransplantationen. In den folgenden Jahren erfreute sich der südafrikanische Krallenfrosch (*Xenopus laevis*) einer wachsenden Beliebtheit (83, 84). Es stellte sich heraus, dass sich seine Oozyten wesentlich besser für biochemische Experimente, wie die Extraktion von Nukleinsäuren (85), eignen als die des Leopardenfrosches. Seine vollständig ausgewachsenen Oozyten verfügen in großem Maße über all die Bestandteile, die für die Proteinbiosynthese notwendig sind (86). Als erste beschrieben Gurdon und Mitarbeiter (87) im Jahre 1971, dass die Oozyte von *Xenopus laevis* exogene, injizierte mRNA in das entsprechende Protein translatiert. In den darauf folgenden Jahren diente die Mikroinjektion wirtsfremder RNA in die Oozyte zur Aufklärung verschiedenster Mechanismen, etwa der durch second-messenger vermittelten Neurotransmitterantworten und in den frühen 80er Jahren die Expression von funktionellen Neurotransmitterrezeptoren und Ionenkanälen in Oozyten (88, 89). Seither sind sie ein beliebtes wissenschaftliches Werkzeug, insbesondere für Untersuchungen an Membranproteinen, wie Transportern und Ionenkanälen. Eine detaillierte Beschreibung über den Nutzen von *Xenopus laevis* Oozyten für die Untersuchung an heterolog exprimierten Membranproteinen veröffentlichten Wagner und Mitarbeiter (90).

Nachdem elektrophysiologische Untersuchungen, wie die Patch-Clamp-Technik (91) und die Zwei-Elektroden-Voltage-Clamp-Technik (90) erfolgreich verwendet wurden, setzten sich in großem Ausmaß Untersuchungen durch, bei denen radioaktiv markierte Verbindungen genutzt wurden, um in Oozyten exprimierte Transporter zu untersuchen. Hinsichtlich der Untersuchung von elektroneutralen Transportmechanismen wurde die Verwendung von Oozyten unentbehrlich. Aber auch bei der Untersuchung von elektrogenen Transportmechanismen stellen Flux-Experimente eine wichtige Technik dar.

Oozyten, die experimentell Verwendung finden, sind in der Prophase der ersten meiotischen Teilung verhaftet. Innerhalb dieses Entwicklungsabschnitts durchlaufen die Zellen eine Differenzierungsphase, die in sechs Stadien untergliedert wird (92). Wesentlich für die Unterscheidung der verschiedenen Stadien sind die unterschiedliche Größe und die Pigmentierung der Oozyten. In den Stadien V und VI haben Oozyten einen Durchmesser von 1-1,3 mm. Sie weisen hier ein sehr charakteristisches Aussehen auf: eine schon mit bloßem Auge erkennbare Halbierung in eine hellbeige vegetative und eine dunkelbraune animalische Hemisphäre. Dies entspricht einer cytoplasmatische Polarisierung, wobei Dotterproteine für die helle Beigefärbung der vegetativen Hälfte und eine erhöhte Konzentration melaninhaltiger Pigmentgranula für das dunkelbraune Erscheinungsbild der animalen Hemisphäre verantwortlich sind (Abbildung 5) (92).

Zwei Eigenschaften machen die Oozyten als Modell besonders interessant: Einerseits der mit 1,3 mm große Durchmesser und andererseits die großen Mengen maternalen Enzyme, Proteine und Organellen. Die für die embryonale Entwicklung vorgesehenen Reserven kommen nach Mikroinjektion exogener mRNA ihrer Expression zunutze. Darüber hinaus sind die Eizellen in der Lage posttranslationale Modifikationen wie Phosphorylierungen und Glykosylierungen vieler fremder Proteine korrekt auszuführen (90).

### 2.1.2. Haltung von *Xenopus laevis*

Der Krallenfrosch *Xenopus laevis* ist unproblematisch in Haltung und Pflege und eignet sich u.a. deshalb hervorragend als Tiermodell. Außerdem reproduziert er sich kalkulierbar ganzjährig, was die Entnahme von Oozyten erleichtert. Der Xenopus-Frosch besitzt ein breites Nahrungsspektrum und territoriales Verhalten ist ihm fremd (93). Bis zu 10 Tiere einer Generation lebten zusammen in einem Wasserbecken mit einem Füllmenge von 120 l. Das Wasser wurde zweimal wöchentlich durch frisches, sedimentiertes Leitungswasser erneuert. Da sich größere Temperaturschwankungen negativ auf die Qualität der Oozyten auswirken können, lag die Wassertemperatur weitestgehend konstant bei 21 °C.

Die Fütterung erfolgte zweimal wöchentlich mit Frosch-Pellets der Fa. Kähler aus Hamburg. Im natürlichen Lebensraum unterliegt die Qualität der Oozyten jahreszeitlichen Schwankungen (94, 95). Um diese zu mindern, wenn nicht gar zu eliminieren, lebten die Frösche mittels Leuchtstoffröhren bei einem konstanten Tag-Nacht-Rhythmus von zwölf Stunden. Die Krallenfrösche wurden von Diplom-Biologe Ing. Horst Kähler, Bedarf für Forschung & Lehre, Hamburg, bezogen.

### 2.1.3. Gewinnung der Oozyten von *Xenopus laevis*

Ein adultes *Xenopus laevis* Weibchen trägt in den Ovarien mehr als 30.000 Oozyten, weit mehr, als für die Experimentserien benötigt wurden. So reichte eine partielle Ovarektomie, bei der genügend Oozyten gewonnen werden konnten und die operative Entnahme wurde der hormonellen vorgezogen (94, 95).

Zur Operation wurden nur Tiere ausgewählt, deren letzte Operation zur Eientnahme mindestens sechs Wochen zurücklag und deren Operationswunden sich vollständig verheilt darstellten. Da es sich rechtlich um eine Organentnahme und somit einen Tierversuch handelt, wurde dieser dem Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und Technische Sicherheit Berlin gemeldet und von diesem genehmigt (Aktenzeichen O-0183/01, 23.08.2001)

### 2.1.4. Entnahme der Oozyten, der operative Eingriff

Vor Beginn der Operation wurde der Frosch für etwa 5-10 Minuten mittels Tauchbadnarkose in einer 0,2 % igen Tricaine-Lösung (3-Aminobezoesäureethylester) anästhesiert. Vollständiges Erschlaffen der Froschbeinmuskulatur zeigte die wirksame Narkose zuverlässig an (94, 95). Anschließend wurde der Frosch auf den Rücken gedreht und während der Operation auf Eis gelagert, um Blutungen zu minimieren und die Narkose aufrecht zu erhalten. Mit 70 % igem Ethylalkohol wurde die Bauchhaut desinfiziert und von Schleim befreit.

Unter semisterilen Bedingungen erfolgte mit einem Skalpell ein ungefähr zwei cm langer Hautschnitt, etwa 2-3 cm seitlich der Medianlinie und 2-3 cm oberhalb des Insertionspunktes der Beine. Die Bauchhaut wurde mit einer Pinzette angehoben und die Faszie mit darunterliegender Bauchmuskelschicht durchtrennt. So wurde ein Zugang in den Peritonealraum geschaffen. Die Ovarialsäckchen, die aus mehreren Lappen bestehen und den gesamten Unterbauch ausfüllen, konnten durch diesen Zugang vorsichtig mittels anatomischer Pinzette mobilisiert, und je nach Anzahl der benötigten Oozyten läppchenweise abgesetzt werden. Der anschließende Verschluss der Operationswunde erfolgte schichtweise mit sterilem Nahtmaterial. Faszie und Bauchmuskulatur wurden mit resorbierbarem Nahtmaterial (Ethicon Vicryl 6-0 V492) mit 2-3 Stichen und Einzelknopfnähten geschlossen .



**Abbildung 3:**

*Operativer Eingriff bei einem adulten *Xenopus laevis* Weibchen zur Entnahme der Oozyten.*

Die Bauchhaut wurde daraufhin separat mit nicht resorbierbarem Nahtmaterial (Ethicon Mersilene 5-0 R698) versorgt. Bis zum vollständigen Erwachen aus der Narkose wurde der Frosch in einen Behälter mit wenig Leitungswasser gesetzt. Um ein Ertrinken zu verhindern musste der Kopf über Wasser gelagert sein. Nach vollständigem Erwachen aus der Narkose konnten die Frösche problemlos wieder in die Wasserbecken überführt werden. Da die Haut der *Xenopus laevis* Frösche körpereigener Antibiotika sezerniert, die Wundinfektionen zuverlässig verhindern (96, 97), kann die Operation problemlos unter semisterilen Bedingungen durchgeführt werden. Postoperative Wundinfektionen wurden nicht beobachtet.

### 2.1.5. Isolierung und Präparation der Oozyten

Die läppchenweise entnommenen Oozyten wurden in Petrischalen mit kalziumfreier Frosch-Ringer-Lösung gelegt und vorsichtig, mit Hilfe feiner Pinzetten, manuell in möglichst kleine Einheiten von 5–10 Oozyten zerteilt. Um Blut und zerstörtes Gewebe zu entfernen, wurden die Oozyten daraufhin 20 Minuten in kalziumfreier Frosch-Ringer-Lösung gewaschen. Beides geschah, um den anschließenden Schritt der Defollikulierung zu erleichtern. Denn nur Eizellen, bei denen die äußeren Zellschichten einschließlich der Follikelzellschicht entfernt worden waren, so genannte defollikulierte Oozyten, kamen für unsere Zwecke zur Verwendung. Die Defollikulierung kann enzymatisch oder mechanisch erfolgen. Qualitative bessere Oozyten konnten auf enzymatischem Wege mit Kollagenase gewonnen werden.



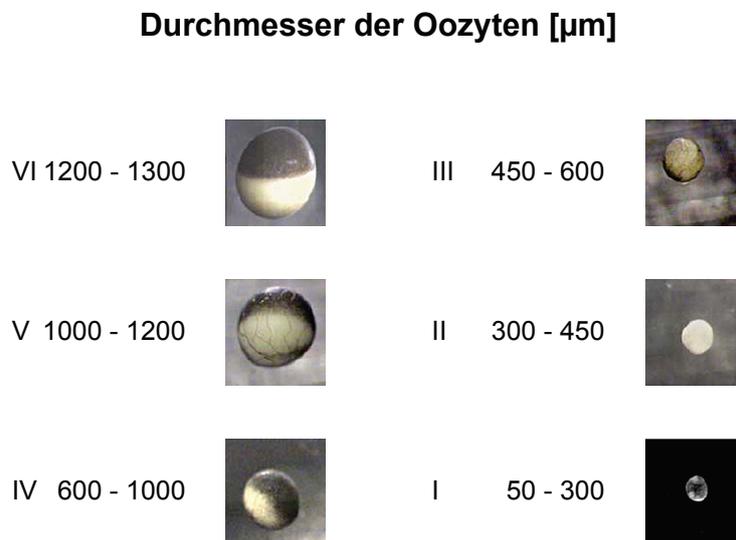
**Abbildung 4:**

*Manuelle Zerteilung der läppchenweise entnommenen Oozyten mit Hilfe feiner Pinzetten in kleine Einheiten von 5-10 Oozyten mit anschließender Entfernung von Blut und zerstörtem Gewebe durch 20 minütige Lagerung in calciumfreier Frosch-Ringer-Lösung.*

Für diesen Schritt erfolgte eine Behandlung der Oozyten mit 2 mg/ml Kollagenase (Sigma Typ IA) in calciumfreier Frosch-Ringer-Lösung. Unter steter leichter Bewegung wurden die Oozyten für 45–90 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dieser Vorgang wurde regelmäßig unterbrochen, um sich unter dem Stereomikroskop ein Bild vom Zustand der Eizellen zu machen. Beendet wurde der Vorgang, sobald der Großteil der Oozyten defollikuliert war. Der Inkubation schlossen sich zunächst 3 Waschschrirte mit calciumfreier Frosch-Ringer-Lösung gefolgt von 3 Waschschrirten mit calciumhaltiger Frosch-Ringerlösung, an.

Für die weitere Verwendung wurden nur unbeschädigte, innerhalb beider Hemisphären gleichmäßig gefärbte, Oozyten des Reifestadiums VI nach Dumont (92) mit Hilfe der Stereolupe selektiert und bei 18 °C in calciumhaltiger Frosch-Ringerlösung inkubiert. Am Tag ihrer Isolation wurde die Mikroinjektion der Oozyten mit Hilfe eines pneumatischen Mikroinjektors (Drummond Scientific Company) durchgeführt. Unter

dem Stereomikroskop wurde eine für die anstehenden Experimente benötigte Anzahl von Oozyten mit 50 nl sterilem H<sub>2</sub>O, beziehungsweise 50 nl der mRNA Lösung, welche 25 ng der *INDY* mRNA beinhaltet (siehe 2.2. Präparation der *INDY* mRNA), mikroinjiziert.



**Abbildung 5:**

*Sechs Stadien der Oogenese in Xenopus laevis, sichtbar gemacht in Labortieren. (92)*

Unter Verwendung eines Mikroelektrodenpullers (P-97, Sutter Instrument Company, Novato, CA USA) wurden aus 10  $\mu\text{l}$  Glaskapillaren (Microdispenser, Drummond Scientific Company, Broomwall, PA USA) Injektionsnadeln mit langer Spitze gezogen. Unter dem Stereomikroskop wurden die Spitzen mit Hilfe einer Pinzette so abgebrochen, dass die Injektionsnadelspitzen eine Öffnung mit einem Durchmesser von etwa 30  $\mu\text{m}$  besaßen. Die aufgetaute mRNA-Lösung wurde nach kurzer Durchmischung / Zentrifugation (Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland) und nach Pipettierung auf eine sterile Petrischale, durch Zurückdrehen des Kolbens des Mikroinjektors langsam und vorsichtig aufgezogen. Hierbei musste besonders darauf geachtet werden, dass keine Luftblasen entstanden und in den Injektor aufgezogen wurden. Außerdem wurden stets Latexhandschuhe und Mundschutz getragen und an zuvor desinfizierten Arbeitsplätzen gearbeitet, da mRNA sehr empfindlich gegenüber unspezifischen RNasen reagiert. Die injizierten Oozyten

wurden in calziumhaltiger Frosch-Ringerlösung bei 18 °C für etwa 48 h inkubiert, um die Expression des INDY Proteins zu ermöglichen.

### 2.1.6. Versuchslösungen

Die Konzentrationsangaben für die einzelnen Lösungsmittelbestandteile erfolgen, sofern nicht anders vermerkt, in mM.

Alle Lösungen wurden steril filtriert (Millex-HA; 0.45 µm Filter, Millipore S.A.; Molsheim, France).

#### **1 molare Lösungen (g/l):**

NaCl (58,44 g/l)

KCl (74,56 g/l)

MgCl<sub>2</sub> (203,3 g/l)

HEPES (238,3 g/l)

#### **Lösung 1: Kalziumhaltige Frosch-Ringer-Lösung:**

92 ml NaCl (1 mol)

2 ml KCl (1 mol)

1,8 ml CaCl<sub>2</sub> (0,2 mol)

1 ml MgCl<sub>2</sub> (0,2 mol)

5 ml HEPES (0,2 mol)

Auf 1 l, pH 7,4 mit NaOH einstellen

#### **Lösung 2: Kalziumfreie Frosch-Ringer-Lösung:**

82,5 ml NaCl (1 mol)

2 ml KCl (1 mol)

1,8 ml MgCl<sub>2</sub> (0,2 mol)

5 ml HEPES (0,2 mol)

Auf 1 l, pH 7,4 mit NaOH einstellen

## Reagenzien und Chemikalien:

Natriumchlorid	(Merck, Darmstadt)
Kaliumchlorid	(Merck, Darmstadt)
Magnesiumchlorid	(Merck, Darmstadt)
Calciumchlorid	(Merck, Darmstadt)
HEPES	(Gibco Invitrogen, Darmstadt)
Kollagenase	(Sigma Typ IA), (Sigma, Deisenhofen)
Succinat	(Sigma, Deisenhofen)
Citrat	(Sigma, Deisenhofen)
alpha-Ketoglutarat	(Sigma, Deisenhofen)
Fumarat	(Sigma, Deisenhofen)
Oxalacetat	(Sigma, Deisenhofen)
DIDS	(Sigma, Deisenhofen)
SDS	(Sigma, Deisenhofen)
[ <sup>14</sup> C]-Succinat	(MP Biomedicals, Santa Ana, CA, USA)
[ <sup>14</sup> C]-Citrat	(MP Biomedicals, Santa Ana, CA, USA)
Opti-Fluor	(Packard BioScience, Meriden, CT, USA)

## 2.2. Präparation der *INDY* mRNA

Die später subklonierte Kodierungssequenz wurde mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) vervielfältigt. Hierzu wurden Primer verwendet, die Schnittstellen für die Restriktionsenzyme BamHI beziehungsweise XhoI Stellen miteinschlossen.

Die Erkennungssequenz von BamHI ist 5'-GGATCC-3' und 3'-CCTAGG-5'.

Die Erkennungssequenz von XhoI ist 5'-CTCGAG-3' und 3'-GAGCTC-5'.

Verwendete Primer:

5'- Primer: ATAAGAAGGATCCACCATGGAAATTGAAATTGGCGAACAACC-OH;

3'- Primer: CGGTCTAGACTAGTGCGTCTTGTTCCTCCAGTG-OH

Die INDY cDNA mit den integrierten Schnittstellen wurde in das Expressionsplasmid pGH19 subkloniert. Die Plasmid DNA wurde unter Verwendung des Restriktionsenzym XhoI geschnitten, linearisiert und anschließend durch T7 RNA Polymerase (Ambion) transkribiert. Die präparierte cDNA wurde in sterilem Wasser gelöst und ihre Qualität mittels Gelelektrophorese überprüft. Am Tag ihrer Präparation wurde den isolierten Oozyten entweder 50 nl steriles Wasser oder 50 nl cRNA Lösung, mit 25 ng INDY cRNA, unter Verwendung des Drummond Mikroinjektor injiziert. Die injizierten Oozyten wurden in calciumhaltiger Frosch-Ringer-Lösung bei 18 °C für mindestens 48 h inkubiert, um die Expression des INDY Proteins gestatten.

Vervielfältigung und Subklonierung erfolgte durch Felix Knauf.

### **2.3. Uptake- versus Efflux-Technik**

Für Efflux-Experimente wurden die betreffenden Isotope in die Oozyten mikroinjiziert, wie ursprünglich von Stewart und Mitarbeitern (98) beschrieben. Konkret wurden die einzelnen Oozyten mit 50 nl 3.4 mM [<sup>14</sup>C]-Citrat oder 3.5 mM [<sup>14</sup>C]-Succinat (Amersham Biosciences/ MP Biomedicals, USA) injiziert. 10-15 Oozyten wurden nach der vollständigen Injektion lysiert und für das Experiment abgezählt, repräsentativ 4000 bis 7000 total counts pro minute (cpm) pro Oozyte. Nach durchschnittlich 5 Minuten Erholungszeit und zwei Waschungen in NaCl-Puffer wurde der Efflux Assay durch den Transfer einzelner Oozyten in eine 48er Mikrotiterplatte (Beckman, Dickenson) initiiert. Die Mikrotiterplatte enthielt 1 ml Efflux Lösung. Nach 3 Minuten wurde die Efflux Lösung zur Szintillationszählung entfernt. Radioisotope der Efflux Lösung wurden mittels Szintillationsspektroskopie nach Hinzufügen von 5 ml Szintillationsflüssigkeit (Opti-Fluor, Packard) ermittelt.

Für die Uptake Versuche wurden die Oozyten entweder mit 50 nl Wasser oder 1M Lösung mit Natriumlactat, Natriumsuccinat oder Natriumcitrat mikroinjiziert. Nach durchschnittlich 5 min Erholungszeit wurden die Oozyten zweimal mit NaCl Puffer gewaschen und anschließend im selben Medium mit [<sup>14</sup>C]-Succinat (18 M) resuspendiert. Nach dreiminütiger Inkubation wurden die externen Isotope durch dreimaliges Waschen der Oozyten mit eiskaltem Puffer entfernt. Der Gehalt an Radioisotope der einzelnen Oozyten wurde nach Solubilisierung in 0,5 ml

10 prozentiger SDS und 5 ml Szintillationslösung durch Szintillationsspektroskopie gemessen.

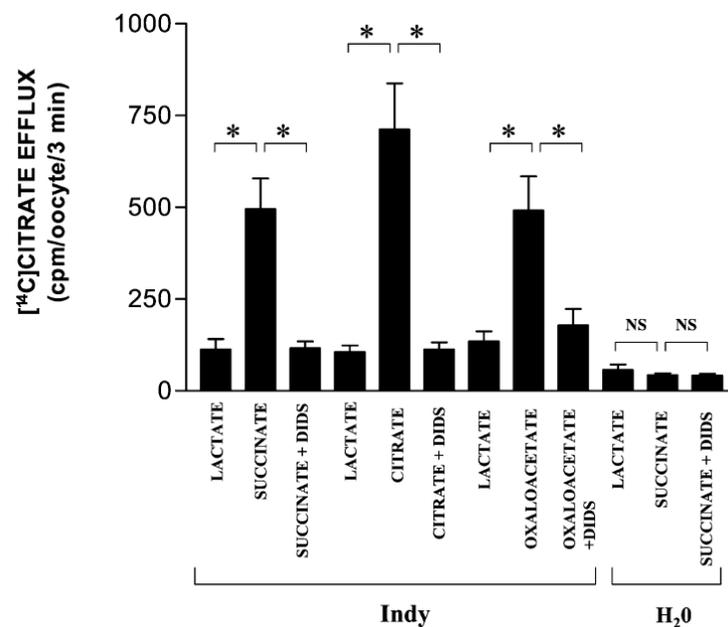
## **2.4. Statistik**

Ergebnisse in den Balkendiagrammen dargestellt repräsentieren Mittelwerte ( $\pm$  SEM Standardfehler des Mittelwerts) von 8-16 Eizellen. Die Ergebnisse wurden unter Verwendung von nicht-gepaarten Student-t-Test analysiert. P-Werte  $<0,05$  wurden als statistisch signifikant betrachtet.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Wirkung externer Zwischenmetabolite des Krebs-Zyklus auf den [<sup>14</sup>C]-Citrat-Efflux

Um zu untersuchen, ob der Transporter INDY den Austausch metabolischer Zwischenstufen des Krebs-Zyklus in Form von Dicarbonsäuren und Tricarbonsäuren vermitteln kann, wurde zu Beginn der Versuchsreihen [<sup>14</sup>C]-Citrat in Oozyten mikroinjiziert. Ziel der Versuche war es herauszufinden, ob organische Anionen, die von INDY transportiert werden, den [<sup>14</sup>C]-Citrat-Efflux über die Zellmembran stimulieren können.



#### Abbildung 6:

Effekte externer Zwischenmetaboliten des Krebs-Zyklus auf den [<sup>14</sup>C]-Citrat-Efflux in INDY-exprimierenden *Xenopus* Oozyten. INDY-exprimierende Oozyten und Kontrolloozyten, in die nur Wasser mikroinjiziert worden war, wurden mit [<sup>14</sup>C]-Citrat injiziert, anschließend gewaschen und in unterschiedliche Außenmedien transferiert. Die Gabe von 1 mM Succinatlösung stimulierte den zellulären Efflux von Citrat, im Vergleich zur Kontrollsubstanz Laktat. Der INDY-vermittelte Citrat-Efflux kommt durch die Gabe von 0,1 mM DIDS fast völlig zum Erliegen. Die Ergebnisse sind Mittelwerte ± S.E.M. \*P < 0,05. N.S. statistisch nicht signifikant.

Wie in der Abbildung 6 gezeigt, stimulierte die Gabe von 1 mM Succinat zum Außenmedium, im Vergleich zur Kontrolle mit 1 mM Laktat, den [<sup>14</sup>C]-Citrat-Efflux deutlich. Laktat diente als Kontrollsubstrat, da keine Affinität zu INDY besteht, wie frühere Studien zeigen konnten (6). Der INDY-vermittelte Citrat-Efflux wurde durch die Gabe von 0,1 mM DIDS fast völlig gehemmt (Abbildung 6). Frühere Studien hatten gezeigt, dass DIDS die durch INDY-vermittelte Aufnahme von Dicarboxylat und Tricarboxylat hemmt [6]. Bedeutenderweise kann die externe Gabe von Succinat den [<sup>14</sup>C]-Citrat-Efflux in Oozyten ohne exprimierendes INDY nicht stimulieren (Abbildung 6). Diese Ergebnisse bestätigen den DIDS-sensitiven Citrat-Succinat-Austausch über INDY und beweisen, dass kein endogener Transporter in Oozyten von *Xenopus* am Membrantransport beteiligt ist. Frühere Studien haben gezeigt, dass die INDY-vermittelte Succinat- und Citrataufnahme kationenunabhängig ist [6, 7].

Nach der Demonstration von INDY als einem Anionenaustauscher wurde als nächstes untersucht, ob zusätzlich zum Außenmedium zugefügtes Substrat den [<sup>14</sup>C]-Citrat-Efflux über die Zellmembran stimulieren kann. Vergleichbar mit Succinat stimulierte die zusätzliche Gabe von 1 mM ungelabeltem Citrat im externen Medium der Oozyten den DIDS-sensitiven [<sup>14</sup>C]-Citrattransport (Abbildung 6). Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit dem INDY-vermittelten Citrat-Citrat-Austausch. Ebenso stimuliert die Gabe von Oxalacetat zum Außenmedium den DIDS-sensitiven [<sup>14</sup>C]-Austausch (Abbildung 6). Dies weist auf einen INDY-vermittelten Citrat-Oxalessigsäure-Austausch hin.

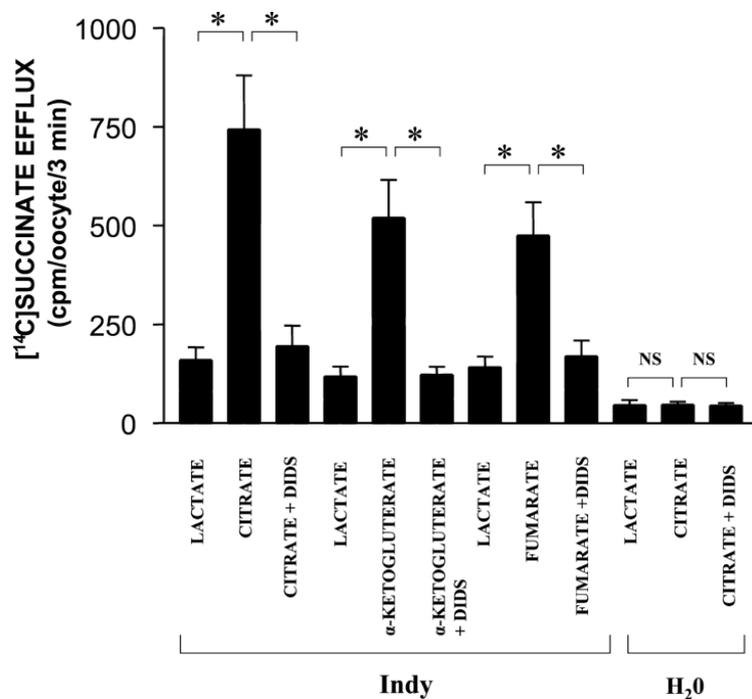
### **3.2. Wirkung externer Zwischenmetabolite des Krebs-Zyklus auf den [<sup>14</sup>C]-Succinat-Efflux**

Um die Umkehrbarkeit und Anion-Spezifität des INDY-vermittelten Anionenaustausches detaillierter zu bewerten, wurde die Fähigkeit des INDY-vermittelten [<sup>14</sup>C]-Succinataustausches gegen externe Dicarboxylate und Tricarboxylate getestet.

Wie in der Abbildung 7 dargestellt, stimuliert die Anwesenheit von 1 mM Citrat im Außenmedium den DIDS-sensitiven [<sup>14</sup>C]-Succinataustausch in INDY-exprimierenden *Xenopus* Oozyten. Dies Ergebnis steht im Einklang mit dem Succinat-Citrat-Austausch. Kontrollloozyten ohne exprimierendes *INDY* Gen (Wasserinjektion) zeigten hingegen keinen gesteigerten Succinat-Efflux (Abbildung 7). Diese Ergebnisse beweisen den Zusammenhang des DIDS-sensitiven Succinataustauschs mit INDY und seine

Unabhängigkeit von endogenen Transportern in *Xenopus* Oozyten. Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse aus Versuch 1 und 2 (Abbildungen 6 und 7), dass der INDY-vermittelte Tricarboxylat-Dicarboxylat Austausch umkehrbar ist. Citrat in den Eizellen wurde gegen externes, im Außenmedium, vorhandenes Succinat ausgetauscht, ebenso wie zelluläres Succinat gegen extrazelluläres Citrat.

Als nächstes wurde die Fähigkeit von INDY getestet, Dicarboxylate unterschiedlicher Kettenlänge auszutauschen. Wie in der Abbildung 7 gezeigt, stimulierte die Anwesenheit von 1 mM alpha-Ketoglutarat im Außenmedium den DIDS-sensitiven [<sup>14</sup>C]-Succinat-Efflux deutlich. INDY kann somit bewiesenermaßen ebenfalls den Austausch von alpha-Ketoglutarat vermitteln.



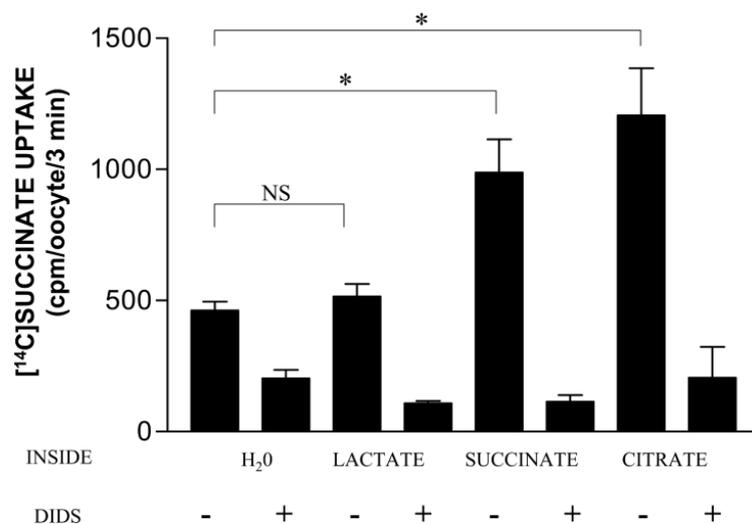
### Abbildung 7:

Wirkung externer Zwischenmetabolite des Krebs-Zyklus auf den [<sup>14</sup>C]-Succinat-Efflux in INDY-exprimierenden *Xenopus* Oozyten. INDY-exprimierende Oozyten und Kontrolloozyten, in die nur Wasser mikroinjiziert worden war, wurden [<sup>14</sup>C]-Succinat injiziert, anschließend gewaschen und in unterschiedliche Außenmedien transferiert. Die Gabe von 1 mM Citratlösung stimulierte den zellulären Efflux von Succinat, im Vergleich zur Kontrollsubstanz Laktat. Der INDY-vermittelte Succinat-Efflux kommt durch die Gabe von 0,1 mM DIDS fast völlig zum Erliegen. Die Ergebnisse sind Mittelwert ± S.E.M. \*P < 0,05. N.S. statistisch nicht signifikant.

### 3.3. Wirkung interner Zwischenmetabolite des Krebs-Zyklus auf den [<sup>14</sup>C]-Succinat-Uptake

Als zusätzliche Bestätigung des INDY-vermittelten Anionenaustausches über die Plasmamembran wurden *Xenopus* Oozyten mit Citrat und Succinat versetzt. Die anschließende Aufnahme von [<sup>14</sup>C]-Succinat aus dem Außenmedium war dann deutlich gesteigert, wie in Abbildung 9 ersichtlich. Hingegen stimulierte die Injektion von Laktat in die Eizellen die zelluläre Aufnahme von [<sup>14</sup>C]-Succinat nicht. Als Kontrolle diente jeweils die Injektion von Wasser in die Oozyten.

Die in diesem Versuch gezeigte stimulierte Succinataufnahme durch interne Anionen konnte in der Anwesenheit von DIDS komplett abgeschaltet werden (Abbildung 8). Dies bestätigt die Anwesenheit eines DIDS-sensitiven Succinat-Succinat und Succinat-Citrat Austausches.

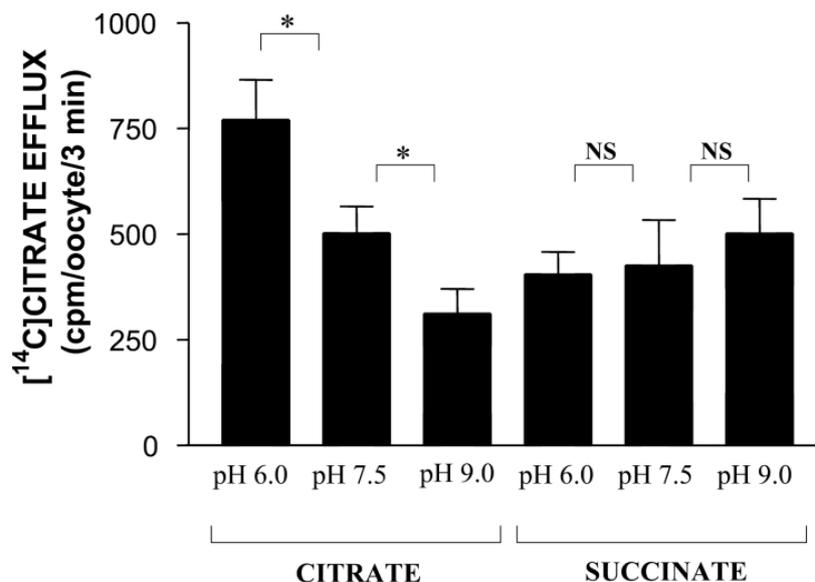


**Abbildung 8:**

*Effekte interner Substrate auf den [<sup>14</sup>C]-Succinat-Uptake in INDY-exprimierenden *Xenopus* Oozyten. INDY-exprimierende Oozyten wurden mit 50 nl Wasser oder 1 molarer Lösung der Substrate Laktat, Succinat und Citrat injiziert. Anschließend wurden die Oozyten gewaschen und in NaCl-Puffer mit oder ohne 100 µM DIDS transferiert. Drei Minuten nach Inkubation wurden die externen Isotope durch Waschen der Oozyten mit eiskaltem Puffer entfernt und die Radioisotope durch Szintillationsspektroskopie ermittelt. Die Ergebnisse sind Mittelwerte ± S.E.M. \*P <0,05. N.S. statistisch nicht signifikant.*

### 3.4. Effekt des pH-Wertes auf den Succinat- und Citrat-medierten [<sup>14</sup>C]-Citrat-Efflux

Wie bereits früher festgestellt, ist die INDY-vermittelte Citrataufnahme in die Oozyte bei einem pH-Wert von 6,0 verstärkt, im Gegensatz zur pH-unabhängigen Succinataufnahme (Abbildung 9). Deshalb war die Frage relevant, ob der pH-Wert einen Einfluss auf die Aufnahme externen Citrats und Succinats, stimuliert durch den Anionenaustausch, haben könnte. Wie in der Abbildung 9 gezeigt, war der [<sup>14</sup>C]-Citrat-Efflux bei Citrat im Außenmedium pH abhängig. Ein pH-Wert von 6,0, im Vergleich zu einem pH-Wert von 7,5 steigerte den [<sup>14</sup>C]-Citrat-Efflux in INDY-exprimierenden Oozyten deutlich. Im Gegensatz dazu war die Wirkung von externem Succinat auf den [<sup>14</sup>C]-Citrat-Efflux pH-unabhängig. Diese Ergebnisse zeigen, dass extrazelluläres Citrat entweder als Dicarbonsäure oder als Tricarbonsäure zusammen mit einem Proton über die Zellmembran transportiert wird.



#### Abbildung 9:

Effekt von externem pH auf den Citrat versus Succinat stimulierten [<sup>14</sup>C]-Citrat-Efflux von INDY-exprimierenden *Xenopus* Oozyten. INDY-exprimierende Oozyten wurden mit [<sup>14</sup>C]-Citrat mikroinjiziert, dann gewaschen und in unterschiedliche externe Lösungen transferiert: NaCl Puffer mit 1 mM Succinat oder Citrat mit pH 6,0, pH 7,5 und pH 9,0. Das Vorkommen von Radioaktivität in der externen Lösung während einer dreiminütigen Inkubation wurde durch Szintillationsspektroskopie eliminiert. Die Ergebnisse sind Mittelwerte  $\pm$  S.E.M. \*P < 0,05. N.S. statistisch nicht signifikant.

### 3.5. Km-Werte / Bindungskapazität und Reaktionsgeschwindigkeiten

Der Transporter INDY vermittelt den Austausch von Zwischenprodukten des Krebs-Zyklus vom Außenmedium ins Cytosol über die Zellmembran. Dabei ergibt sich die Hypothese, dass energiereiche Zwischenprodukte mit geringerer Geschwindigkeit in die Zelle transportiert werden könnten als energiearme. Energiereiche Zwischenprodukte widersprechen der Theorie der von INDY-vermittelten verlängerten Lebenszeit durch Kalorienrestriktion. Aufbauend auf dieser Überlegung sollten energiearme Zwischenprodukte mit höherer Umsatzgeschwindigkeit über die Zellmembran ins Zellinnere transportiert werden.

Um die aufgestellte Hypothese zu überprüfen, wurden dem Außenmedium unterschiedlich energiereiche Zwischenprodukte zugefügt und sowohl die Michaeliskonstante  $K_m$  als auch die maximale Umsatzgeschwindigkeit ermittelt.  $K_m$  gibt die Substratkonzentration an, bei der die Umsatzgeschwindigkeit genau bei der Hälfte der maximalen Umsatzgeschwindigkeit ( $v = \frac{1}{2} \cdot v_{max}$ ) liegt.  $v_{max}$  wiederum ist die maximal zu erreichende Umsatzgeschwindigkeit und erreicht eine Sättigung.

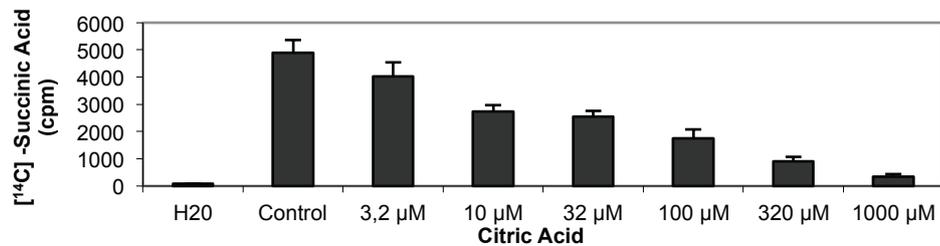
In der nächsten Versuchsreihe wurde den INDY-exprimierenden Oozyten eine ansteigende Konzentration der zu untersuchenden Metabolite im Außenmedium zugesetzt (Abbildungen 10 – 14). Im Außenmedium befand sich jeweils die definierte Konzentration von  $33 \mu\text{M}$  [ $^{14}\text{C}$ ]-Succinat, die mit dem zu untersuchenden Substrat konkurrierte. Als zu testende Zwischenprodukte des Krebs-Zyklus wurden Citrat, alpha-Ketoglutarat, Succinat, Fumarat und Oxalacetat dem Außenmedium zugesetzt.

Die Ergebnisse in den Balkendiagrammen geben die Mittelwerte der Substratkonzentrationen ( $\pm$  SEM), gemittelt von Untersuchungen an 8-16 Eizellen, wieder.

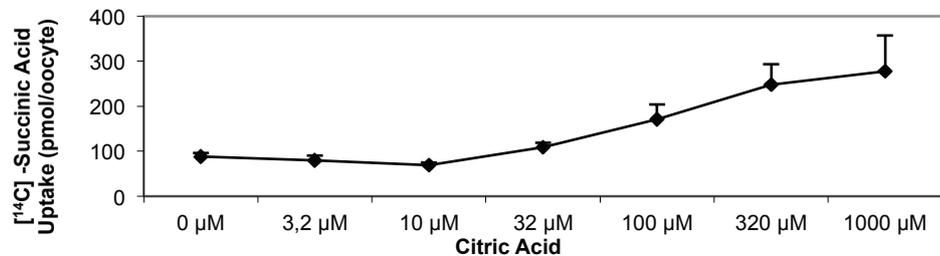
### 3.5.1. Bindungskapazität und Reaktionsgeschwindigkeit von Citrat

Um die Bindungskapazität des Transporters INDY und seine durch ihn vermittelte Reaktionsgeschwindigkeit in Bezug auf Citrat zu ermitteln, wurde den INDY-exprimierenden Oozyten zusätzlich zum [ $^{14}\text{C}$ ]-succinathaltigen Außenmedium für 30 Minuten eine ansteigende Konzentration von Citrat zugesetzt und dann der [ $^{14}\text{C}$ ]-Succinat-Uptake gemessen. Nach erfolgter Umrechnung der Aktivität in Molarität wurden die Ergebnisse im Lineweaver-Burk-Plot dargestellt (Abbildung 10). Die Mittelwerte der Versuchsreihen ergaben für Citrat eine maximale Umsatzgeschwindigkeit  $V_{\text{max}}$  von 139,86 und eine  $K_m$  von 3,16.

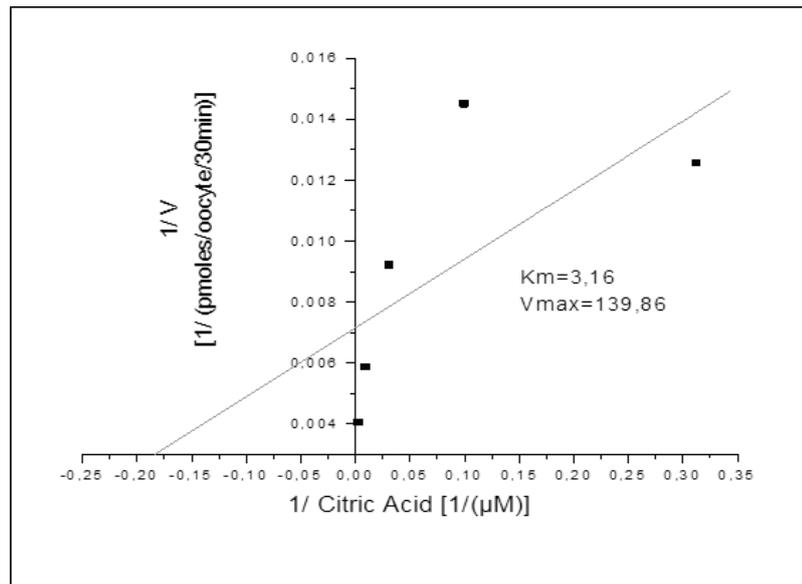
**A**



**B**



C



**Abbildung 10:**

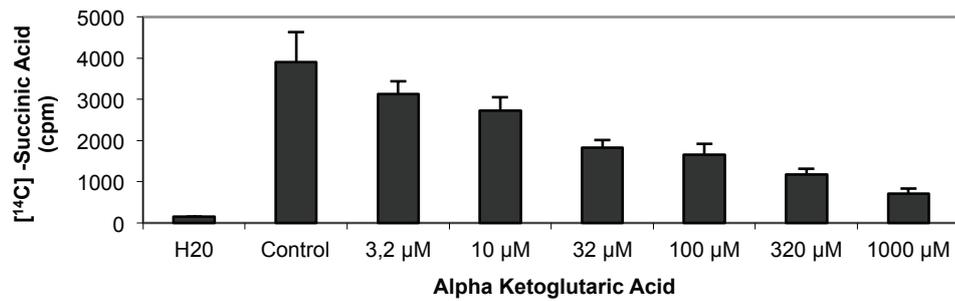
Darstellung des gemessenen  $[^{14}\text{C}]$ -Succinat-Uptakes in Abhängigkeit von der im Außenmedium angebotenen Citrat-Konzentration (cpm / mol / Lineweaver-Burk-Plot). Im oberen Teil der Abbildung (A) Darstellung der gemessenen  $[^{14}\text{C}]$ -Succinat Aktivität in counts per minute in Abhängigkeit von der im Außenmedium angebotenen Citrat-Konzentrationen als Balkendiagramm. Zu sehen die Mittelwerte ( $\pm$  SEM Standardfehler des Mittelwerts) von 8-16 Oozyten. Im mittleren Anteil (B) Darstellung des  $[^{14}\text{C}]$ -Succinat-Uptakes in pmol/ Oozyte nach Konversion der Aktivität in Molarität. Im unteren Anteil (C) Darstellung der Ergebnisse im Lineweaver-Burk Plot. Die Mittelwerte der Versuchsreihen ergeben für Citrat eine maximale Umsatzgeschwindigkeit  $V_{\text{max}}$  von 139,86 und eine  $K_m$  von 3,16.

3.5.2. Bindungskapazität und Reaktionsgeschwindigkeit von alpha-Ketoglutarat

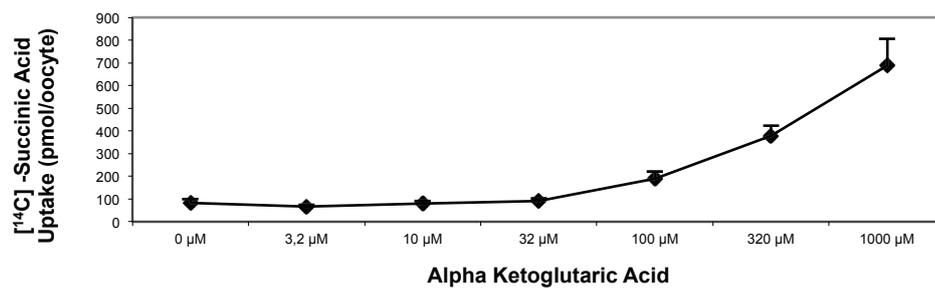
Um die Bindungskapazität des Transporters INDY und seine durch ihn vermittelte Reaktionsgeschwindigkeit in Bezug auf alpha-Ketoglutarat zu ermitteln, wurde den INDY-exprimierenden Oozyten zusätzlich zum  $[^{14}\text{C}]$ -succinathaltigen Außenmedium für 30 Minuten eine ansteigende Konzentration alpha-Ketoglutarat zugesetzt und dann der  $[^{14}\text{C}]$ -Succinat-Uptake gemessen.

Nach erfolgter Umrechnung der Aktivität in Molarität wurden die Ergebnisse im Lineweaver-Burk-Plot dargestellt (Abbildung 11). Die Mittelwerte der Versuchsreihen ergaben für Citrat eine maximale Umsatzgeschwindigkeit  $V_{max}$  von 157,98 und eine  $K_m$  von 4,96.

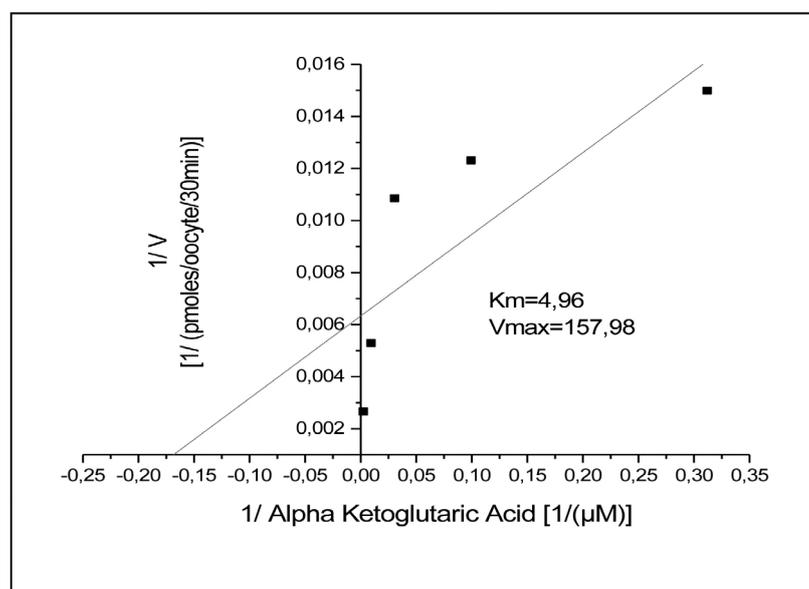
**A**



**B**



**C**



### Abbildung 11:

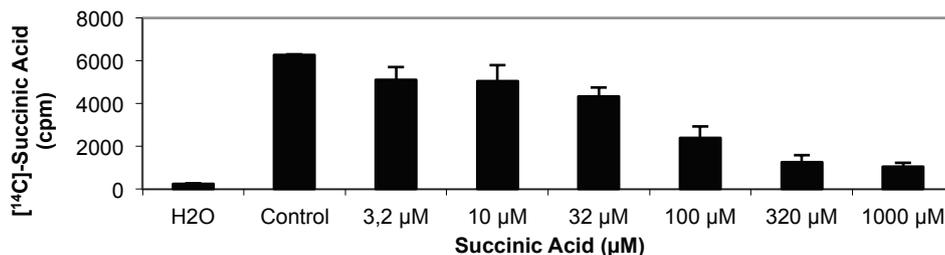
Darstellung des gemessenen [ $^{14}\text{C}$ ]-Succinat-Uptakes in Abhängigkeit von der im Außenmedium angebotenen alpha-Ketoglutarat-Konzentration (cpm / mol / Lineweaver-Burk-Plot). Im obere Anteil der Abbildung (A) Darstellung der gemessenen [ $^{14}\text{C}$ ]-Succinat Aktivität in counts per minute in Abhängigkeit von der im Außenmedium angebotenen alpha-Ketoglutarat-Konzentrationen als Balkendiagramm. Zu sehen die Mittelwerte ( $\pm$  SEM Standardfehler des Mittelwerts) von 8-16 Oozyten. Im mittleren Anteil (B) Darstellung des [ $^{14}\text{C}$ ]-Succinat-Uptakes in pmol/ Oozyte nach Konversion der Aktivität in Molarität. Im unteren Anteil (C) Darstellung der Ergebnisse im Lineweaver-Burk Plot. Die Mittelwerte der Versuchsreihen ergeben für alpha-Ketoglutarat eine maximale Umsatzgeschwindigkeit  $V_{\text{max}}$  von 157,98 und eine  $K_m$  von 4,96.

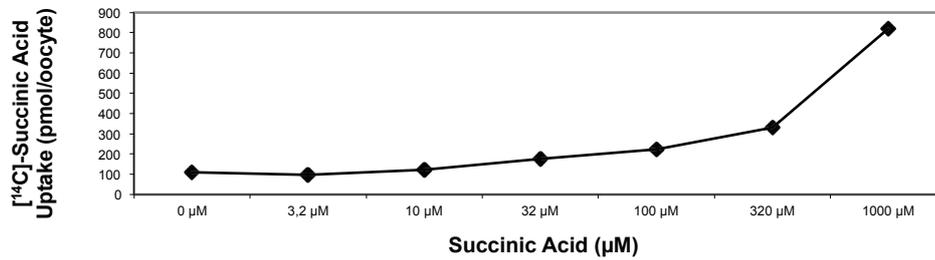
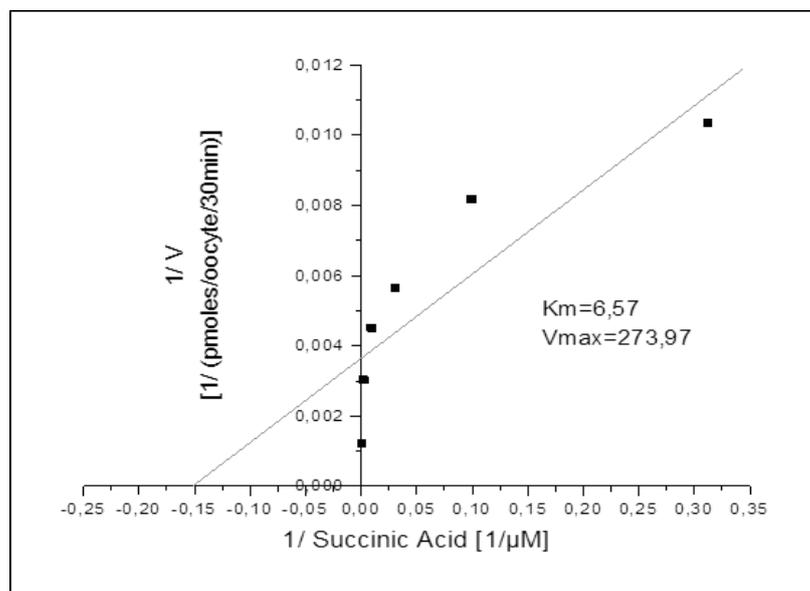
### 3.5.3. Bindungskapazität und Reaktionsgeschwindigkeit von Succinat

Um die Bindungskapazität des Transporters INDY und seine durch ihn vermittelte Reaktionsgeschwindigkeit in Bezug auf Succinat zu ermitteln, wurde den INDY-exprimierenden Oozyten zusätzlich zum [ $^{14}\text{C}$ ]-succinathaltigen Außenmedium für 30 Minuten eine ansteigende Konzentration Succinat zugesetzt und dann der [ $^{14}\text{C}$ ]-Succinat-Uptake gemessen.

Nach erfolgter Umrechnung der Aktivität in Molarität wurden die Ergebnisse im Lineweaver-Burk-Plot dargestellt (Abbildung 12). Die Mittelwerte der Versuchsreihen ergaben für Citrat eine maximale Umsatzgeschwindigkeit  $V_{\text{max}}$  von 273,97 und eine  $K_m$  von 6,57.

A



**B****C****Abbildung 12:**

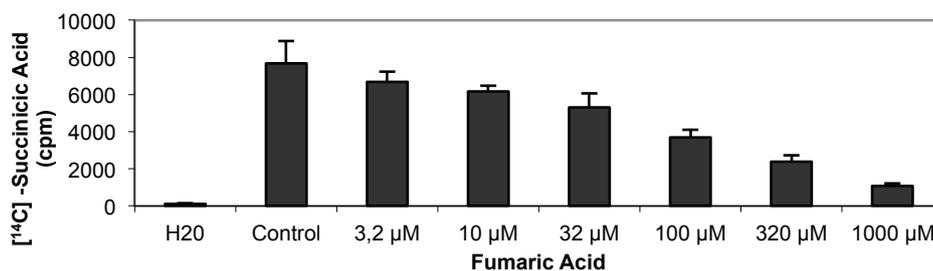
Darstellung des gemessenen  $[^{14}\text{C}]$ -Succinat-Uptakes in Abhängigkeit von der im Außenmedium angebotenen Succinat-Konzentration (cpm / mol / Lineweaver-Burk-Plot). Im obere Anteil der Abbildung (A) Darstellung der gemessenen  $[^{14}\text{C}]$ -Succinat Aktivität in counts per minute in Abhängigkeit von der im Außenmedium angebotenen Succinat-Konzentrationen als Balkendiagramm. Zu sehen die Mittelwerte ( $\pm$  SEM Standardfehler des Mittelwerts) von 8-16 Oozyten. Im mittleren Anteil (B) Darstellung des  $[^{14}\text{C}]$ -Succinat-Uptakes in pmol/ Oozyte nach Konversion der Aktivität in Molarität. Im unteren Anteil (C) Darstellung der Ergebnisse im Lineweaver-Burk Plot. Die

Mittelwerte der Versuchsreihen ergeben für Succinat eine maximale Umsatzgeschwindigkeit  $V_{max}$  von 273,97. Km beträgt 6,57.

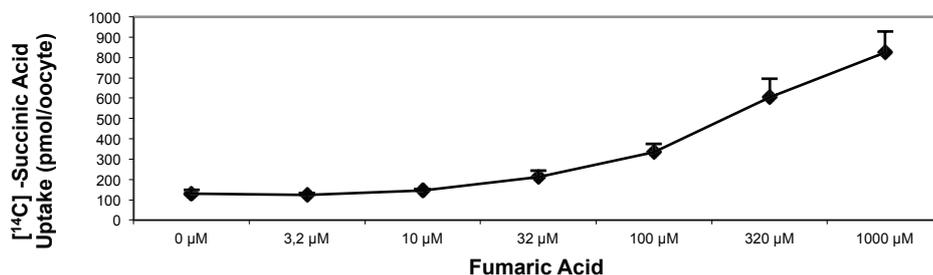
### 3.5.4. Bindungskapazität und Reaktionsgeschwindigkeit von Fumarat

Um die Bindungskapazität des Transporters INDY und seine durch ihn vermittelte Reaktionsgeschwindigkeit in Bezug auf Fumarat zu ermitteln wurde den INDY-exprimierenden Oozyten zusätzlich zum [ $^{14}$ C]-succinathaltigen Außenmedium für 30 Minuten eine ansteigende Konzentration Fumarat zugesetzt und dann der [ $^{14}$ C]-Succinat-Uptake gemessen. Nach erfolgter Umrechnung der Aktivität in Molarität wurden die Ergebnisse im Lineweaver-Burk-Plot dargestellt (Abbildung 13). Die Mittelwerte der Versuchsreihen ergaben für Citrat eine maximale Umsatzgeschwindigkeit  $V_{max}$  von 363,64 und eine Km von 7,16.

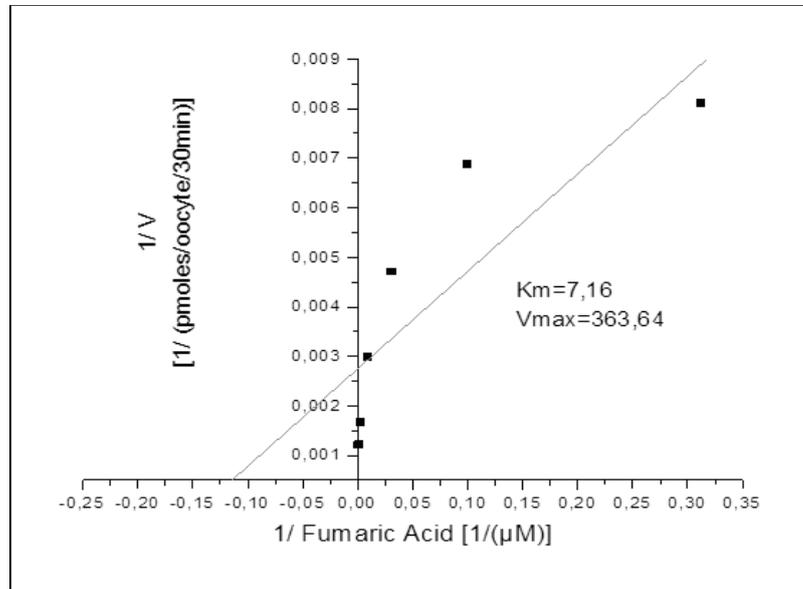
**A**



**B**



C



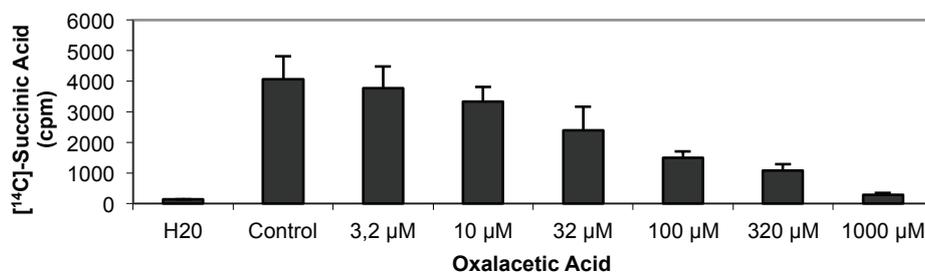
**Abbildung 13:**

Darstellung der gemessenen [ $^{14}\text{C}$ ]-Succinat-Uptakes in Abhängigkeit von der im Außenmedium angebotenen Fumarat-Konzentration (cpm / mol / Lineweaver-Burk-Plot). Im obere Anteil der Abbildung (A) Darstellung der gemessenen [ $^{14}\text{C}$ ]-Succinat Aktivität in counts per minute in Abhängigkeit von der im Außenmedium angebotenen Fumarat-Konzentrationen als Balkendiagramm. Zu sehen die Mittelwerte ( $\pm$  SEM Standardfehler des Mittelwerts) von 8-16 Oozyten. Im mittleren Anteil (B) Darstellung des [ $^{14}\text{C}$ ]-Succinat-Uptakes in pmol/ Oozyte nach Konversion der Aktivität in Molarität. Im unteren Anteil (C) Darstellung der Ergebnisse im Lineweaver-Burk Plot. Die Mittelwerte der Versuchsreihen ergeben für Fumarat eine maximale Umsatzgeschwindigkeit  $V_{\text{max}}$  von 363,64.  $K_m$  beträgt 7,16.

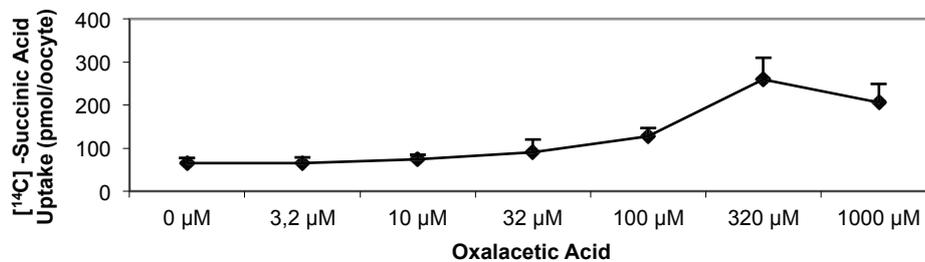
### 3.5.5. Bindungskapazität und Reaktionsgeschwindigkeit von Oxalacetat

Um die Bindungskapazität des Transporters INDY und seine durch ihn vermittelte Reaktionsgeschwindigkeit in Bezug auf Oxalacetat zu ermitteln, wurde den INDY-exprimierenden Oozyten zusätzlich zum [ $^{14}\text{C}$ ]-succinathaltigen Außenmedium für 30 Minuten eine ansteigende Konzentration Oxalacetat zugesetzt und dann der [ $^{14}\text{C}$ ]-Succinat-Uptake gemessen. Nach erfolgter Umrechnung der Aktivität in Molarität wurden die Ergebnisse im Lineweaver-Burk-Plot dargestellt (Abbildung 14). Die Mittelwerte der Versuchsreihen ergaben für Citrat eine maximale Umsatzgeschwindigkeit  $V_{\text{max}}$  von 141,44 und eine  $K_m$  von 4,29.

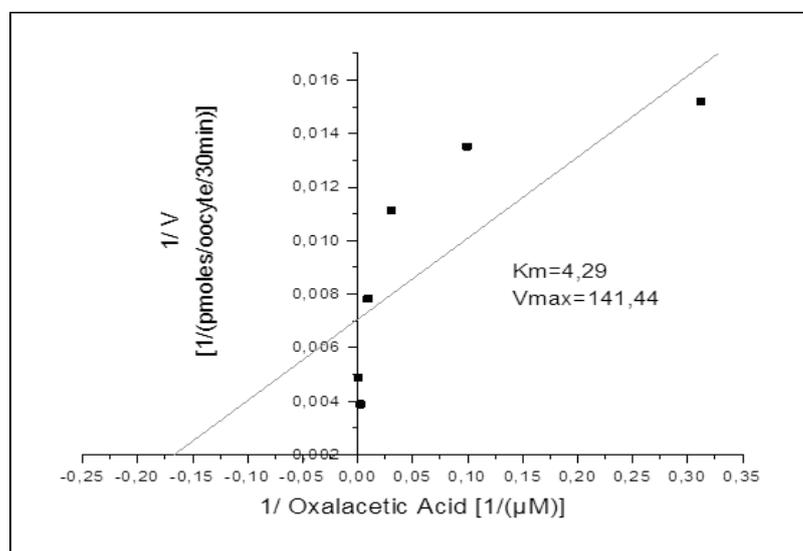
**A**



**B**



**C**



**Abbildung 14:**

Darstellung des gemessenen [ $^{14}\text{C}$ ]-Succinat-Uptakes in Abhängigkeit von der im Außenmedium angebotenen Oxalacetat-Konzentration (cpm / mol / Lineweaver-Burk-Plot). Im oberen Anteil der Abbildung (A) Darstellung der gemessenen [ $^{14}\text{C}$ ]-Succinat Aktivität in counts per minute in Abhängigkeit von der im Außenmedium angebotenen Oxalacetat-Konzentrationen als Balkendiagramm. Zu sehen die Mittelwerte ( $\pm$  SEM Standardfehler des Mittelwerts) von 8-16 Oozyten. Im mittleren Anteil (B) Darstellung des [ $^{14}\text{C}$ ]-Succinat-Uptakes in pmol/ Oozyte nach Konversion der Aktivität in Molarität. Im unteren Anteil Darstellung der Ergebnisse im Lineweaver-Burk Plot. Die Mittelwerte der Versuchsreihen ergeben für Oxalacetat eine maximale Umsatzgeschwindigkeit  $V_{\max}$  von 141,44.  $K_m$  beträgt 4,29

## 4. Diskussion

---

### 4.1. Lebensverlängernde Kalorienreduktion

Kalorienrestriktion (CR) verbessert die Gesundheit und verlängert die Lebensdauer in einer Vielzahl so unterschiedlicher Arten wie dem Nematoden *C. elegans*, der Taufliege *Drosophila melanogaster* und Nagetieren (99, 100). Obwohl bislang nicht abschließend geklärt werden kann, ob der positive Effekt durch die Reduktion der Gesamtkalorienmenge oder alternativ durch die verminderte Aufnahme bestimmter Nährstoffe vermittelt wird, nimmt das Interesse an seiner lebensverlängernden Wirkung zu.

Während in Nematoden ein positiver Effekt höchstwahrscheinlich durch die Beteiligung der Gene *age-1* und *age-2* vermittelt wird, übernimmt bei *Drosophila melanogaster* das Gen *INDY* die Rolle eines lebensverlängernden Alterungsgens (101). Mutationen im *INDY*-Gen bewirken eine der Kalorienrestriktion vergleichbare Lebensverlängerung (101). Die optimale Lebensverlängerung konnten beobachtet werden, wenn die *INDY*-mRNA-Expression zwischen 25 und 75% des Normalwertes liegt (101).

In *Drosophila melanogaster* verlängern Mutationen des *INDY*-Gens die Lebensdauer drastisch (1). Das von *INDY* exprimierte Protein ist ein Transmembran-Transporter, der Zwischenprodukte des Krebs-Zyklus (Citrat, Succinat, Fumarat und alpha-Ketoglutarat) transportiert. Der Transporter findet sich hauptsächlich in der Plasmamembran von Zellen im Mitteldarm, im Fettkörper und Oenocyten der Fliegen (102). Hierbei handelt es sich allesamt um Gewebetypen, die für die Aufnahme und Speicherung von Nährstoffen für den Stoffwechsel wichtig sind (102).

Der biologische Sinn, bei hohem Nahrungsangebot Signale zur Erhöhung der Zellteilungsaktivität und gleichzeitig zur Verkürzung der Lebensdauer zu erzeugen, sie bei restriktivem Angebot jedoch zu drosseln und damit die Lebensdauer zu verlängern, ist wahrscheinlich evolutionär begründet (103, 104). Erhöhtes Nahrungsangebot provoziert ein schnelleres Wachstum und eine frühere Reproduktivität, während Nahrungsmangel zu einer längeren reproduktiven Lebenszeit führt (103, 104).

Der Signalweg, über den Kalorienrestriktion die Lebenserwartung erhöht, ist bislang nicht umfassend aufgeklärt. Bekannt ist, dass Nahrungsmangel die Aktivität von Sirtuinen erhöht, NAD<sup>+</sup>-abhängige Decarboxylasen. Sie decarboxylieren Proteine, unter anderem FOXO3, und aktivieren sie dadurch. Gleichzeitig hemmen die Decarboxylasen p21 und p53, wichtige Faktoren der Seneszenz (105).

## 4.2. INDY-vermittelter Efflux

In dieser Arbeit wurde durch die Verwendung INDY exprimierender Oozyten von *Xenopus laevis* herausgefunden, dass der Transport von Citrat aus dem Zellinneren über die Zellmembran hinweg ins Außenmedium, der so genannte Citrat-Efflux, durch externe Zwischenmetabolite des Krebs-Zyklus stimulierbar ist. In mehreren Versuchsreihen wurde in dieser Arbeit den INDY-exprimierenden Oozyten die Zwischenmetabolite Succinat, Citrat und Oxalacetat im Außenmedium präsentiert. Im Vergleich zur Kontrollsubstanz Laktat, die keine Affinität zu INDY hat, wurde das interne Citrat im Beisein aller angebotenen Zwischenmetabolite verstärkt aus dem Cytosol über die Zellmembran hinweg nach außen transportiert. Die Ergebnisse zeigen somit, dass der Citrat-Efflux stimulierbar sowohl durch externes Succinat, Citrat als auch Oxalacetat ist. Die höchste Stimulation des Citrat-Effluxes zeigte sich durch extern zugesetztes Citrat. Die Zwischenmetabolite Succinat und Oxalacetat steigerten den Citrat-Efflux, im Vergleich zur Kontrollsubstanz Laktat immer noch deutlich, wenn auch in geringerem Maß als externes Citrat.

Zur Kontrolle wurde in den Experimenten Oozyten herangezogen, die kein *INDY* Gen exprimierten, sondern nur H<sub>2</sub>O mikroinjiziert bekommen hatten. Die Kontrolloozyten zeigten keinerlei Steigerung des Citrat-Efflux als Reaktion auf die externe Zugabe von Succinat. Dies beweist, dass der beobachtete Citrat-Efflux kein unspezifischer Ausstrom war, sondern spezifisch durch den Transporter INDY gesteuert ist.

Insgesamt lassen die Ergebnisse dieser Arbeit den Schluss zu, dass INDY sowohl den Citrat-Efflux als auch den Succinat-Efflux in Anwesenheit von Zwischenmetaboliten des Krebs-Zyklus im Außenmedium vermittelt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde nicht nur der durch *INDY-vermittelte* Efflux von Citrat untersucht, sondern auch der Succinat-Efflux. Vergleichbar den Versuchsreihen mit *INDY*-exprimierende Oozyten wurde in das Innere der Oozyten Succinat injiziert und dem Außenmedium unterschiedliche Zwischenmetabolite zugefügt. Die Ergebnisse (Abbildung 7) zeigen einen spezifisch durch *INDY* gesteigerten Efflux von Succinat. Auch hier zeigten die nur mit H<sub>2</sub>O mikroinjizierten Kontrolloozyten keinerlei Steigerung des Succinat-Effluxes. Dies beweist die Spezifität des Effluxes durch den Transporter *INDY*.

#### **4.3. *INDY* transportiert Dicarboxylate unterschiedlicher Kettenlänge**

Das Gen *INDY* sorgt für den Transport von Citrat, einer der Hauptquellen der Fettsäuresynthese, über die Zellmembran hinweg. Die Transportrichtung über die Zellmembran hängt von den jeweiligen tertiären Konzentrationsgradienten ab.

Die Ergebnisse konnten zeigen, dass das vom Gen *INDY* kodierte Protein ein disulfonischer, Stilben-sensitiver Anionenaustauscher ist, der Dicarboxylate und Citrat über die Plasmamembran transportiert. Die Versuchsbeobachtungen des pH-Wertes legen nahe, dass Citrat bevorzugt als Dicarboxylat, alternativ als Tricarboxylat zusammen mit einem Proton über die Membran transportiert wird. Der Citrat-Transport als Dicarboxylat ist H<sup>+</sup>-abhängig, wie die Ergebnisse unter 3.4 zeigen konnten.

Die in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse bestätigen, dass *INDY* zum Austausch von Dicarboxylaten unterschiedlicher Kettenlängen über die Plasmamembran fähig ist. Außerdem transportiert *INDY* Dicarboxylate unterschiedlicher Redoxzustände über die Plasmamembran, wie der gesteigerte Fumarat-Succinat-Austausch nach Gabe von 1 mM Fumarat ins extrazelluläre Medium zeigen konnte. Auch hier zeigte sich ein DIDS-sensitiver gesteigerter Succinat-Fumarat-Austausch über die Zellmembran.

Der von *INDY*-vermittelte Anionenaustausch erfolgt in beide Richtungen über die Plasmamembran hinweg, wie zusätzliche Untersuchungen des Succinat-Uptakes in dieser Arbeit zeigen konnten. Sowohl der Efflux, als auch der Uptake sind durch *INDY* vermittelt und richten sich nach der Konzentration der zu transportierenden Metabolite. Ist die Konzentration im Außenmedium höher, erfolgt der Transport ins Zellinnere und umgekehrt. Der Einsatz von DIDS und seine Hemmung des Transportes zeigte, dass es

sich bei dem zu beobachtenden Succinat-Uptake wirklich um einen spezifischen INDY vermittelten Transport handelt.

#### **4.4. Selektive Hemmung des Citrat-und Succinat-Effluxes**

Wie die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen können, kommt der durch INDY-vermittelte Citrat-Efflux durch die gleichzeitige Gabe von 0,1 mM DIDS (4,4'-diisothiocyanostilbene-2,2'-disulfonic acid) fast vollständig zum Erliegen. Dies bestätigt frühere Ergebnisse, wonach DIDS die durch INDY-vermittelte Aufnahme von Dicarboxylat und Tricarboxylat hemmt (6). Die durch DIDS vermittelte Hemmung des Citrat-Effluxes macht keinerlei Unterschiede zwischen den Substraten im Außenmedium. Die Versuche zeigten eine Hemmung sowohl bei Succinat, als auch bei Citrat und Oxalacetat, wenn DIDS zugefügt worden war.

Vergleichbar den Versuchsergebnissen des Citrat-Effluxes ist auch der Succinat-Efflux unter Verwendung von DIDS spezifisch gehemmt. So zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass der Succinat-Efflux in INDY-exprimierenden Oozyten ebenfalls spezifisch über INDY vermittelt wird und keine INDY unabhängige Reaktion ist.

Unterschiede gab es beim pH-Wert. Im Gegensatz zum pH unabhängigen Succinat-Transport ist der Citrat-Transport jedoch pH abhängig. Bei niedrigerem pH-Wert (pH 6,0) kam es zu einer merklichen Verstärkung der Citrat-Aufnahme gegenüber einem physiologischen pH-Wert von 7,5. Ob der durch INDY-vermittelte Transport der Zwischenstoffe des Krebs-Zyklusses pH-abhängig ist, hängt somit von den zu transportierenden Metaboliten ab.

Als bemerkenswert gilt, dass die pH-Abhängigkeit des Citrat-Transports in Verbindung mit der pH-Unabhängigkeit des Succinat-Transports eher ein Merkmal von niedrig-affinen Natrium-Dicarboxylat Kotransportern darstellt, wohingegen der für Succinat ermittelte  $K_m$ -Wert im Bereich hoch-affiner Natrium-Dicarboxylat Kotransportern darstellt.

#### **4.5. Elektroneutralität des Anionenaustauschers INDY**

Die Funktion von INDY als unverzichtbarem Anionenaustauscher kann die bereits früher beobachtete Elektroneutralität (102) des durch INDY vermittelten Anionentransport erklären. Der Dicarboxylat-Dicarboxylataustausch, Citrat-Citrat-Austausch und der Austausch von Dicarboxylat gegen Citrat mit einem Proton sind allesamt als elektroneutrale Prozesse vorgegeben. Die Funktion von INDY als einem obligaten Anionenaustauscher steht im Kontrast zu den Natrium-Dicarboxylat-Kotransporter in Wirbeltieren, die den Natrium Gradienten zum Transport über die Plasmamembran nutzen. Zusätzlich zum Tricarboxylat-Dicarboxylataustausch ist INDY außerdem in der Lage, Dicarboxylate unterschiedlicher Kettenlänge über die Membran zu transportieren, wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte. So tauscht es Succinat gegen alpha-Ketoglutarat und Dicarboxylate unterschiedlicher Redoxzustände gegeneinander aus, so wie Succinat gegen Fumarat.

#### **4.6. Keine Unterschiede in der Umsatzgeschwindigkeit**

Während der Arbeit wurde die Teilhypothese aufgestellt, dass der in der Zellmembran lokalisierte Transporter INDY in exprimierenden Oocyten verschieden energiereiche Zwischenprodukte des Krebs-Zyklus mit unterschiedlicher Kapazität bindet und entsprechend mit differenzierender Umsatzgeschwindigkeit vom Außenmedium ins Cytosol transportiert. Laut der Theorie der durch INDY vermittelten Kalorienrestriktion sollten energiereiche Zwischenprodukte mit einer geringeren Kapazität an den Transporter INDY gebunden und von ihm somit mit geringerer Geschwindigkeit über die Zellmembran transportiert werden. Energiearme Zwischenprodukte des Krebs-Zyklus hingegen sollten mit einer höheren Kapazität gebunden und folglich schneller ins Cytosol transportiert werden.

Diese These ließ sich experimentell nicht beweisen, da die hier durchgeführten Untersuchungen keine signifikanten Unterschiede der  $K_m$  und  $V_{max}$  Werte zwischen den untersuchten Zwischenprodukten Citrat, alpha-Ketoglutarat, Succinat, Fumarat und Oxalacetat ergaben. Aufgrund der mangelnden Unterschiede wurde die These im Verlauf der Arbeit verworfen und daher nur exemplarisch weiterverfolgt bzw. nicht bei

allen Zwischenprodukten die Michaeliskonstante bestimmt. Ursächlich könnten die Ergebnisse durch methodische Limitationen begründet sein, insbesondere dadurch, dass eine genaue Zusammensetzung des Cytosols der Oocyten in diesen Messungen vor Versuchsbeginn nicht definiert werden kann.

#### **4.7. Methodische Limitationen der Arbeit**

Das Expressionssystem, das Oozyten von *Xenopus laevis* nutzt, weist im Bereich exakter qualitativer Untersuchungen einige Nachteile auf, die hier erwähnt werden sollten. Die Nachteile des Expressionssystems in Oozyten gegenüber stabil exprimierenden Zelllinien bestehen unter anderem in der Verletzung der Eihülle, bedingt durch die Injektion. Dies kann sich nachteilig auf die Expression auswirken. Zusätzlich können die verwendeten Eizellen, trotz stringenter Auswahl der Eizellen im Dumont-Stadium V-VI, Unterschiede in ihrer Entwicklung aufweisen, die bei Zelllinien nicht auftreten. Aufgrund dieser möglichen Fehlerquellen weichen die Messergebnisse teilweise deutlich voneinander ab, was mit der Expressionsvariabilität in Oozyten zu erklären ist (106). Um die Fehler möglichst gering zu halten, wurde in dieser Arbeit mit einer hohen n-Zahl gearbeitet.

Auf die Qualität der Zellen können sich unter anderem die Temperatur des Inkubators bei der Aufbewahrung, Schwankungen der Außentemperatur bei Versuchsdurchführung, Unterschiede der präparierten Frösche und der Präparationen selbst auswirken. Zu guter Letzt schwankte die Defollikulation möglicherweise. Die Qualität war abhängig vom präparierten Frosch, der Präparation selbst und dem Alter der Oocyten. Auch hier wurden, um die Auswirkung dieser möglichen Fehlerquellen auf die Ergebnisse zu minimieren, mit einer hohen n-Zahl gearbeitet.

Aus der Injektion der cRNA konnten sich ebenfalls Unterschiede innerhalb der Versuche ergeben. Die Konzentration der injizierten cRNA und deren Qualität durch mögliche Verunreinigungen der RNA könnten theoretisch schwanken, wenn dies durch genaustes und sauberes Arbeiten jedoch versucht wurde zu minimieren. Bei Injektion der RNA musste zudem darauf geachtet werden, dass keine Luftblasen in den Injektor aufgezogen wurden. Um die mögliche Fehlerquelle der Verunreinigung der empfindlichen mRNA zu vermeiden, wurde bei Handhabung der mRNA immer sowohl

mit Latexhandschuhen als auch mit Mundschutz an zuvor desinfizierten Arbeitsplätzen gearbeitet.

Die Untersuchung von Transportern in einem fremden System, hier den Oozyten von *Xenopus laevis* birgt die Möglichkeit der Fehlinterpretation. Endogene Proteine, von *Xenopus* exprimiert, sind vorhanden, die nicht den zu untersuchenden humanen Proteinen entsprechen, aber nichtsdestotrotz als Ionenkanäle oder Transportmoleküle agieren können. Möglicherweise aktivieren die endogenen Proteine von *Xenopus* die exprimierten Transporter und verfälschen darüber die Messergebnisse. So wurde beispielsweise in *Xenopus laevis* Oozyten ein endogenes Carnitintransportsystem beschrieben, das sich aber in seiner Transportkapazität und seinen Eigenschaften deutlich von dem exogen exprimierten Carnitintransportsystem unterscheidet (107). Diese Fehlerquelle lässt sich nicht komplett ausschalten, durch Verwendung der spezifischen Hemmung mit DIDS jedoch verringern.

Eine weitere mögliche Fehlerquelle kann die posttranslationale Modifikation in *Xenopus* sein, die sich von der humanen unterscheiden kann, ebenso wie Regulationszustände des Transportproteins (108). Mit letzter Sicherheit lässt sich nicht sagen, ob sich die intrazellulären Signalwege in Oozyten von *Xenopus laevis* von denen in mammalischen Zellen unterscheiden.

Eine weitere Unsicherheit des Messergebnisses lässt sich in der Bipolarität der Oozyten vermuten (109). In der vegetativen Hemisphäre der Oozyte befindet sich natürlicherweise ein Großteil der RNA und die laterale Membranmobilität ist in diesem Bereich der Oozyte wesentlich größer (109, 110). Auch die Verteilung von membranständigen Transportern, Kanälen und Rezeptoren ist in beiden Hemisphären unterschiedlich (109). Außerdem bleibt die Frage unbeantwortet, welchen Einfluss die Injektionsstelle auf die Expressionsrate der injizierten RNA hat (108, 109). Um die letztgenannten möglichen Fehlerquellen in dieser Arbeit zu minimieren, wurde durchgehend mit hohen n-Zahlen gearbeitet und viele Oozyten von verschiedenen Fröschen in den Versuchen verwendet und die Ergebnisse abschließend über alle Versuche gemittelt.

#### 4.8. INDY: mögliches therapeutisches Ziel für die Behandlung von Diabetes Typ II und Adipositas

Ergebnisse im Fadenwurm *C. elegans* implizieren eine mögliche Rolle von INDY im Lipidmetabolismus, wie verminderte Expressionen eines Homologs zu INDY, des Na-Citrat Kotransporters *ceNaC-2*, durch Reduktion des Lipidgehalts und einer verlängerten Lebensspanne zeigte (111, 112). Somit besteht die Möglichkeit, dass INDY durch die Bereitstellung von Citrat als Metabolit für die Lipidgenese, auch in der Entstehung von Störungen des Lipidstoffwechsels wie bei Adipositas und möglicherweise Diabetes Typ II eine wichtige Rolle spielen könnte.

Unterstützung findet diese Hypothese durch Veröffentlichungen der Arbeitsgruppe um A. Birkenfeld. Sie spürten dem INDY Homolog SLC13A5 von Säugetieren in einem Knockout Mausmodell nach (113). Die Deletion von *mINDY* in Mäusen (*mINDY*<sup>-/-</sup> Mäuse) reduziert die hepatozelluläre ATP/ADP Ratio, aktiviert hepatisches AMPK, induziert PGC-1 $\alpha$ , hemmt ACC-2 und reduziert SREBP-1c Level. Dieses Netzwerk fördert die hepatische mitochondriale Biogenese, Lipidoxidation und Energieaufwand und schwächt die hepatische de novo Lipogenese. Zusammengenommen schützen diese Merkmale *mINDY*<sup>-/-</sup> Mäuse vor Adipositas und Insulinresistenz, die sich mit fettreicher Ernährung und Altern entwickelt. Die Studien von A. Birkenfeld und Mitarbeitern zeigen, dass *mINDY* einen profunden Effekt auf den Energiemetabolismus in Mäusen und möglicherweise anderen Säugern hat und legen die Vermutung nahe, dass *mINDY* ein mögliches therapeutisches Ziel für die Behandlung Typ 2 Diabetes und Adipositas sein könnte.

Die Fettsäuresynthese findet hauptsächlich im Cytoplasma der Zellen statt und benötigt Acetyl-CoA, gewonnen aus Citrat, als Hauptquelle (63). Eine entscheidende Rolle in diesem Prozess spielt das mitochondriale Citrat-Transportprotein. *INDY*, dessen Proteinprodukt bisher primär in Plasmamembranen von Zellen des Mitteldarm und Fettkörper von Fruchtfliegen nachgewiesen werden konnte (102), könnte eine ähnlich wichtige Rolle wie das mitochondriale Citrat-Transportprotein haben, indem es Citrat aus der Hämolymphe in die Zellen transportiert und es somit im Cytosol anreichert und der Zelle für die Fettsäuresynthese zur Verfügung stellt. Citratlyasen spalten letztendlich eine Acetylgruppe von Citrat ab und übertragen sie auf Coenzym A, woraus Acetyl-CoA, der Ausgangsstoff für die Lipogenese, entsteht (63). Das im Cytosol vorhandene

Citrat dient sowohl dem mitochondrialen Transportsystem als auch dem über die Plasmamembran. Möglicherweise reguliert das Proteinprodukt von *INDY* durch seinen Citrattransport in die Zelle den Zellstoffwechsel. Denn die im Cytosol vorhandene Menge von Citrat bestimmt die Fettsäuresynthese. Wenig Citrat im Cytosol bedeutet wenig Übertragung von Acetylgruppen auf Coenzym A, und somit weniger Acetyl-CoA als Ausgangsmetabolit für die Fettsäuresynthese.

In dieser Arbeit konnte, wie bereits beschrieben, der durch *INDY* vermittelte Transport der Vorstufen der Lipidgenese über die Zellmembran beschrieben werden. Da die Zwischenmetabolite des Krebs-Zyklus Vorstufen der Lipidgenese sind, steht der hier gezeigte Transport in direktem Zusammenhang mit der möglichen Entstehung von Adipositas und Diabetes Typ II. Eine Beeinflussung, bzw. Herunterregulation der Aktivität von *INDY* könnte somit der Entstehung von Stoffwechselerkrankungen entgegen wirken.

Die in allen bisher untersuchten Spezies gewonnenen Ergebnisse lassen die Hypothese zu, dass eine Reduktion des von *INDY* kodierten Proteins in Zusammenhang mit einer verlängerten Lebensspanne stehen könnte.

## 5. Literatur

---

1. Rogina B, Reenan RA, Nilsen SP, Helfand SL. Extended life-span conferred by cotransporter gene mutations in *Drosophila*. *Science*. 2000;290(5499):2137-40.
2. Pajor AM. Molecular cloning and functional expression of a sodium-dicarboxylate cotransporter from human kidney. *Am J Physiol*. 1996;270(4 Pt 2):F642-8.
3. Chen XZ, Shayakul C, Berger UV, Tian W, Hediger MA. Characterization of a rat Na<sup>+</sup>-dicarboxylate cotransporter. *J Biol Chem*. 1998;273(33):20972-81.
4. von Bülow V. »Denken Sie über den Tod nach?« - »Na, das ist vielleicht ein heiteres Interview!«. In: Speer FW, J., editor. *Süddeutsche Magazin* 21.06.2002.
5. Finch CE, Tanzi RE. Genetics of aging. *Science*. 1997;278(5337):407-11.
6. Puca AA, Daly MJ, Brewster SJ, Matisse TC, Barrett J, Shea-Drinkwater M, et al. A genome-wide scan for linkage to human exceptional longevity identifies a locus on chromosome 4. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(18):10505-8.
7. Masoro EJ. Caloric restriction and aging: an update. *Exp Gerontol*. 2000;35(3):299-305.
8. Piantanelli L, Zaia A, Rossolini G, Piantanelli A, Basso A, Anisimov VN. Long-live euthymic BALB/c-nu mice. I. Survival study suggests body weight as a life span predictor. *Mech Ageing Dev*. 2001;122(5):463-75.
9. Coschigano KT, Clemmons D, Bellush LL, Kopchick JJ. Assessment of growth parameters and life span of GHR/BP gene-disrupted mice. *Endocrinology*. 2000;141(7):2608-13.
10. Flurkey K, Papaconstantinou J, Miller RA, Harrison DE. Lifespan extension and delayed immune and collagen aging in mutant mice with defects in growth hormone production. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(12):6736-41.
11. Aigaki T, Seong KH, Matsuo T. Longevity determination genes in *Drosophila melanogaster*. *Mech Ageing Dev*. 2002;123(12):1531-41.
12. Helfand SL. Neurobiology. Chaperones take flight. *Science*. 2002;295(5556):809-10.
13. Rose MR, Charlesworth B. Genetics of life history in *Drosophila melanogaster*. II. Exploratory selection experiments. *Genetics*. 1981;97(1):187-96.
14. Watson JD, Baker TA, Bell SP, Gann G, Levine M, Losick R. *Watson Molekularbiologie: Pearson Studium*; 2010. 960 p.
15. Pijl H. Longevity. The allostatic load of dietary restriction. *Physiol. Behav*. 2012;106(1):51-7.
16. Mair W, Piper MDW, Partridge L. Calories Do Not Explain Extension of Life Span by Dietary Restriction in *Drosophila*. *PLoS Biology*. 2005;3(7):e223.
17. Osborne TB, Mendel LB. The effect of retardation of growth upon the breeding period and duration of life in rats. *Science*. 1917;45:294-5.
18. McCay CM, Crowell MF, Maynard LA. The effect of retarded growth upon the length of life span and upon the ultimate body size. *The Journal of Nutrition*. 1935;10:63-79.
19. Masoro EJ. Caloric Restriction: A Key to Understanding and Modulating Aging. (included in Series: Research Profiles in Aging,1). 2002:183.
20. McCay CM, Maynard LA, Sperlina G, Barnes LL. Retarded growth, life span, ultimate body size and age changes in the albino rat after feeding diets restricted in calories. *The Journal of Nutrition*. 1939;18:1-13.
21. Iwasaki K, Gleiser CA, Masoro EJ, McMahan CA, Seo EJ, Yu BP. Influence of the restriction of individual dietary components on longevity and age-related disease of Fischer rats: the fat component and the mineral component. *J Gerontol*. 1988;43(1):B13-21.
22. Masoro EJ, Iwasaki K, Gleiser CA, McMahan CA, Seo EJ, Yu BP. Dietary modulation of the progression of nephropathy in aging rats: an evaluation of the importance of protein. *Am J Clin Nutr*. 1989;49(6):1217-27.

23. Dalderup LM, Visser W. Influence of extra sucrose in the daily food on the life-span of Wistar albino rats. *Nature*. 1969;222(198):1050-2.
24. Iwasaki K, Gleiser CA, Masoro EJ, McMahan CA, Seo EJ, Yu BP. The influence of dietary protein source on longevity and age-related disease processes of Fischer rats. *J Gerontol*. 1988;43(1):B5-12.
25. Yu BP, Masoro EJ, McMahan CA. Nutritional influences on aging of Fischer 344 rats: I. Physical, metabolic, and longevity characteristics. *J Gerontol*. 1985;40(6):657-70.
26. Zimmerman JA, Malloy V, Krajcik R, Orentreich N. Nutritional control of aging. *Exp Gerontol*. 2003;38(1-2):47-52.
27. Miller RA, Buehner G, Chang Y, Harper JM, Sigler R, Smith-Wheelock M. Methionine-deficient diet extends mouse lifespan, slows immune and lens aging, alters glucose, T4, IGF-I and insulin levels, and increases hepatocyte MIF levels and stress resistance. *Aging Cell*. 2005;4(3):119-25.
28. Weindruch R, Walford RL. *The Retardation of Aging and Disease by Dietary Restriction*. Charles C Thomas, Springfield, IL. 1988.
29. Hofer T, Fontana L, Anton SD, Weiss EP, Villareal D, Malayappan B, et al. Long-term effects of caloric restriction or exercise on DNA and RNA oxidation levels in white blood cells and urine in humans. *Rejuvenation Res*. 2008;11(4):793-9.
30. Larsen PL. Aging and resistance to oxidative damage in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90(19):8905-9.
31. Lin YJ, Seroude L, Benzer S. Extended life-span and stress resistance in the *Drosophila* mutant methuselah. *Science*. 1998;282(5390):943-6.
32. Klass MR. A method for the isolation of longevity mutants in the nematode *Caenorhabditis elegans* and initial results. *Mech Ageing Dev*. 1983;22(3-4):279-86.
33. Friedman DB, Johnson TE. A mutation in the age-1 gene in *Caenorhabditis elegans* lengthens life and reduces hermaphrodite fertility. *Genetics*. 1988;118(1):75-86.
34. Johnson TE. Increased life-span of age-1 mutants in *Caenorhabditis elegans* and lower Gompertz rate of aging. *Science*. 1990;249(4971):908-12.
35. Kenyon C, Chang J, Gensch E, Rudner A, Tabtiang R. A *C. elegans* mutant that lives twice as long as wild type. *Nature*. 1993;366(6454):461-4.
36. Morris JZ, Tissenbaum HA, Ruvkun G. A phosphatidylinositol-3-OH kinase family member regulating longevity and diapause in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 1996;382(6591):536-9.
37. Kimura KD, Tissenbaum HA, Liu Y, Ruvkun G. daf-2, an insulin receptor-like gene that regulates longevity and diapause in *Caenorhabditis elegans*. *Science*. 1997;277(5328):942-6.
38. Briseño C. Altersforschung: Wissenschaftler knacken Methusalem-Gen. *Spiegel Online*. 01.07.2010 – 21:31 Uhr.
39. Greer EL, Brunet A. FOXO transcription factors at the interface between longevity and tumor suppression. *Oncogene*. 2005;24(50):7410-25.
40. Weigel D, Jurgens G, Kuttner F, Seifert E, Jackle H. The homeotic gene fork head encodes a nuclear protein and is expressed in the terminal regions of the *Drosophila* embryo. *Cell*. 1989;57(4):645-58.
41. Clark KL, Halay ED, Lai E, Burley SK. Co-crystal structure of the HNF-3/fork head DNA-recognition motif resembles histone H5. *Nature*. 1993;364(6436):412-20.
42. Kaestner KH, Knochel W, Martinez DE. Unified nomenclature for the winged helix/forkhead transcription factors. *Genes Dev*. 2000;14(2):142-6.
43. Flachsbarth F, Caliebe A, Kleindorp R, Blanche H, von Eller-Eberstein H, Nikolaus S, et al. Association of FOXO3A variation with human longevity confirmed in German centenarians. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(8):2700-5.

44. Rensing L. Die Grenzen der Lebensdauer. Von welchen zellulären Faktoren wird das Altern bestimmt? *Biologie in unserer Zeit*. 2007;37(3):190–9.
45. Reznick D, Bryant M, Holmes D. The evolution of senescence and post-reproductive lifespan in guppies (*Poecilia reticulata*). *PLoS Biol*. 2006;4(1):e7.
46. Brunet A, Bonni A, Zigmond MJ, Lin MZ, Juo P, Hu LS, et al. Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell*. 1999;96(6):857-68.
47. Dijkers PF, Birkenkamp KU, Lam EW, Thomas NS, Lammers JW, Koenderman L, et al. FKHR-L1 can act as a critical effector of cell death induced by cytokine withdrawal: protein kinase B-enhanced cell survival through maintenance of mitochondrial integrity. *J Cell Biol*. 2002;156(3):531-42.
48. Zheng WH, Kar S, Quirion R. Insulin-like growth factor-1-induced phosphorylation of the forkhead family transcription factor FKHL1 is mediated by Akt kinase in PC12 cells. *J Biol Chem*. 2000;275(50):39152-8.
49. Clancy DJ, Gems D, Harshman LG, Oldham S, Stocker H, Hafen E, et al. Extension of life-span by loss of CHICO, a *Drosophila* insulin receptor substrate protein. *Science*. 2001;292(5514):104-6.
50. Garofalo RS. Genetic analysis of insulin signaling in *Drosophila*. *Trends Endocrinol Metab*. 2002;13(4):156-62.
51. Lizcano JM, Alessi DR. The insulin signalling pathway. *Curr Biol*. 2002;12(7):R236-8.
52. Buch S, Melcher C, Bauer M, Katzenberger J, Pankratz MJ. Opposing effects of dietary protein and sugar regulate a transcriptional target of *Drosophila* insulin-like peptide signaling. *Cell Metab*. 2008;7(4):321-32.
53. Chapman G, Cleese J, Gilliam T, Idle E, Jones T, Palin M. *Life of Brian*. 1979.
54. FlyBase C. The FlyBase database of the *Drosophila* Genome Projects and community literature. *Nucleic Acids Res*. 1999;27(1):85-8.
55. Fowler K, Partridge L. A cost of mating in female fruitflies. *Nature*. 1989;338(6218):760-1.
56. Partridge LG, A.; Fowler, K. Effects of egg-production and of exposure to males on female survival in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Insect Physiology*. 1987;33(10):745-9.
57. Sohal RS, Buchan PB. Relationship between physical activity and life span in the adult housefly, *Musca domestica*. *Exp Gerontol*. 1981;16(2):157-62.
58. Gargano JW, Martin I, Bhandari P, Grotewiel MS. Rapid iterative negative geotaxis (RING): a new method for assessing age-related locomotor decline in *Drosophila*. *Exp Gerontol*. 2005;40(5):386-95.
59. Marden JH, Rogina B, Montooth KL, Helfand SL. Conditional tradeoffs between aging and organismal performance of Indy long-lived mutant flies. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(6):3369-73.
60. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3rd. ed: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.
61. Sondergaard L. Homology between the mammalian liver and the *Drosophila* fat body. *Trends Genet*. 1993;9(6):193.
62. Wigglesworth VB. *The Principles of Insect Physiology*. Chapman and Hall. 1972;7. Edition:827pp.
63. Brandt U. *Der Citratzyklus in Löffler/Petrides - Biochemie und Pathobiochemie*. 9. Auflage 2014.
64. Wright SH, Wunz TM. Succinate and citrate transport in renal basolateral and brush-border membranes. *Am J Physiol*. 1987;253(3 Pt 2):F432-9.
65. Müller J. *Struktur- und Funktionsanaloga der Cu,Zn-Superoxid-Dismutase*: Eberhard-Karls-Universität Tübingen; 1997.

66. Piddington DL, Fang FC, Laessig T, Cooper AM, Orme IM, Buchmeier NA. Cu,Zn Superoxide Dismutase of Mycobacterium tuberculosis Contributes to Survival in Activated Macrophages That Are Generating an Oxidative Burst. *Infection and Immunity*. 2001;69(8):4980-7.
67. Orr WC, Sohal RS. Extension of life-span by overexpression of superoxide dismutase and catalase in *Drosophila melanogaster*. *Science*. 1994;263(5150):1128-30.
68. Clark DP, Pazdernik NJ. Altern und Apoptose in: *Molekulare Biotechnologie*. Springer Spektrum; 2009. p. 529.
69. Alberts B, Johnson A, Lewis J. *Molekularbiologie der Zelle*. 5. Auflage ed: Wiley-VCH Verlag; 2011.
70. Tissieres A, Mitchell HK, Tracy UM. Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: relation to chromosome puffs. *J Mol Biol*. 1974;84(3):389-98.
71. Nover L. [Molecular cell biology of the heat stress response. Part I]. *Naturwissenschaften*. 1990;77(7):310-6.
72. Haas IG, Meo T. cDNA cloning of the immunoglobulin heavy chain binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988;85(7):2250-4.
73. Hartl FU. Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature*. 1996;381(6583):571-9.
74. Putnam CD, Arvai AS, Bourne Y, Tainer JA. Active and inhibited human catalase structures: ligand and NADPH binding and catalytic mechanism. *J Mol Biol*. 2000;296(1):295-309.
75. Schriener SE, Linford NJ, Martin GM, Treuting P, Ogburn CE, Emond M, et al. Extension of murine life span by overexpression of catalase targeted to mitochondria. *Science*. 2005;308(5730):1909-11.
76. Mehlhorn H. *Grundriß der Zoologie*. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart. 1995;2. durchgesehene und aktualisierte Ausgabe.
77. Storch V, Welsch U. *Kurzes Lehrbuch der Zoologie*. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart. 1994(7. Auflage).
78. Aschheim S. The early diagnosis of pregnancy, chorion-epithelioma and hydatidiform mole by the Aschheim-Zondek test. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 1929;28.:335-42.
79. Dawid IB, Sargent TD. *Xenopus laevis* in developmental and molecular biology. *Science*. 1988;240(4858):1443-8.
80. Weiss J, Becker K, Bernsmann E, Chourbaj S, Dietrich H. *Versuchstierkunde: Tierpflege in Forschung und Klinik*. 4. ed: Enke; 2014. 536 p.
81. Karlsson AM, Bjuhr K, Testorf M, Oberg PA, Lerner E, Lundstrom I, et al. Biosensing of opioids using frog melanophores. *Biosens Bioelectron*. 2002;17(4):331-5.
82. Briggs R, King TJ. Transplantation of Living Nuclei From Blastula Cells into Enucleated Frogs' Eggs. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1952;38(5):455-63.
83. Fischberg M, Gurdon JB, Elsdale TR. Nuclear transfer in amphibia and the problem of the potentialities of the nuclei of differentiating tissues. *Exp Cell Res*. 1959;Suppl 6:161-78.
84. Gurdon JB. The developmental capacity of nuclei taken from differentiating endoderm cells of *Xenopus laevis*. *J Embryol Exp Morphol*. 1960;8:505-26.
85. Davidson EH. *Gene activity in early development*. Academic Press, New York. 1986(3rd Edition).
86. Smith LD, Xu WL, Varnold RL. Oogenesis and oocyte isolation. *Methods Cell Biol*. 1991;36:45-60.
87. Gurdon JB, Lane CD, Woodland HR, Marbaix G. Use of frog eggs and oocytes for the study of messenger RNA and its translation in living cells. *Nature*. 1971;233(5316):177-82.
88. Reardon W, Trembath RC. Pendred syndrome. *J Med Genet*. 1996;33(12):1037-40.

89. Kritz W. in Benninghof: Nieren und harnableitende Organe. Urban & Schwarzenberg. 1994:25-67.
90. Wagner CA, Friedrich B, Setiawan I, Lang F, Broer S. The use of *Xenopus laevis* oocytes for the functional characterization of heterologously expressed membrane proteins. *Cell Physiol Biochem*. 2000;10(1-2):1-12.
91. Bezanilla F, Stefani E. Gating currents. *Methods Enzymol*. 1998;293:331-52.
92. Dumont JN. Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin). I. Stages of oocyte development in laboratory maintained animals. *J Morphol*. 1972;136(2):153-79.
93. Haubrich R. Hierarchical behaviour in the South African clawed frog *Xenopus laevis* Daudin. *Animal Behaviour*. 1961;Volume 9(1-2):71-6.
94. Goldin AL. Maintenance of *Xenopus laevis* and oocyte injection. *Methods Enzymol*. 1992;207:266-79.
95. Wu M, Gerhart J. Raising *Xenopus* in the laboratory. *Methods Cell Biol*. 1991;36:3-18.
96. Berkowitz BA, Bevins CL, Zasloff MA. Magainins: a new family of membrane-active host defense peptides. *Biochem Pharmacol*. 1990;39(4):625-9.
97. Yalkowsky SH, Zografis G. Potentiometric titration of monomeric and micellar acylcarnitines. *J Pharm Sci*. 1970;59(6):798-802.
98. Stewart AK, Chernova MN, Kunes YZ, Alper SL. Regulation of AE2 anion exchanger by intracellular pH: critical regions of the NH<sub>2</sub>-terminal cytoplasmic domain. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2001;281(4):C1344-54.
99. Fontana L, Partridge L. Promoting health and longevity through diet: from model organisms to humans. *Cell*. 2015;161(1):106-18.
100. Helfand SL, Rogina B. From genes to aging in *Drosophila*. *Adv Genet*. 2003;49:67-109.
101. Wang PY, Neretti N, Whitaker R, Hosier S, Chang C, Lu D, et al. Long-lived Indy and calorie restriction interact to extend life span. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(23):9262-7.
102. Knauf F, Rogina B, Jiang Z, Aronson PS, Helfand SL. Functional characterization and immunolocalization of the transporter encoded by the life-extending gene Indy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(22):14315-9.
103. Ristow M, Birringer M, Schulz TJ. Prävention von Krankheiten und Steigerung der Lebenserwartung durch Kalorienrestriktion. *Aktuel Ernährungsmed*. 2007;32(03):104-9.
104. Pearl R. Pearl R. The rate of living. Being an account of some experimental studies on the biology of life duration. New York: Alfred Knopf; 1928.
105. Wang F, Nguyen M, Qin FX, Tong Q. SIRT2 deacetylates FOXO3a in response to oxidative stress and caloric restriction. *Aging Cell*. 2007;6(4):505-14.
106. Tate SS, Urade R, Getchell TV, Udenfriend S. Expression of the mammalian Na<sup>+</sup>-independent L system amino acid transporter in *Xenopus laevis* oocytes. *Arch Biochem Biophys*. 1989;275(2):591-6.
107. Standen NB, Gray PTA, Whitaker MJ, Company of Biologists., Marine Biological Association of the United Kingdom. Plymouth Laboratory. Microelectrode techniques: the Plymouth Workshop handbook. Cambridge: Company of Biologists Ltd; 1987. ix,256p p.
108. Soreq H. The biosynthesis of biologically active proteins in mRNA-microinjected *Xenopus* oocytes. *CRC Crit Rev Biochem*. 1985;18(3):199-238.
109. Berardi S, Hagenbuch B, Carafoli E, Krahenbuhl S. Characterization of the endogenous carnitine transport and expression of a rat renal Na<sup>+</sup>-dependent carnitine transport system in *Xenopus laevis* oocytes. *Biochem J*. 1995;309 ( Pt 2):389-93.
110. Dascal N. The use of *Xenopus* oocytes for the study of ion channels. *CRC Crit Rev Biochem*. 1987;22(4):317-87.
111. Fei YJ, Inoue K, Ganapathy V. Structural and functional characteristics of two sodium-coupled dicarboxylate transporters (ceNaDC1 and ceNaDC2) from *Caenorhabditis elegans* and their relevance to life span. *J Biol Chem*. 2003;278(8):6136-44.

112. Fei YJ, Liu JC, Inoue K, Zhuang L, Miyake K, Miyauchi S, et al. Relevance of NAC-2, an Na<sup>+</sup>-coupled citrate transporter, to life span, body size and fat content in *Caenorhabditis elegans*. *Biochem J.* 2004;379(Pt 1):191-8.
113. Birkenfeld AL, Lee HY, Guebre-Egziabher F, Alves TC, Jurczak MJ, Jornayvaz FR, et al. Deletion of the mammalian INDY homolog mimics aspects of dietary restriction and protects against adiposity and insulin resistance in mice. *Cell Metab.* 2011;14(2):184-95.

## 6. Eidesstattliche Versicherung

---

„Ich, Carsten Teichert, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Das lebensverlängernde Gen *INDY* kodiert für einen Austausch für Zwischenprodukte des Krebs-Zyklus“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -[www.icmje.org](http://www.icmje.org)) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o.) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Betreuer, angegeben sind.

Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o.) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

## 7. Anteilserklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

---

Carsten Teichert hatte folgenden Anteil an der folgenden Publikation:

Knauf F, Mohebbi N, Teichert C, Herold D, Rogina B, Helfand S, Gollasch M, Luft FC, Aronson PS. The life-extending gene *INDY* encodes an exchanger for Krebs-cycle intermediates. *Biochem J.* 2006 Jul 1;397(1):25-9.

Beitrag im Einzelnen:

Tierhaltung, Tierpflege, Operation der Krallenfrösche, Präparation der Oozyten, Mikroinjektion der Oozyten, Literaturrecherche, Partizipation an der Vorbereitung, Durchführung, Auswertung und graphischen Aufarbeitung sämtlicher Experimente.

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

## **8. Lebenslauf**

---

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

## 9. Publikationsliste

---

Teile dieser Arbeit wurden in folgender Publikation veröffentlicht:

- 1) Knauf F, Mohebbi N, Teichert C, Herold D, Rogina B, Helfand S, Gollasch M, Luft FC, Aronson PS. The life-extending gene *INDY* encodes an exchanger for Krebs-cycle intermediates. *Biochem J.* 2006 Jul 1;397(1):25-9.

Teile dieser Arbeit wurden auf folgenden Kongressen vorgestellt:

- 1) "The Life-Extending Gene *Indy* Encodes an Exchanger for Krebs-Cycle Intermediates"  
Felix Knauf, Nilufar Mohebbi, Carsten Teichert, Diana Herold, Blanka Rogina, Stephen Helfand, Peter S. Aronson, Maik Gollasch, Friedrich C. Luft  
Free Communication at American Society of Nephrology Renal Week, San Diego, USA 2003
- 2) "Identification of the transport mechanism mediated by the life-extending gene *Indy*"  
Felix Knauf, Carsten Teichert, Nilufar Mohebbi, Diana Herold, Blanka Rogina, Stephen Helfand, Peter S. Aronson, Maik Gollasch, Friedrich C. Luft  
Oral Session & Poster Session at World Congress of Nephrology, Berlin, Germany 2003

## 10. Danksagung

---

Besonders danken möchte ich Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Maik Gollasch, der es mir überhaupt erst ermöglichte, in seiner Arbeitsgruppe und unter seiner hervorragenden wissenschaftlichen Betreuung an diesem sehr interessanten Projekt zu arbeiten.

Ganz herzlich möchte ich mich bei Herrn Dr. med. Felix Knauf für die tolle Zusammenarbeit, die stetige Inspiration, die Bereitschaft und Fähigkeit sein tiefgründiges Wissen zu vermitteln, das unglaubliche Durchhaltevermögen und die immense Motivation in der Zusammenarbeit bedanken.

Ein großer Dank gilt Frau Diana Herold deren ruhige Hand auch dann noch die ausreichende Ruhe und Genauigkeit aufwies, als die Meinige bei der Injektion der Oozyten erlahmte.

Der gesamten Arbeitsgruppe danke ich für das gute Arbeitsklima und die große Hilfsbereitschaft bei theoretischen und praktischen Fragen.

Zudem möchte ich mich für die Unterstützung der Charité – Universitätsmedizin Berlin im Rahmen einer studentischen Forschungsförderung bedanken.

Ich danke insbesondere ganz herzlich meiner Familie und meinen Freunden, die mich durch alle emotionalen Höhen und Tiefen der Doktorarbeit begleitet haben.