

# Untersuchung des Einflusses von APOE Isoformen auf die Proteome von Geweben und Zellen

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
*Dr. rer. nat.*  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von  
STEPHANIE BILKE

Institut für Experimentelle Medizin

Kiel 2024



Erster Gutachter: Prof. Dr. Andreas Tholey  
Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Thomas Roeder

Tag der mündlichen Prüfung: 24.07.24  
Zum Druck genehmigt: 24.07.24





# Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herr Prof. Dr. Andreas Tholey für die Möglichkeit meine Doktorarbeit in seinem Arbeitskreis anfertigen zu können. Ich möchte mich für das interessante Thema, die wissenschaftliche Betreuung und die Diskussionen bedanken.

Für die Zweitkorrektur möchte ich mich bei Herr Prof. Dr. Thomas Roeder bedanken.

Zusätzlich möchte ich meinen Dank an Prof. Dr. Gerald Rimbach, Dr. Johanna Rüter und apl. Prof. Dr. Patricia Hübbe für die äußerst angenehme, positive und produktive Kooperation zu dieser Thesis ausdrücken.

Der gesamten Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Tholey gebührt mein Dank für die vielen Diskussionen und die konstruktive Kritik. Besonders bedanken möchte ich mich bei Dr. Philipp Kaulich, Herr Jerome Genth, Frau Britta Steer und Herr Theo Matzanke, welche immer ein offenes Ohr hatten und mich wissenschaftlich sowie freundschaftlich in der Zeit dieser Thesis unterstützt haben. Desweiteren möchte ich mich für die Hilfe zur Bedienung, Kalibrierung und Reinigung von Massenspektrometern bei Herr Patrick Kaleja, Dr. Mohammad Abukhalaf und Dr. Liam Cassidy bedanken.

Ohne die Unterstützung meiner Eltern Doris und Dieter Bilke sowie meiner Tante Andrea Huttenlocher und meinem Bruder Markus Bilke wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Dafür möchte ich mich in ganz besonderem Maße bedanken.

Für die unglaubliche Unterstützung in den letzten drei Jahren, das Korrekturlesen dieser Thesis und die motivierenden Diskussionen bedanke ich mich von Herzen bei meiner Zwillingsschwester Simone Gorski-Bilke.

Zuletzt gilt mein Dank meinem Partner Jan-Henning Raabe-Müske, welcher mir mit Rat und Tat rund um die Uhr zur Seite stand, mich immer unterstützt und mir Rückhalt gegeben hat.

VIELEN DANK!



# Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden Proteomik Analysen basierend auf Flüssigchromatographie-Massenspektrometrie (LC-MS) zur Untersuchung der Effekte der Isoformen Apolipoprotein E3 (APOE3) bzw. E4 (APOE4) in Leber-, Niere- sowie Cortexgewebe von *Targeted Replacement* (TR) Mäusen und in kultivierten Huh7-Zellen verwendet.

Das erste Projekt umfasste die quantitativen *Bottom-Up*-MS Analysen der drei Gewebe (Leber, Niere, Cortex) von APOE3 bzw. APOE 4 TR Mäusen. Zusätzlich wurde der Einfluss der APOE-Isoformen bei unterschiedlichem Zugang der TR Mäuse zu einer fett- und zuckerreichen Ernährung untersucht. In diesen 12 vergleichenden Experimenten wurden unter Verwendung von *Tandem Mass Tags* zwischen 3299-4759 Proteine quantifiziert. Über alle Gewebe konnte über die quantitativen Analysen gezeigt werden, dass durch die Ernährungseinschränkung der Mäuse (*dietary restricted*, DR) die Auswirkungen der APOE-Isoformen auf die jeweiligen Gewebeproteome deutlich minimiert wurden. Insbesondere in den *APOE3* exprimierenden Mäusen wurden hierbei mit der Fettlebererkrankung assoziierte Proteine in den Lebergeweben identifiziert. Die APOE4-Isoform scheint hierbei die pathologischen Auswirkungen der uneingeschränkten (*ad libitum*, AL) Ernährung zu minimieren. Im Vergleich zu den Untersuchungen der Lebern wurden die Effekte zwischen den APOE-Isoformen und Ernährungsformen in Niere- und Cortexgewebe geringer. Die quantifizierten Proteine des Nierengewebes deuten auf eine Veränderung des Phospholipid-Stoffwechsels innerhalb der AL-Mäuse hin, während eine Änderung des Energiestoffwechsel in den DR-Mäusen beobachtet wurde. Interessanterweise konnten im Cortexgewebe keine für neurodegenerative Erkrankungen charakteristischen Proteine bzw. Proteinmuster identifiziert werden. Im zweiten Projekt wurden N-Terminomik Strategien zur Identifizierung von nativen und neo-N-Termini in Lebergeweben von AL- und DR-ernährten APOE3 bzw. APOE4 TR Mäusen angewendet. Die proteolytische Prozessierung von APOE und Keratin 18 (KRT18), einem potentiellen pathologischen Marker für eine Fettlebererkrankung, standen im Fokus der Auswertung. Insgesamt wurden 3113 N-terminale Peptide in den AL- und 1609 in den DR-Mäusen identifiziert. Hierbei konnte eine proteolytische, interne Prozessierung von APOE zwischen den Resten 210-218 innerhalb der AL-, jedoch nicht der DR-Mäuse beobachtet werden. In beiden biologischen Zuständen konnten N-terminale Peptide von KRT18 identifiziert werden, allerdings wurde hierdurch nicht die durch Caspase-3 bzw. -7 generierte Spaltstelle abgedeckt.

Das dritte Projekt dieser Arbeit umfasste die Analyse von potentiellen APOE

Interaktionspartnern durch *Bottom-Up*- und *Middle-Down*-Methoden von co-immunpräzipitierten, APOE3 bzw. APOE4 transfizierten Huh7-Zellen. Fünf bislang unbekannte potentielle Protein-Protein-Interaktionen (PPI) konnten identifiziert werden. Zudem konnte erstmalig die Interaktion von APOE mit dem mitochondrialen Kanalprotein TOM40 in einer funktionellen Studie auf Proteinebene beobachtet werden. Von den insgesamt 11 identifizierten Interaktionspartnern waren fünf mitochondriale Proteine (TOM40, LONP1, VDAC1, VDAC2, VDAC3). Durch den durchgeführten *Middle-Down*-Methodenvergleich konnte deutlich das Potential des *Passively Eluting Proteins from Polyacrylamide gels as Intact species for MS* (PEPPI-MS) Ansatzes für die Analyse von PPI und Generierung neuer Informationen, z.B. zu PTMs oder Proteoformen der PPI, gezeigt werden.

# Abstract

In the present thesis, the effects of Apolipoprotein E3 (APOE3) and E4 (APOE4) isoforms in liver, kidney, and cortex tissue of Targeted Replacement (TR) mice and cultured Huh7 cells were investigated via liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) based proteomics analyses.

The first project comprised quantitative Bottom-Up MS analyses of the three tissues (liver, kidney, cortex) of TR mice that express human APOE3 and APOE4. In addition, the influence of a high-fat and high-sugar diet on TR mice was investigated. These 12 comparative experiments quantified 3299-4759 proteins using tandem mass tags. Across all tissues, the quantitative analyses showed that dietary restriction (DR) of the mice significantly minimized the effects of APOE isoforms on the respective tissue proteomes. In particular, proteins associated with fatty liver disease were identified in the liver tissues of APOE3-expressing mice. The APOE4 isoform appears to minimize the pathological effects of the unrestricted (*ad libitum*, AL) diet. Across the kidney to cortex tissue, the difference between the isoforms and dietary forms decreased significantly. The quantified proteins of the kidney tissue indicate an altered phospholipid metabolism within the AL mice, while an alteration of the energy metabolism was observed in the DR mice. Interestingly, no proteins or protein patterns characteristic of neurodegenerative diseases were identified in the cortex tissue.

In the second project, N-terminomics strategies were applied to identify native and neo-N-termini in liver tissues of AL- and DR-fed APOE3 and APOE4 TR mice, respectively. The analysis focused on the proteolytic processing of APOE and Keratin 18 (KRT18), a potential pathological marker for fatty liver disease. A total of 3113 N-terminal peptides were identified in the AL mice and 1609 in the DR mice. A proteolytic, internal processing of APOE between residues 210-218 was observed within the AL but not DR mice. In both biological states, N-terminal peptides of KRT18 could be identified, but this did not cover the possible cleavage site generated by Caspase-3 or -7.

The third project involved identification of potential APOE interaction partners via Bottom-Up and Middle-Down methods. To do this, co-immunoprecipitation of APOE3 or APOE4 transfected Huh7 cells was performed. Five previously unknown potential protein-protein interactions (PPIs) were identified. In addition, the interaction of APOE with the mitochondrial channel protein TOM40 was observed for the first time in a functional study at the protein level. Five of the 11 interaction partners identified were mitochondrial proteins (TOM40, LONP1, VDAC1, VDAC2, VDAC3). The comparison of the Middle-Down method clearly

demonstrated the potential of the Passively Eluting Proteins from Polyacrylamide gels as Intact species for MS (PEPPI-MS) approach for analyzing PPI and generating new information, e.g., on PTMs or proteoforms of PPI.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Apolipoprotein E - Struktur, Funktion und Pathophysiologie . . .	1
1.2	Modellorganismen und Proteomanalysen . . . . .	4
1.3	Proteomik und Massenspektrometrie . . . . .	5
<b>2</b>	<b>Zielsetzung der Arbeit</b>	<b>9</b>
<b>3</b>	<b>Quantitative Proteom-Analyse von <i>Mus musculus</i> Gewebe</b>	<b>11</b>
3.1	Einleitung . . . . .	11
3.2	Material und Methoden . . . . .	14
3.2.1	Chemikalien . . . . .	14
3.2.2	APOE3 und APOE4 <i>Targeted Replacement</i> Mäuse . . . . .	15
3.2.3	TMT-6plex Labeling . . . . .	15
3.2.4	C <sub>18</sub> -ZipTip und -SepPak . . . . .	17
3.2.5	Offline C18- <i>reverse phase high</i> pH HPLC-Fraktionierung .	17
3.2.6	Online C18- <i>reverse phase low</i> pH HPLC-Fraktionierung .	18
3.2.7	Datenverarbeitung und statistische Auswertung . . . . .	19
3.3	Ergebnisse und Diskussion . . . . .	20
3.3.1	Qualitätsanalyse des TMT-Labelings . . . . .	20
3.3.2	Quantitative Analyse von Lebergewebe . . . . .	24
3.3.3	Quantitative Analyse von Nierengeweben . . . . .	37
3.3.4	Quantitative Analyse von Cortexgeweben . . . . .	50
3.3.5	Vergleich der differenziell abundanten Proteine . . . . .	61
3.4	Ausblick . . . . .	62
<b>4</b>	<b>N-Terminomik Analysen von <i>Mus musculus</i> Gewebe</b>	<b>65</b>
4.1	Einleitung . . . . .	65
4.2	Material und Methoden . . . . .	68
4.2.1	Chemikalien . . . . .	68
4.2.2	APOE3 und APOE4 <i>Targeted Replacement</i> Mäuse . . . . .	68
4.2.3	TMT-HUNTER Ansatz . . . . .	69
4.2.4	HUNTER-Ansatz . . . . .	70

4.2.5	LC-MS/MS Analyse . . . . .	71
4.2.6	Datenverarbeitung . . . . .	72
4.3	Ergebnisse und Diskussion . . . . .	73
4.3.1	TMT-HUNTER Ansätze . . . . .	73
4.3.1.1	Qualitätsanalyse TMT-Labeling und Anreicherung	73
4.3.1.2	Analyse N-Termini <i>ad libitum</i> Mäuse . . . . .	77
4.3.1.3	Analyse N-Termini <i>dietary restricted</i> Mäuse . . . . .	81
4.3.2	HUNTER Analyse von Lebern der DR-Mäuse . . . . .	83
4.4	Ausblick . . . . .	85
<b>5</b>	<b>Identifizierung von Protein-Protein-Interaktionen mit <i>Bottom-Up</i>- und <i>Middle-Down</i>-Analysen</b>	<b>87</b>
5.1	Einleitung . . . . .	87
5.2	Material und Methoden . . . . .	91
5.2.1	Chemikalien . . . . .	91
5.2.2	Immunpräzipitation von Huh7-Zelllysaten . . . . .	92
5.2.3	In-Lösungs-Verdau . . . . .	92
5.2.4	<i>Middle-Down</i> Ansatz . . . . .	93
5.2.4.1	Probenvorbereitung mit PEPPi Fraktionierung . . . . .	93
5.2.4.2	Probenvorbereitung ohne PEPPi Fraktionierung . . . . .	94
5.2.5	<i>Bottom-Up</i> LC-MS/MS Analyse . . . . .	94
5.2.6	<i>Middle-Down</i> LC-MS/MS Analyse . . . . .	95
5.2.7	Datenverarbeitung . . . . .	95
5.2.7.1	Analyse <i>Bottom-Up</i> Datensätze . . . . .	95
5.2.7.2	Analyse <i>Middle-Down</i> Datensätze . . . . .	96
5.3	Ergebnisse und Diskussion . . . . .	97
5.3.1	<i>Bottom-Up</i> Ansatz . . . . .	98
5.3.2	<i>Middle-Down</i> Ansätze . . . . .	104
5.4	Ausblick . . . . .	110
<b>6</b>	<b>Zusammenfassende Diskussion und Ausblick</b>	<b>113</b>
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>117</b>
	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>137</b>
	<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>141</b>
	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>145</b>
<b>A</b>	<b>Anhang</b>	<b>149</b>



A.1	Software und Geräte . . . . .	149
A.2	Kapitel 3 . . . . .	150
A.3	Kapitel 4 . . . . .	166
A.4	Kapitel 5 . . . . .	171



## 1.1 Apolipoprotein E - Struktur, Funktion und Pathophysiologie

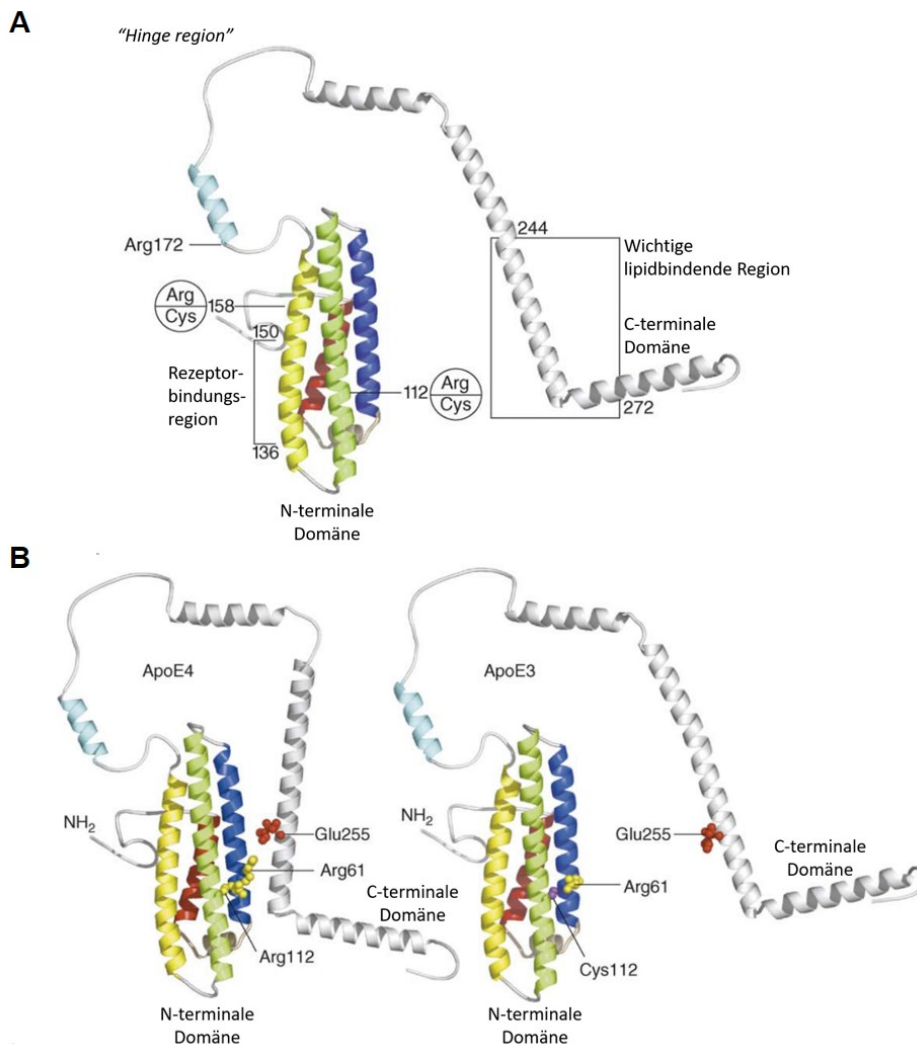
Das peripher zirkulierende 34 kDa Glykoprotein Apolipoprotein E (APOE) ist als ein Proteinbestandteil von Lipoproteinen am Fettstoffwechsel beteiligt. APOE ist hierbei unter anderem entscheidend für die strukturelle Stabilität sowie die Solubilisierung der Lipoproteine. Zusätzlich fungiert APOE in enzymatischen Reaktionen als Cofaktor und ist ein wichtiger Ligand für Lipoproteinrezeptoren.<sup>[1-3]</sup>

Die primäre metabolische Rolle von APOE besteht im Transport von Cholesterin und Triglyceriden zwischen Geweben oder Zelltypen. Das *APOE* Gen ist auf dem Chromosom 19q13.2 lokalisiert, spannt 3597 Nukleotide und produziert während der Proteinbiosynthese das aus 299 Aminosäuren bestehende APOE.<sup>[4,5]</sup> Die Biosynthese der *APOE* mRNA findet dabei hauptsächlich in der Leber statt, jedoch beispielsweise auch im Gehirn (u.a. Cerebraler Cortex), in der Niere und in Makrophagen (<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000130203-APOE/tissue>).<sup>[6,7]</sup>

Der Transport von Cholesterin und Lipiden über die Lymphen und dem Blut erfolgt mittels Lipoproteinpartikel (Lipoproteine). Diese sphärisch- oder diskoidalen Partikel weisen einen hydrophoben Lipidkern auf, welcher primär aus Cholesterinestern und Triglyceriden besteht. Umschlossen ist dieser Kern von amphiphilen Phospholipiden und Cholesterin sowie, als einzige Proteinkomponente, Apolipoproteinen (APO).<sup>[8]</sup> Die Unterteilung der Lipoproteine erfolgt nach physikalischer Dichte. Diese steigt von Chylomikronen über Chylomikronen-Remnants, zu *very-low density lipoproteins* (VLDL), *intermediate density lipoproteins* (IDL), *low density lipoproteins* (LDL) bis hin zu *high density lipoproteins* (HDL) an. APOE ist hierbei mit Chylomikronen, Chylomikronen-Remnants, VLDL sowie IDL assoziiert.<sup>[1,8]</sup>

Apolipoprotein E besteht aus zwei Strukturdomänen, welche über die sogenannte *Hinge region* verbrückt sind (Abb. 1.1 A). Während die N-terminale Domäne aus vier Helices besteht, weist die C-terminale Domäne nur eine  $\alpha$ -Helix auf.<sup>[9]</sup> Innerhalb der N-terminalen Domäne ist die *low-density lipoprotein*-Rezeptor (LDLR)-Bindungsregion lokalisiert. Diese Region weist mit größerer Häufigkeit die basischen Lysin- und Argininreste auf, worüber die Interaktion mit den sauren Resten der Ligand-Bindungsdomäne der LDL-Rezeptoren stattfindet.<sup>[3]</sup> Die vollständige LDLR-Bindungsaffinität von APOE wird jedoch erst nach Lipid-Bindung erreicht. Diese Bindung findet über die hydrophobe Oberfläche der Aminosäure-

Seitenketten zwischen Position 260 und 270 in der C-terminalen Domäne statt.<sup>[10]</sup> Durch diese Lipid-Bindung kommt es zu einer strukturellen Öffnung der N-terminalen Helices, wodurch Helix-Lipid-Interaktionen ausgebildet werden können.



**Abbildung 1.1.:** Strukturmodelle des Lipid-freien APOEs. Die Struktur der C-terminalen Domäne und des Linkers sind nicht bekannt, wurden jedoch auf Grundlage von Strukturvorhersagen und Zirkulardichroismus-Spektroskopie als Helices dargestellt. **A)** Innerhalb der vier Helices (rot, gelb, grün und dunkelblau) der N-terminalen Domäne befinden sich die beiden polymorphen Stellen (Reste 112, 158), welche die drei Isoformen von APOE voneinander unterscheidet. Die LDL-Rezeptor-Bindungsregion ist auf Helix 4 lokalisiert (Reste 136-150). Der über die Hinge region mit dem N-Terminus verknüpfte C-Terminus beinhaltet die lipidbindende Region (Reste 244-272). **B)** Die strukturellen Auswirkungen der Domänen-Interaktion innerhalb von APOE4 (links) und APOE3 (rechts). Abbildung modifiziert nach [11].

Zusätzlich können über die Ligand-Bindungsdomäne mit hoher Affinität Sulfatgruppen von Heparansulfat-Proteoglykanen (HSPG) und das LDL receptor related

*protein* (LRP) gebunden werden.<sup>[12]</sup> Der HSPG/LRP-Stoffwechselweg findet hierbei primär in der Leber statt und ist am Metabolismus von Lipoprotein *Remnants* beteiligt.<sup>[13]</sup>

Das humane APOE ist polymorph und tritt in den drei natürlichen Isoformen APOE2, APOE3 und APOE4 auf, welche sich durch Arginin-Cystein Substitutionen an den Positionen 112 und 158 unterscheiden (Tab. 1.1, Abb. 1.1 A).<sup>[14]</sup> Die LDLR-Bindungsaffinitäten sind hierbei Isoform-spezifisch. Während APOE3 und APOE4 eine ähnliche Affinität aufweisen, ist die Bindungsstärke von APOE2 vergleichend bei unter 2 %.<sup>[15]</sup> Dieser Affinitätsunterschied lässt sich auf das Cystein an Position 158 in APOE2 zurückführen. Als Folge dieser Substitution wird eine Salzbrücke zwischen Arg150 und Arg154 gebildet, welche in den anderen Isoformen zwischen Arg158 und 154 zu beobachten ist. Dies geht mit einer Konformationsänderung von Arg150 sowie den entsprechenden basischen Resten der Rezeptor-Bindungsregion von APOE2 einher. Infolge der geringen Bindungsaffinität ist APOE2 mit einer langsameren Aufnahme von Nahrungsfetten aus dem Blut assoziiert, resultierend in erhöhten Cholesterol- sowie Triglycerid-Leveln und hierdurch Typ III Hyperlipoproteinämie.<sup>[16]</sup>

**Tabelle 1.1.:** Tabellarische Auflistung der voneinander abweichenden Aminosäurereste der APOE-Isoformen.

Isoform	Position	
	112	158
APOE2	Cystein	Cystein
APOE3	Cystein	Arginin
APOE4	Arginin	Arginin

Die Isoformen APOE3 und APOE4 weisen ebenfalls strukturelle Unterschiede in ihren N-terminalen Domänen auf (Abb. 1.1 B). Durch die Cystein-zu-Arginin Substitution an Position 112 in APOE4 werden die vier N-terminalen Helices destabilisiert, woraufhin sich die Seitenkette von Arg61 räumlich neu orientiert und entgegen der Helix ausrichtet. Dies ermöglicht Arg61 mit den sauren Resten der C-terminalen Domäne zu interagieren und Salzbrücken zu Glu255 auszubilden.<sup>[17,18]</sup> In Abbildung 1.1 B) ist zu erkennen, dass daraus folgend die räumliche Lage der C-terminalen Domäne der beiden APOE-Isoformen 3 und 4 verändert vorliegt. Diese Struktur-Differenz resultiert in unterschiedlich stark ausgeprägten Interaktionen zwischen den C- und N-terminalen Domänen (Domänen-Interaktion). In Folge dessen weist APOE4 eine höhere Affinität zur Bindung von VLDL und LDL auf, wohingegen APOE3 bevorzugt HDL bindet.<sup>[19]</sup>

Diese strukturellen Unterschiede stellen unter anderem einen Faktor für die ver-

schiedenen pathophysiologischen Funktionen der APOE-Isoformen dar. Beispielsweise die Assoziationen von APOE4 als Hauptrisikofaktor der neurodegenerativen Alzheimer Erkrankung sowie einem erhöhten Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen.<sup>[20–23]</sup> Hingegen scheint APOE3 ein Risikofaktor bei der Entwicklung von Lebererkrankungen wie der Nicht-alkoholischen Fettleber zu sein, während die APOE4 Isoform als schützender Faktor angesehen wird.<sup>[24,25]</sup>

## 1.2 Modellorganismen und Proteomanalysen

Die Proteomanalyse (*Proteomics*, Proteomik) ist die Analyse des hochdynamischen Proteoms (*protein complement of a genome*)<sup>[26]</sup>, worunter die Gesamtheit aller Proteine einer Zelle, eines Organs oder eines Organismus zu einem bestimmten Zeitpunkt verstanden wird. Die Identifizierung und Quantifizierung des Proteoms umfasst Proteininformationen zu Lokalisierung, Interaktionen, Modifikationen, Funktionen und Strukturen.<sup>[27]</sup> Vergleichend zu Genomanalysen (*Genomics*, Genomik) ist die Analyse des Proteomes weitaus komplexer. Durch co- und posttranskriptionale Modifikationen (alternatives Spleißen) sowie Modifikationen des Translationsproduktes (posttranslationale Modifikationen, PTMs) entsteht eine äußerst hohe Protein-Diversität. Hierdurch steigt die Anzahl an Proteinen und übersteigt die Zahl der ursprünglichen Gene deutlich. Weitere Steigerungen der Komplexität ergeben sich durch die hohe Dynamik der Proteinkonzentrationen, die durch den kontinuierlichen Proteinabbau und die Proteinsynthese entsteht, und die physikochemischen Eigenschaften der Proteine wie Löslichkeit, Hydrophobizität oder Molekülgröße.<sup>[28,29]</sup>

Für die Entwicklung und Validierung neuer proteomischer Methoden sowie für die Erforschung biologischer Mechanismen stellen Modellorganismen ein wichtiges Werkzeug dar. Entscheidend für ein Modellsystem ist die Eigenschaft die natürlichen Bedingungen möglichst genau nachzuahmen, während die Vorteile des Modellorganismus wie Stabilität der Phänotypen, Robustheit und geringe genetische Komplexität erhalten bleiben sollen. Häufig verwendete Modellsysteme stellen Organismen wie beispielsweise Hefe und Bakterien dar, da diese eine geringe biologische Komplexität aufweisen und die äußeren Wachstumsbedingungen genau definiert und kontrolliert werden können.<sup>[30,31]</sup> Da höher entwickelte Tiere allerdings stärker mit dem Menschen verwandt sind können die hieraus erhaltenen Ergebnisse einfacher in einem klinischen Umfeld auf den Menschen übertragen werden.<sup>[31]</sup> Entsprechend stellt die Labormaus (*Mus musculus*, Hausmaus) mit

einer genetischen Ähnlichkeit von mehr als 99 % zum Menschen eines der verbreitetsten Säugetier-Modellsysteme für die Erforschung humaner Erkrankungen dar. Beide Spezies weisen viele gemeinsame physiologische und pathologische Merkmale in verschiedenen biologischen Systemen auf.<sup>[32]</sup> Verglichen mit anderen Säugetieren ist die Lebensspanne der Maus relativ kurz und die Züchtung sowie Haltung in Laboren einfach.<sup>[32,33]</sup> Da das Genom von Mäusen leicht manipuliert werden kann sind beispielsweise maßgeschneiderte Knock-Out und transgene Mäuse kommerziell in großer Zahl erhältlich. Zusätzlich vorteilhaft ist die große Menge Probenmaterial, die im Vergleich zu den häufig verwendeten Organismen wie Hefe, Fliege oder Zebrafisch direkt erhalten werden kann.<sup>[29]</sup> In Kombination mit den gut annotierten und kartierten Proteinsequenz-Datenbanken stellt die Maus somit einen optimalen Modellorganismus für tiefgehende Untersuchungen pathophysiologischer Prozesse, inklusive des Proteoms dar.

## 1.3 Proteomik und Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrie (MS) gewann aufgrund der Möglichkeit Proteine sowohl zu identifizieren als auch zu quantifizieren seit Beginn der Proteomik in den 90er Jahren immer größere Bedeutung.<sup>[34]</sup> Dies wurde unter anderem durch die Entwicklung der weichen Ionisationstechniken „Elektrosprayionisation“ (ESI) und „Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation“ (MALDI) ermöglicht, wodurch erstmals große Biopolymere wie Proteine und Peptide ionisiert werden konnten.<sup>[35,36]</sup> Die Entwicklung des Orbitrap Massenanalysators von MAKAROV im Jahr 1999 und des 2005 kommerziell erhältlichen hybrid LTQ (*linear ion trap*)-Orbitrap Massenspektrometers (Thermo Fisher Scientific) stellte einen weiteren technischen Durchbruch innerhalb der MS-basierten Proteomik dar.<sup>[37,38]</sup>

Die Orbitrap besteht aus einer äußeren, fassförmigen und einer zentralen, spindelförmigen Elektrode. Ionen werden über ein elektrostatisches Feld in der Orbitrap eingefangen und kreisen um die zentrale Elektrode. Hierbei schwingen die Ionen harmonisch, mit einer für das entsprechende  $m/z$ -Verhältnis charakteristischen Frequenz, entlang der Achse der Elektrode. Die Frequenz dieser axialen Schwingungen wird durch die Bildstromdetektion in der äußeren Elektrode mithilfe eines Differenzverstärkers bestimmt, wobei  $m/z$ -charakteristische Sinuswellen erzeugt werden. Diese werden über Fourier-Transformation in Frequenzen umgewandelt, welche umgekehrt proportional zur Quadratwurzel der  $m/z$ -Verhältnisse der Ionen sind.<sup>[37,39,40]</sup>

Das in dieser Arbeit unter anderem verwendete Q Exactive™ plus Massenspektrometer kombiniert den Orbitrap Massenanalysator mit einem Quadrupol-Filter, welcher zur Isolierung von Ionen dient, einer C-Trap sowie einer HCD-Zelle.<sup>[41]</sup> Diese Kombination ermöglicht durch den verbesserten FT-Algorithmus der Bildstrom-Detektion eine höhere Auflösung. Durch parallele Füll- und Detektionsmodi (HCD-Zelle oder C-Trap werden mit Ionen gefüllt) konnte zusätzlich ein höherer Arbeitszyklus und eine schnellere Fragmentierung erzielt werden.<sup>[41,42]</sup>

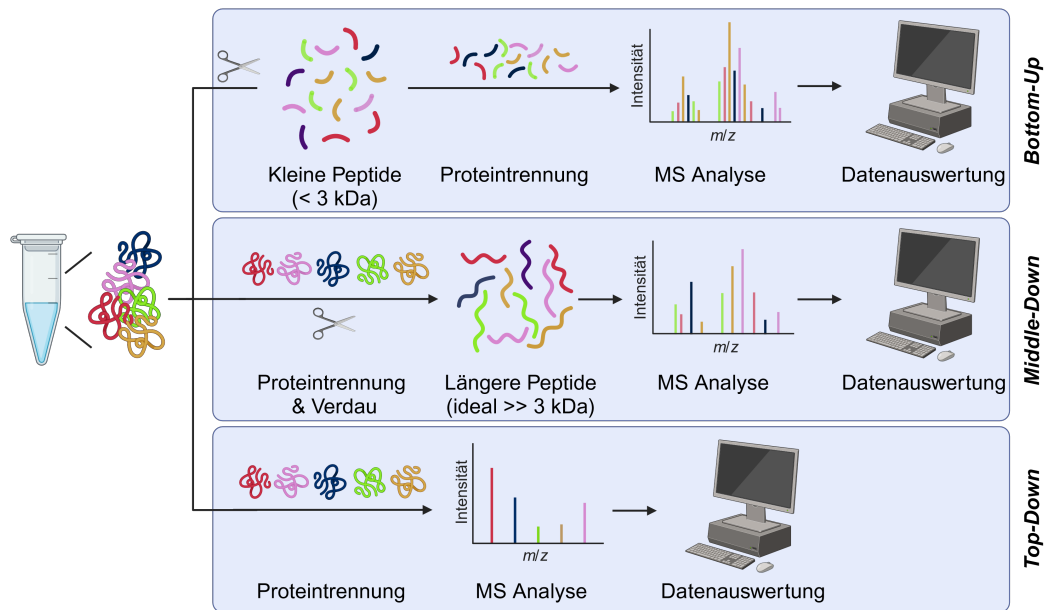
Durch die Verwendung einer (Hochleistungs-)Flüssigchromatographie (*high performance liquid chromatography*, (HP)LC), welche an ein Massenspektrometer gekoppelt ist (LC-MS), wird die Fraktionierung komplexer Proben über einen Zeit- und Lösungsmittelgradienten vor der eigentlichen MS-Analyse ermöglicht. Durch dieses zusätzliche Trennverfahren kann beispielsweise die problematische Ionensuppression, welche durch zeitgleiches eluieren von mehreren Peptiden auftritt, erheblich minimiert und die Identifikation von Proteinen verbessert werden.<sup>[33]</sup>

Mittlerweile zählt die LC-MS zu den durchsatzstärksten, zuverlässigsten und empfindlichsten Methoden für die Identifizierung und Quantifizierung von Proteinmodifikationen und -interaktionen sowie für die Katalogisierung der produzierten Proteine.<sup>[33,34,43,44]</sup>

Der Großteil der durchgeführten LC-MS-basierten Proteomik erfolgt auf Peptid Ebene. Diese *Bottom-Up* (BU, *Bottom-Up* Proteomik (BUP)) genannte Strategie nutzt die durch enzymatischen Verdau gebildeten Peptide und deren für die MS-Analyse vorteilhaften Eigenschaften (Abb. 1.2). Vergleichend mit Proteinen sind Peptide einfacher zu solubilisieren, fraktionieren, ionisieren und fragmentieren vorhersagbarer.<sup>[45]</sup> Die am häufigsten verwendete und oft als „goldener Standard“ bezeichnete Protease Trypsin erzeugt hierbei kleine Peptide (optimal:  $0,7 < M_w < 3$  kDa) die aufgrund ihrer positiven Ladung in der Seitenkette der C-terminalen Aminosäure ideal für die Fragmentierung über die kollisionsinduzierte Dissoziation (*collision-induced dissociation*, CID) sind.<sup>[34,46,47]</sup>

Die durch den Verdau erzeugte hohe Anzahl an Peptiden erhöht die Komplexität der Probe jedoch deutlich, wodurch eine sensitive und effektive Fraktionierung unerlässlich wird. Zusätzlich sind rund 56 % der durch Trypsin erzeugten Peptide zu klein um effektiv an die stationäre Phase des HPLC-Systems zu binden beziehungsweise MS-seitig analysiert zu werden.<sup>[47,48]</sup> Die Rekonstruktion eines Proteins aus den korrespondierenden, detektierten Peptiden, die sogenannte Protein-Interferenz (*protein interference*), stellt eine weitere Herausforderung an die computerbasierte Datenauswertung dar. Infolge von degenerierten Peptiden und Proteinen mit lediglich einem identifizierten Peptid (*One-hit wonders*) wird die Interferenz von Proteinen erheblich erschwert. Eine Wiederherstellung der vollständigen Komplexität des Ausgangsproteins auf Proteoform-Level ist daher nicht möglich.<sup>[49]</sup>





**Abbildung 1.2.:** MS-basierte Proteomik-Strategien: *Bottom-Up*, *Middle-Down* und *Top-Down* Proteomik. Allgemeiner Ablauf der verschiedenen Methodiken mit Darstellung der wichtigsten Schritte. *Erstellt mit Biorender.com*

Diese Informationen können durch die Analyse auf Protein-Ebene der *Top-Down* Proteomik (TDP) erhalten werden (Abb. 1.2, unten). Da die Proteine hierbei keinem enzymatischen Verdau unterzogen werden, bleiben molekulare Informationen wie posttranslationale Modifikationen (PTMs) der Proteoformen erhalten. Allerdings gehen hierdurch die diskutierten Vorteile der Peptide in Bezug auf MS-basierte Analysen verloren.<sup>[44]</sup> Die größten Herausforderungen der TDP sind unter anderem die schlechtere Löslichkeit von intakten Proteinen, die geringe Häufigkeit vieler Proteoformen und die vergleichend zu BUP schlechtere Sequenzabdeckung, wodurch die Lokalisierung von PTMs erschwert wird.<sup>[50,51]</sup> Um die Vorteile der physikochemischen Eigenschaften von Peptiden und den Informationsgehalt von TD-Analysen zu kombinieren wurde eine dritte Proteomik-Strategie entwickelt. Bei der sogenannten *Middle-Down* Proteomik (MDP) werden Proteine ebenfalls enzymatisch verdaut, allerdings mit dem Ziel größere Peptide idealerweise deutlich über 3 kDa zu erhalten (Abb. 1.2). Hierdurch kann eine höhere Sequenzabdeckung vergleichend zu TD-Analysen erzielt werden und im Gegensatz zu BUP mit höherer Wahrscheinlichkeit Modifikationen der unterschiedlichen Proteoformen identifiziert werden. Vergleichend zu BU-Ansätzen wird in MD-Experimenten eine geringere Anzahl an Peptiden generiert und die Komplexität der Probe entsprechend reduziert.<sup>[52–54]</sup>



Das Ziel dieser Arbeit war die Flüssigchromatographie-Massenspektrometrie (LC-MS)-basierte Proteomanalyse der Isoformen des humanen Apolipoprotein E (APOE). Basierend auf etablierten Proteomik Strategien sollten verschiedene Fragestellungen zu Effekten, Interaktionspartner, zellulärer Lokalisierung sowie proteolytische Prozessierung der Isoformen APOE3 und APOE4 untersucht werden.

Bekannt ist, dass die APOE-Isoformen unterschiedlichen Einfluss auf die Funktionen von pathologischen sowie gesunden Zellen und entsprechend auf die Entwicklung von Krankheiten haben. Die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen dieser Auswirkungen sind größtenteils jedoch nicht geklärt. Im ersten Teil dieser Arbeit sollte das APOE Isoform-abhängig produzierte Proteinmuster quantitativ untersucht werden. Für ein besseres Verständnis der gewebespezifischen Effekte von APOE sollten zusätzlich verschiedene Gewebe analysiert werden. Eine weitere zu untersuchende Fragestellung betraf die proteolytische Prozessierung sowie Identifizierung von posttranslationalen Modifikationen, welche Einfluss auf die zellulären Funktionen der Isoformen haben könnten. Hierzu sollten N-Terminomik Strategien neue Informationen insbesondere zu gewebespezifischen, prozessierten Proteoformen liefern. Da Proteine in Organismen kaum alleine sondern in Komplexen agieren, sollten zudem Analysen für die Identifizierung potentieller Protein-Protein-Interaktionen von APOE durchgeführt werden. Durch diese Interaktionen sollten neue Informationen zur zellulären Lokalisierung sowie Funktionen abseits des Fettstoffwechsels von APOE gewonnen werden.



# Quantitative Proteom-Analyse von *Mus musculus* Gewebe

# 3

Teile dieses Kapitels wurden in folgendem Artikel veröffentlicht.

Kapitel 3.3.2

P. Huebbe, S. Bilke, J. Rueter, A. Schloesser, G. Campbel, C.-C. Glüer, R. Lucius, C. Röcken, A. Tholey, G. Rimbach, „Human APOE4 Protects High-Fat and High-Sucrose Diet Fed Targeted Replacement Mice against Fatty Liver Disease Compared to APOE3“, *Aging and disease*, 2024, <https://doi.org/10.14336/AD.2023.0530>.

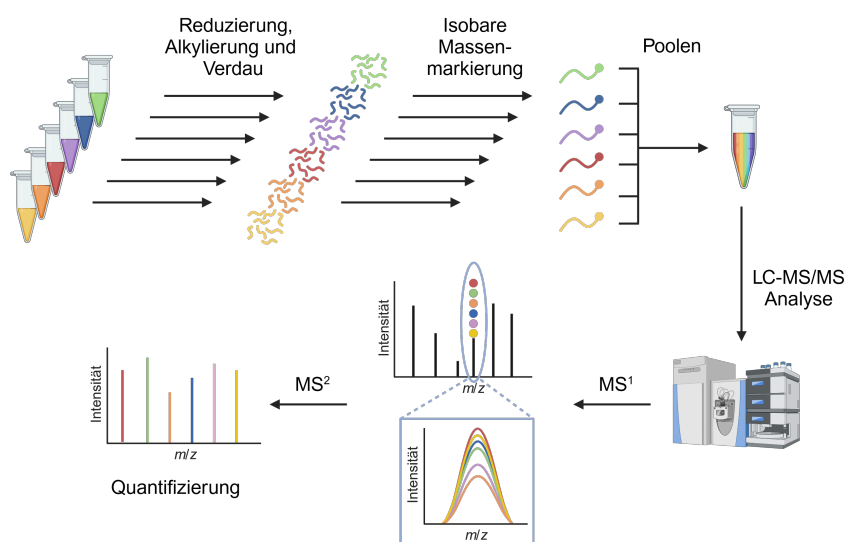
Folgende Arbeiten wurden im Rahmen der vorliegenden Dissertation durchgeführt: Die Probenvorbereitung nach der Zelllyse, wozu der tryptische Verdau, das TMT-Labeling und die abschließende Probenreinigung zählt. Alle Schritte welche mit den Peptidfraktionierungen und weiteren LC-MS/MS Analysen zusammenhängen sowie die abschließende statistische Auswertung der erhaltenen Proteomik-Daten.

## 3.1 Einleitung

In der quantitativen Proteomik wird zwischen relativer und absoluter Quantifizierung unterschieden. Während bei der relativen Quantifizierung die Abundanzverhältnisse der Proteine durch Vergleich verschiedener Proben erhalten werden, ist die Bestimmung der absoluten Proteinkonzentration innerhalb einer Probe das Ziel der absoluten Quantifizierung. Für die relative Quantifizierung stehen aktuell zwei unterschiedliche methodische Ansätze zur Verfügung: die Label-basierte und die sogenannte *label-free* Quantifizierung.<sup>[55–57]</sup>

Die verbreitetste Methode für die MS-basierte relative Quantifizierung ist die Isotopenmarkierung (*stable isotope labeling*). Unter Verwendung der schweren Isotope von Kohlenstoff, Stickstoff, Wasserstoff und Sauerstoff kann das Labeling über metabolische Ansätze (z.B. *stable isotope labeling by amino acids in cell culture* (SILAC)) oder chemische Derivatisierungsprozesse (z.B. Dimethylierung und isobare Massenmarkierung (*isobaric mass tags*)) erfolgen.<sup>[58–61]</sup> Die Labelreagenzien der isobaren Massenmarkierung weisen hierbei eine identische Gesamtmasse auf und unterscheiden sich nur in der Verteilung der schweren Isotope über die Struktur.<sup>[58]</sup> Infolge dessen ist dies die einzige stabil-isotope Methodik, bei welcher identische

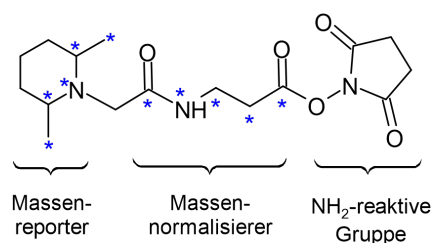
Peptide aus unterschiedlichen Proben auf MS1-Ebene keinen Massenunterschied und entsprechend den gleichen  $m/z$ -Wert aufweisen. Innerhalb der anderen isotopen Methodiken wird mit Hilfe des erhaltenen Massenunterschiedes das relative Abundanzverhältnis der leichten zu den schwereren Peptiden ermittelt.<sup>[62]</sup> Entsprechend den Eigenschaften der isobaren Massenmarkierungen weisen die gelabelten, identischen Peptide von unterschiedlichen Proben die gleiche chromatographische Retentionszeit auf und die korrespondierenden MS1-Signale summieren sich auf (Abb. 3.1). Durch Fragmentation während der MS/MS Analyse werden wiederum Proben-spezifische Signale der Reporterionen mit unterschiedlichen  $m/z$ -Werten generiert, wodurch die relative Quantifizierung der Peptide ermöglicht wird.<sup>[63]</sup>



**Abbildung 3.1.:** Schematischer Ablauf der isobaren Massenmarkierung.

Da die Proben nach erfolgter Markierung mit den isobaren Tags zusammengeführt werden, erfolgt die MS-Analyse dieser Proben simultan (Abb. 3.1). Durch dieses sogenannte *Multiplexing* weist die isobare Massenmarkierung weitere erhebliche Vorteile gegenüber den anderen analytischen Methoden auf.<sup>[64–66]</sup> Wird jede Probe separat oder in kleinen „*Multiplexing*-Einheiten“ gemessen kommt es beispielsweise zwangsläufig zu Variationen zwischen den Analysen. Dies kann sich in deutlich unterschiedlichen Qualitäten der gleichen Spektren widerspiegeln. Desweiteren kann die Auswahl verschiedener Vorläuferionen für die Fragmentierung eine direkte Vergleichbarkeit der erhaltenen Analysen verhindern.<sup>[58,67]</sup> Durch das *Multiplexing* wird die analytische Messzeit erheblich reduziert und gleichzeitig die Variation bei unterschiedlichen Messungen eliminiert. Zusätzlich wird die Anzahl der fehlenden Abundanzwerte zur Quantifizierung der Peptide signifikant minimiert und eine höhere Abdeckung des Proteoms erzielt.<sup>[62,63]</sup>

Der Großteil der derzeit erhältlichen isobaren Massenmarkierungen nutzt Amin-spezifische Labelreagenzien. Diese besitzen den Vorteil, dass das Labeln nahezu aller Peptide unabhängig der vorliegenden Aminosäuresequenz oder proteolytischen Enzymspezifität der verwendeten Protease ermöglicht wird. Ausnahmen stellen bereits modifizierte primäre Aminogruppen dar.<sup>[58]</sup> Neben *isobaric tags for relative and absolute quantitation* (iTRAQ) wird das von THOMPSON *et al.* entwickelte TMT (*tandem mass tag*) zunehmend verwendet.<sup>[60,61]</sup> Diese Tags setzen sich aus drei funktionellen Bausteinen zusammen: dem Massenreporter, dem Massennormalisierer und der NH<sub>2</sub>-reaktiven Gruppe (Abb. 3.2). Die Bindung mit den primären N-terminalen Aminogruppen der Peptide sowie den ε-Aminogruppen der Seitenketten von Lysin findet über die Reaktion mit dem Amin-reaktiven N-Hydroxysuccinimid (NHS) statt. Dieses ist über die Gruppe zur Normalisierung der Masse mit dem Massenreporterbereich verbrückt. Der Massennormalisiererbereich dient zum Ausgleich der unterschiedlichen Massen der Reporterionen, wodurch die verschiedenen Label die gleiche Masse haben. Im Falle des in Abbildung 3.2 dargestellten TMT 6-plex besitzen beide Gruppen die Möglichkeit bis zu fünf schwere Isotope (<sup>13</sup>C und <sup>15</sup>N, blaue Asterisk) einzuführen, wobei sechs isobare Labels erhalten werden können.<sup>[55,58,61]</sup>



**Abbildung 3.2.:** Chemische Struktur des TMT 6-plex-Reagenz mit den möglichen Positionen der schweren Isotope <sup>13</sup>C und <sup>15</sup>N (blaue Asterisks).

Neben den gewünschten Acylierungen der N-Termini und der ε-Aminogruppen von Lysin können ebenfalls Reaktionen der NHS-basierten Labelreagenzien mit den Hydroxylgruppen der Aminosäuren Tyrosin (Tyr, Y), Serin (Ser, S) und Threonin (Thr, T) sowie des sekundären Stickstoffs des Imidazolringes von Histidin (His, H) auftreten.<sup>[63,68]</sup> Diese zusätzlichen Massenmarkierungen werden in der Proteomik als „Überlabeling“ (*overlabeling*) beziehungsweise „überlabelte Aminosäurereste“ bezeichnet. Die Acylierung des Histidinrestes führt zur Bildung des instabilen Intermediates N-Acylimidazol, welches in neutralen und alkischen Milieu innerhalb weniger Minuten hydrolysiert wird.<sup>[63,69,70]</sup> Mehrere Studien zeigten das Tyrosin, Threonin und Serin besonders reaktiv gegenüber NHS-Estern sind, wenn Histidine in räumlicher Nähe zu finden sind (H-X-[STY], [STY]-X-H).<sup>[63,71,72]</sup> Dies liegt in der Reaktivität des instabilen Imidazol-Intermediates gegenüber Nukleophilen begründet, in dessen Folge dieses unter Esterbildung mit den Hydroxylgruppen

reagiert. ZECHA *et al.* beobachteten eine 3 bis 11 mal höhere Wahrscheinlichkeit, dass Tyr, Thr oder Ser mittels TMT gelabelt wurden, wenn diese in Nachbarschaft zu Histidin vorlagen.<sup>[63]</sup>

## 3.2 Material und Methoden

### 3.2.1 Chemikalien

**Tabelle 3.1.:** Verwendete Chemikalien.

Chemikalie	Information
Acetonitril (ACN)	≥ 99,9 %, Sigma-Aldrich
Wasserfreies ACN	≥ 99,5 %, Sigma-Aldrich
Ameisensäure ( <i>Formic Acid</i> , FA)	≥ 98 %, Sigma-Aldrich
Chloroform	≥ 99,8 %, <i>amylene stabilized</i> , Sigma-Aldrich
Deionisiertes Wasser	18,2 MΩ, Arium611-System Satorius
Essigsäure	≥ 99,7 %, Sigma-Aldrich
Iodacetamid (IAA)	≥ 99 %, Sigma-Aldrich
Methanol (MeOH)	≥ 99,6 %, Sigma-Aldrich
<i>RapiGest</i> <sup>TM</sup> SF Tensid	Waters
Triethylammoniumbicarbonat (TEAB)	1M, pH = 8,5 ± 0,1, Sigma-Aldrich
TMTsixplex <sup>TM</sup> Labeling Kit	Thermo Fisher Scientific
Triethylamin (TEA)	Sigma-Aldrich
Trifluoressigsäure (TFA)	≥ 99 %,Sigma-Aldrich
Tris(2-carboxyethyl)phosphin (TCEP)	Sigma-Aldrich
Trypsin (Pierce <sup>TM</sup> , MS-Qualität)	Thermo Fisher Scientific
Universalindikatorpapier (pH = 1-14)	Sigma-Aldrich



### 3.2.2 APOE3 und APOE4 *Targeted Replacement* Mäuse

Die in diesem Abschnitt beschriebene Arbeit wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. RIMBACH (Lebensmittelwissenschaften, Christian-Albrechts Universität zu Kiel) durchgeführt. Aus Gründen der Vollständigkeit und Nachvollziehbarkeit sind die durchgeführten Arbeiten nachfolgend zusammengefasst wiedergegeben.

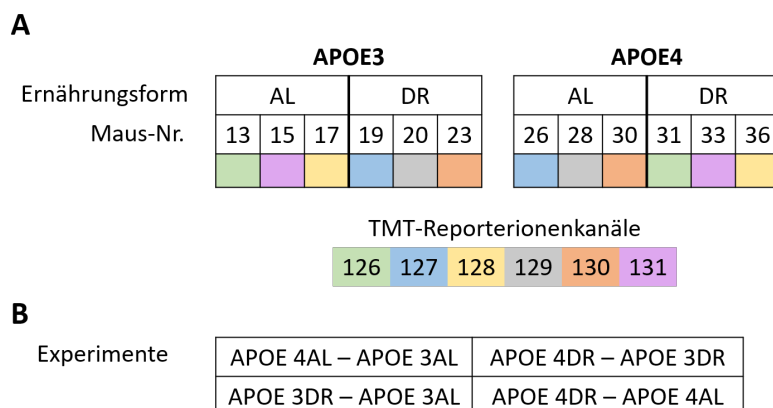
Die gezielt genmodifizierten (*Targeted replacement*, TR) Mäuse, welche humanes Apolipoprotein E3 (*APOE3*) bzw. E4 (*APOE4*) exprimierten, wurden von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. RIMBACH von der Firma Taconic Europe A/S (Ry, Dänemark) erworben. Nach zweiwöchiger Eingewöhnungszeit der 6-7 Wochen alten männlichen Mäuse startete die Studie entsprechend den deutschen Tierenschutzbestimmungen, genehmigt von der örtlichen Tierethikkommission (12 h Tag-/Nachtzyklus; 22-24 °C, 55-60 % Luftfeuchtigkeit). Die Hälfte der Studienmäuse wurden *ad libitum* (AL) mit einer semisynthetischen Diät (Ssniff, TD 88137 modified, Soest, Deutschland; Hauptbestandteile: 21,2 % Fett aus Milch mit 0,2 % Cholesterol; 32,8 % Succrose; 14,5 % Maisstärke) ernährt. Die zweite Hälfte wurde unter 30 %iger Ernährungseinschränkung (*dietary restriction*, DR) gehalten. Die Tötung der Mäuse fand im Alter zwischen 9-10 Monaten unter Einhaltung der Tierschutzbestimmungen nach separater Kohlenstoffdioxid Intoxikation durch zervikale Dislokation statt. Organe, Gewebe und Blut wurden entsprechend entnommen, behandelt, in Flüssigstickstoff schockgefroren und bei –80 °C gelagert.<sup>[73,74]</sup>

Das Gewebe der Leber, Niere und des Cortex wurde in NP-40 Lysepuffer (150 mM NaCl, 50 mM TRIS, 5 mM EDTA, 1 % NP-40 Ersatz mit Proteaseinhibitor Cocktail, Phenylmethylsulfonylfluorid und Phosphataseinhibitor) lysiert. Hierzu wurden die Gewebe mittels TissueLyser II homogenisiert (4 min, 25 Hz), 30 min auf Eis inkubiert, zentrifugiert (20 min, 16000xg) und die Überstände aliquotiert. Die photometrische Proteinbestimmung erfolgte über ein Biocinchoninsäure (BCA) Assay (Pierce™ BCA Protein Assay Kit, Thermo Fisher Scientific).

### 3.2.3 TMT-6plex Labeling

Aliquote von 100 µg Gesamtprotein je Maus wurden mittels Chloroform-Methanol-Wasser-Präzipitation aufgereinigt<sup>[75,76]</sup> und die Präzipitate in 20 µL 0,25 % (w/v) *RapiGest* in 100 mM TEAB resuspendiert. Das Volumen wurde mit 100 mM TEAB

auf 100 µL aufgefüllt, 5 µL 200 mM TCEP zugegeben und bei 55 °C für 1 h inkubiert. Die Alkylierung erfolgte durch Zugabe von 5 µL 375 mM IAA (lichtgeschützt, 30 min, 20 °C). Für den enzymatischen Verdau wurde Trypsin in einem Protease zu Protein Verhältnis von 1:50 (w/w) verwendet. Entsprechend den Herstellerangaben wurden die TMT-6plex-Reagenzien vorbereitet und basierend auf ZECHA *et al.* in einem Verhältnis von 4:1 (Reagenz:Peptide) nach Experimentenschema (Abb. 3.3) zugegeben.<sup>[63]</sup> Überschüssige TMT-Reagenzien wurden mit 8 µL 5 % Hydroxylamin (15 min, 20 °C) abgefangen.



**Abbildung 3.3.:** Übersicht der TMT-6plex Experimente. **A)** Zuteilung der TMT-6plex Reporterionenkanäl zu den *ad libitum* (AL) und *dietary restricted* (DR) ernährten *targeted replacement* (TR) APOE3 und APOE4 Mäuse. **B)** Für Leber-, Niere- und Cortexgewebe durchgeführte Experimente.

Korrespondierend zu dem in Abbildung 3.3 B) dargestellten Experimentendesign wurden für die sogenannte Pre-HUNTER-Analyse je TMT-Kanal 2 µL Lösung zusammengeführt, im Vakuumkonzentrator getrocknet, in 10 µL Ladepuffer (3 % ACN, 0,1 % TFA in deionisiertem Wasser) aufgenommen und über 10 µL C<sub>18</sub>-ZipTip (Pierce™, Thermo Scientific) gereinigt (Kap. 3.2.4). Die getrockneten Proben wurden in 17,1 µL Ladepuffer (c = 0,5 µg/µL) aufgenommen, massenspektrometrisch analysiert und über die Software Proteome Discoverer (PD, V2.2) durchsucht. Die MS-Messungen und PD-Suchen erfolgten analog zu den in Kapitel 3.2.6 bzw. 3.2.7 beschriebenen Parametern, allerdings mit einem verkürzten LC-Gradienten von 90 min. Über die daraus berechneten TMT-6plex Label-Effizienzen wurden die ursprünglichen Proben in gleichem Verhältnis zueinander kombiniert. Nach Einstellung des pH-Wertes mit 70 µL 10 % TFA, C<sub>18</sub>-SepPak (1 cc/50 mg) Reinigung (Kap. 3.2.4) und Trocknung im Vakuumkonzentrator wurden die Proben in 60 µL Eluent A für die Hochdruckflüssigchromatographie (*High Pressure Liquid Chromatography*, HPLC)-Fraktionierung bei pH 10 gelöst.

### 3.2.4 C<sub>18</sub>-ZipTip und -SepPak

Die Probenreinigung über C<sub>18</sub>-ZipTips (10 µL) und -SepPaks (1 cc, 50 mg) erfolgte durch zweimalige Konditionierung der Filter mittels 10 µL bzw. 1 mL 50 % ACN, gefolgt von zweimaliger Equilibrierung mit 10 µL bzw. 1 mL 0,1 % TFA. Die Probe wurde durch 20x auf- und abpipettieren bzw. zweimaliges auftragen geladen und zweimal mit 10 µL bzw. 1 mL 5 % MeOH mit 0,1 % TFA gewaschen. Die Elution erfolgte durch 10 bzw. 400 µL 70 % ACN und 10 bzw. 400 µL 100 % ACN.

### 3.2.5 Offline C18-reverse *phase high pH* HPLC-Fraktionierung

Zur Fraktionierung in der ersten Dimension wurde ein UltiMate™ 3000 HPLC-System (RSLCnano LC-System, Dionex) ausgestattet mit einer C18-reverse *phase* Gemini-Säule (3 µm, 110 Å, 150 x 2 mm, Phenomenex) verwendet. Ungefähr 300 µg der TMT-markierten Peptide (Kap. 3.2.3) wurden, unter Verwendung von Eluent A (72 mM TEA in deionisiertem Wasser, pH 10 mit Essigsäure eingestellt) und Eluent B (72 mM TEA in ACN, 0,35 % (v/v) Essigsäure), bei einer Flussrate von 200 µL/min eingesetzt.<sup>[77]</sup> Hierzu wurde ein fünfminütiger Gradient von 2 zu 5 % B, gefolgt von einem Anstieg zu 50 % B über 50 min und einem fünfminütigen linearen Anstieg zu 95 % B verwendet. Nach weiteren 5 min wurde die Säule für 15 min bei 5 % B equilibriert. Zwei Minuten nach Start der Chromatographie wurde jede Minute eine Fraktion, insgesamt 56 Fraktionen, zu je 200 µL gesammelt. Die Fraktionen wurden im Vakuum getrocknet, in je 20 µL Ladepuffer aufgenommen und gemäß des Poolingschemas (Tab. 3.2) in sieben Pools vereint.

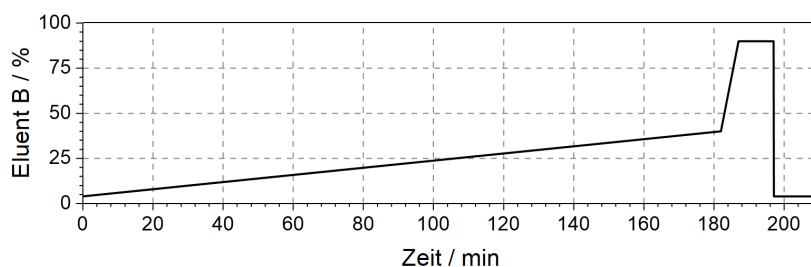
**Tabelle 3.2.:** Poolingschema für die offline 1D C18-reverse *phase high pH* HPLC-Fraktionierung.

Pool	Fraktionen
1	1, 8, 15, 22, 29, 36, 43, 50
2	2, 9, 16, 23, 30, 37, 44, 51
3	3, 10, 17, 24, 31, 38, 45, 52
4	4, 11, 18, 25, 32, 39, 46, 53
5	5, 12, 19, 26, 33, 40, 47, 54
6	6, 13, 20, 27, 34, 41, 48, 55
7	7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56

### 3.2.6 Online C18-reverse phase low pH HPLC-Fraktionierung

Zur Fraktionierung in der zweiten Dimension wurde ein UltiMate™ 3000-RSLCnano-System, ausgestattet mit einer Acclaim™ PepMap™ 100 C18-HPLC-Säule (3 µm, 100 Å, 150 mm x 75 µm) verwendet, welches *online* an ein Q Exactive™ HF bzw. ein Q Exactive™ Plus Orbitrap Massenspektrometer gekoppelt wurde.

Mittels *low* pH-Eluenten A (0,05 % Ameisensäure in deionisiertem Wasser) und B (0,05 % Ameisensäure, 80 % ACN in deionisiertem Wasser) wurden die TMT-markierten Pools (Kap. 3.2.5) separat mit einem Injektionsvolumen von je 4 µL injiziert und bei einer Flussrate von 300 nL/min analysiert. Die Proben wurden in jeweils drei technischen Replikaten gemessen. Die Fraktionierung erfolgte unter Anwendung eines 180 min langen linearen Gradienten von 4 % auf 40 % Eluent B, gefolgt von einem starken Anstieg auf 90 % B (Abb. 3.4). Nach 10 min erfolgte ein steiler Abfall auf 4 % B, dieses Eluenten-Verhältnis wurde für weitere 13 min gehalten und resultierte in einer gesamten Methodenlänge von 210 min.



**Abbildung 3.4.:** LC-Gradient der online *low* pH HPLC-Fraktionierung.

Die massenspektrometrische Analyse der Lebergewebe Proben (Vgl. Abb. 3.3) erfolgte an einem Q Exactive™ HF Orbitrap MS, nachfolgende Analysen des Nieren- und Cortextgewebes an einem Q Exactive™ Plus Orbitrap MS. Alle MS-Messungen erfolgten im *positive Ion mode* und *centroid* Profilmodus bei einer Kapillarentemperatur von 250 °C. Weitere MS Bedingungen sind in Tabelle 3.3 aufgeführt.

**Tabelle 3.3.:** Gewählte MS-Parameter zur Analyse der Maus-Gewebe. U, Spray Spannung; R, Auflösung.

Gewebe	MS Gerät	U <sub>Spray</sub> / kV	R <sub>MS1</sub>	R <sub>MS2</sub>
Leber	Q-Exactive HF	2,1	60.000	15.000
Niere	Q-Exactive Plus	1,9	70.000	17.500
Cortex	Q-Exactive Plus	1,6	70.000	17.500

Die MS1-Spektren wurden mit einem *AGC target* (*Automatic Gain Control*) von  $3 \cdot 10^6$  und einer maximalen Injektionszeit (IT) von 100 ms über einen Scanbereich von 375-1400  $m/z$  aufgenommen. Die 10 intensivsten Vorläuferionen eines MS1 *Full Scans* wurden für die HCD-Fragmentierung verwendet. Hierbei wurden Ionen mit einem Ladungszustand von  $z = +1$  sowie  $z > +6$  nicht berücksichtigt. Die MS2-Spektren wurden mit einem *AGC target* von  $1 \cdot 10^5$  bei einer IT von 100 ms in einem Scanbereich von 200-2000  $m/z$  aufgenommen. Die normalisierte Kollisionsenergie (*Normalized Collision Energy*, NCE) der HCD-Fragmentierung betrug 33 %, bei einem Isolationsfenster von 1,2  $m/z$ . Die Vorläuferionen wurden über ein dynamisches Ausschlussverfahren (*Dynamic Exclusion*) mit einem Wiederholungszeitfenster von 20 s ausgewählt. Die Visualisierung der Rohdaten erfolgte über XCalibur (V3.0.63, Thermo Fisher Scientific).

### 3.2.7 Datenverarbeitung und statistische Auswertung

Die Datenbanksuche der LC-MS/MS Rohdaten (*.raw*) erfolgte in der Software Proteome Discoverer (V2.2.0.388, Thermo Fisher Scientific). Der SequestHT Suchalgorithmus wurde mit der Proteindatenbank des Mausproteoms von UniProt<sup>[78]</sup> (*Mus Musculus*, 55.493 Einträge, Juni 2021) ergänzt durch die Sequenzen der humanen APOE 3 und 4 Isoformen (August, 2021) und bekannten Kontaminanten (cRAP, *list of laboratory and contact dust contaminants*, <https://www.thegpm.org/crap/>, Mai 2021) zur Datenbanksuche der MS-Spektren verwendet. Hierzu wurden folgende Parameter gewählt: Fragmentionen-Massentoleranz (*fragment mass tolerance*) von  $\pm 0,02$  Da; Vorläuferionen-Massentoleranz (*precursor mass tolerance*) von 8 ppm; maximal zwei verpasste Spaltstellen erlaubt; Peptidlänge: mind. 6 Aminosäuren (AA), max. 144 AA; Volltryptischer Verdau. Als variable Modifikation wurde Oxidation (M, +15,995 Da) und als statische Modifikationen wurden Carbamidomethylierung (C, +57,021 Da) und TMT6plex (N-Terminus und K, +229,163 Da) gesetzt. Für die Berechnung der in nachfolgendem Kapitel 3.3.1 (Abb. 3.6) dargestellten über- und „nicht vollständig“-gelabelten Peptide wurden folgende PD-Parameter gewählt. Überlabelt: Variable Modifikation: Oxidation, TMT6plex (H, S, T, Y); Statische Modifikation: Carbamidomethylierung, TMT6plex (N-Terminus und K). Unvollständig gelabelt: Variable Modifikation: Oxidation, TMT6plex (K); Statische Modifikation: TMT6plex (N-Terminus), Carbamidomethylierung. Percolator (V 2.0) wurde zur Steigerung der Empfindlichkeit des Suchalgorithmus, mittels aus *Decoy*-Datenbanksuchen ermittelten q-Werten basierenden *false discovery rate* (FDR) von

0,01 %, verwendet.<sup>[79]</sup> Die von PD erhaltenen normalisierten Datensätze wurden gemäß der durchgeführten Experimente (Abb. 3.3 B) in entsprechende Dateien aufgeteilt.

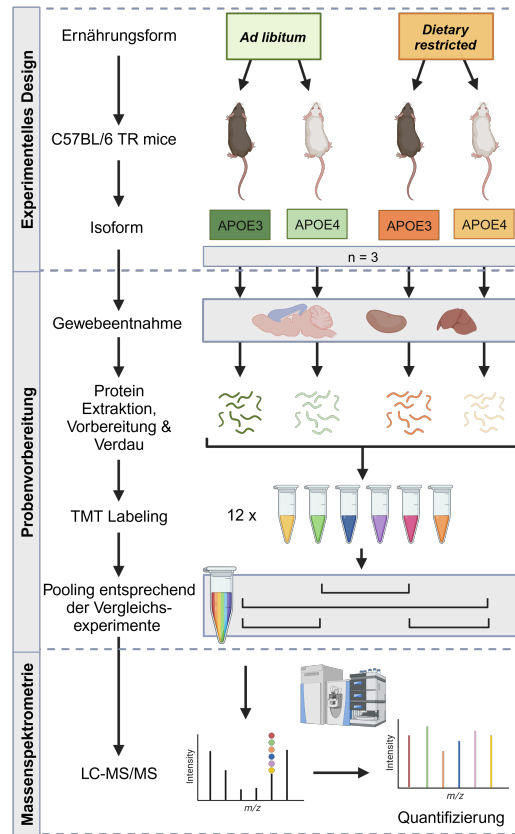
Die statistische Auswertung erfolgte über die Perseus Software (V1.6.15.0).<sup>[80,81]</sup> Zum Vergleich der verschiedenen biologischen Zustände wurden die normalisierten Abundanz-Werte der TMT-Kanäle  $\log_2$  transformiert und über einen doppelseitigen Student's t-Test mit der künstlichen Varianz  $S_0 = 0,3$  untersucht. Durch letztere wird für die Berechnung neben dem  $p$ -Wert auch die Differenz der Mittelwerte herangezogen.<sup>[82]</sup> Für die Korrektur der  $p$ -Werte wurde ein permutationsbasierter FDR-Ansatz mit 250 Randomisierungen und einer FDR von 0,05 verwendet. *Gene Ontology* (GO) Annotierungen (*Molecular Function* (GOMF), *Cellular Component* (GOCC), *Biological Process* (GOBP))<sup>[83–85]</sup> sowie *KEGG-Pathways* (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*)<sup>[86]</sup> wurden zugewiesen. Zusätzlich wurde basierend auf den genannten Annotationen eindimensionale *Annotation Enrichment*- und *Fisher's exact test*-Analysen (exakter Test nach Fisher) durchgeführt (jeweils Benjamini-Hochberg FDR,  $\alpha = 0,05$ ).

## 3.3 Ergebnisse und Diskussion

Für die quantitative Analyse der *APOE3* bzw. *APOE4* exprimierenden, *ad libitum* (lat. nach Belieben; AL) und *dietary restricted* (ernährungsbedingt eingeschränkt, DR) ernährten Mäuse wurden Leber-, Niere- und Cortexgewebe untersucht. Innerhalb einer Gewebeart wurden vier TMT-6plex Experimente durchgeführt, in welchen jeweils zwei biologische Zustände (gleiche APOE-Isoform: unterschiedliche Ernährung; gleiche Ernährung: unterschiedliche APOE-Isoform) miteinander verglichen wurden (Abb. 3.5). Je biologischem Zustand wurden Gewebelysate von drei zufällig ausgewählten Mäusen verwendet, welche in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. RIMBACH von JOHANNA RÜTER aufgearbeitet und lysiert wurden (Kap. 3.2.2).

### 3.3.1 Qualitätsanalyse des TMT-Labelings

Für die Qualitätsanalyse der Derivatisierung durch die TMT-6plex-Reagenzien wurden die Peptidlisten der PD-Datenbanksuchen mit den in Kapitel 3.2.7 erwähnten Parametern exportiert. Zur Bestimmung der Labeleffizienzen wurde die Anzahl der nicht TMT modifizierten Lysine und Peptid N-Termini ins Verhältnis



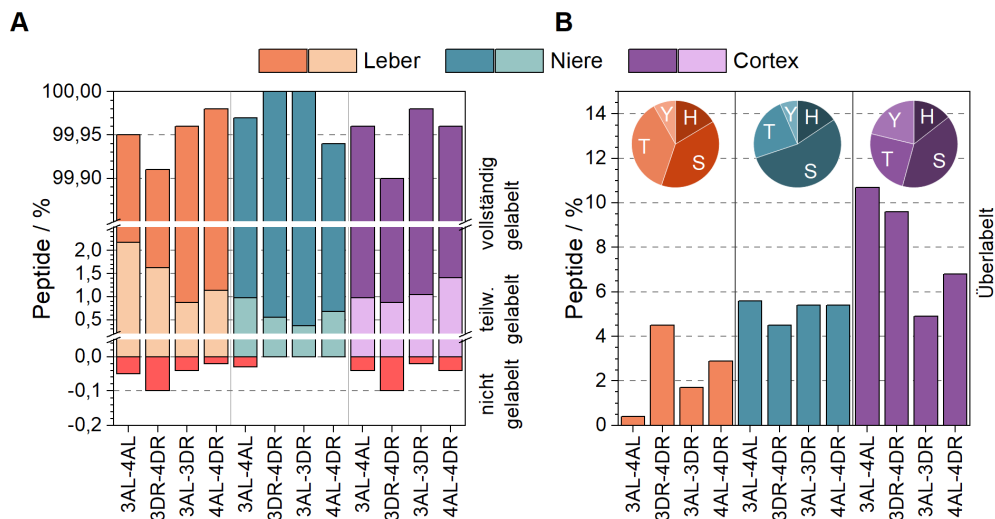
**Abbildung 3.5.:** Experimentelles Design, TMT-Labeling und Massenspektrometrie Schema der quantitativen Analysen. *Erstellt mit Biorender.com.*

zur Gesamtzahl der identifizierten Peptide, entsprechend Gleichung 3.1, gestellt (Abb. 3.6 A).<sup>[87,88]</sup>

$$\text{Labeleffizienz} = \frac{100 \% \cdot (\text{Peptide}_{\text{gesamt}} - \text{Peptide}_{\text{nicht gelabelt}})}{\text{Peptide}_{\text{gesamt}}} \quad (3.1)$$

Zur deutlicheren Darstellung der Label-Qualität wurden die Labeleffizienzen in Abbildung 3.6 A) in Peptide unterteilt, welche jeweils eine TMT-Modifikation an der Seitenkette von Lysin und am N-Terminus (vollständig gelabelt) und in Peptide welche nur einen TMT-Tag (an Lysin bzw. am N-Terminus; teilweise gelabelt) aufwiesen. Prozentual wurden über alle Gewebearten 97,8 % bis 99,6 % der Peptide als vollständig gelabelt identifiziert. Daraus folgernd wurden maximal 2,2 % der Peptide nicht vollständig und nur 0,1 % nicht gelabelt. Da eine Effizienz von >95 % als akzeptabel für eine Quantifizierung gilt können die in dieser Studie erhaltenen Effizienzen als sehr gut klassifiziert werden.<sup>[87,89,90]</sup>

Im Durchschnitt wurden 2,4 % in den Leber-, 5,2 % in den Nieren- und 8,0 % in den Cortexproben als überlabelte Peptide identifiziert (Abb. 3.6 B). Diese Peptide wiesen neben dem gelabelten N-Terminus sowie der  $\epsilon$ -Aminogruppe von Lysin



**Abbildung 3.6.:** Qualitätsanalyse TMT-6plex Labeling aller Gewebeexperimente. **A)** Anzahl der Peptide (in Prozent) welche als vollständig (Lysin und N-Term), teilweise (Lysin oder N-Term) und nicht gelabelt identifiziert wurden. **B)** Prozentual identifizierte überlabelte Peptide mit Angabe des Anteils von Histidin, Serin, Threonin und Tyrosin über alle vier Experimente innerhalb eines Gewebes.

mindestens eine TMT-Modifikation an der Hydroxylgruppe einer der Aminosäuren Serin, Threonin oder Tyrosin beziehungsweise der sekundären Aminogruppe des Imidazolringes von Histidin auf. Über alle drei Gewebearten ist Serin dabei mit einem Anteil von  $\geq 54\%$  am stärksten vertreten gefolgt von Threonin, Histidin und Tyrosin. In ganzen Zahlen wiesen zwischen 63 Peptide (Leber, 3AL-4AL) bis zu 972 Peptide (Cortex, 3AL-4AL) mindestens eine überlabelte Aminosäure auf. Durch das TMT-Überlabeling werden neben den unmodifizierten Peptiden multiple modifizierte Peptide generiert, welche eine unterschiedliche Anzahl an TMT-Tags aufweisen können. In Analogie zu dem Begriff Proteoform können spezifisch modifizierte oder mutierte Peptide, welche die gleiche Aminosäuresequenz am Peptid-Rückgrat aufweisen, als *Peptidoform* bezeichnet werden.<sup>[91,92]</sup>

Das Auftreten multipler Peptidoformen kann zu einer Reduzierung der absoluten Intensitäten der unmodifizierten und modifizierten Peptide führen. Hierdurch können unter anderem die Identifikation und Quantifizierung von posttranslationalen Modifikationen erschwert werden sowie eine allgemeine Problematik für die korrekte Quantifizierung auftreten.<sup>[93]</sup> Aus der Gesamtmasse der identifizierten Peptide wurde untersucht wie viele Peptide mit mehreren Peptidoformen vertreten waren. Zusätzlich wurde der Anteil der durch Überlabeling entstandenen Peptidoformen bestimmt. In den Lebergeweben wurden 6,7 % der Peptide mit mehreren Peptidoformen gefunden, woraus lediglich 1,7 % als Folge von Überlabeling resultierten. Der Durchschnitt in den Nierengeweben betrug 5,6 % multiple modifizierte

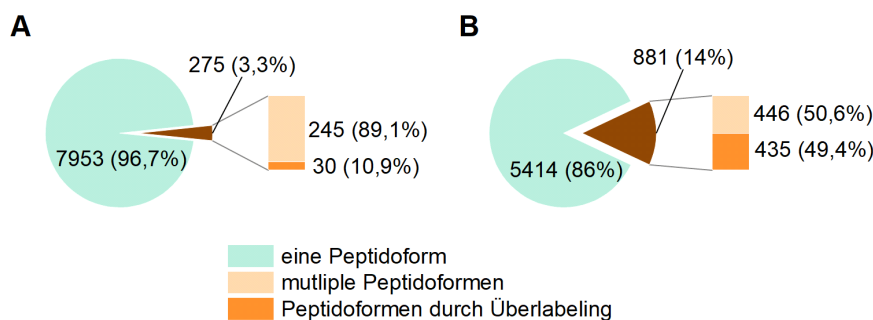


Peptide wovon 2,2 % überlabelt waren. Der Anstieg dieser Zahlen in den Cortexgeweben (11,4 % Peptide mit multiplen Peptidoformen; davon 5,3 % überlabelt) spiegelt dabei die vorherigen Beobachtungen der vergleichsweise höheren Anzahl von überlabelten Peptiden wider (Abb. 3.6 B). Innerhalb des Experimentes 4AL-4DR im Cortexgewebe wurde die höchste Anzahl an Peptidoformen resultierend von einem Peptid beobachtet. Für das Peptid [R].LHFFMPGFAPLTSR.[G] (Tubulin beta-2A chain, Q7TMM9) wurden fünf Peptidoformen gefunden, wobei drei durch die TMT-Modifikationen an Serin bzw. Threonin entstanden sind (Tab. 3.4).

**Tabelle 3.4.:** Identifizierte Peptidoformen des Peptids [R].LHFFMPGFAPLTSR.[G] der LC-MS-Analyse des Experimentes 4AL-4DR Cortexgewebe (Tubulin beta-2A chain, Q7TMM9).

Peptidoform	Modifikationen
[R].LHFFMPGFAPLTSR.[G]	Oxidation (M), TMT (S/T, N-Term)
[R].LHFFMPGFAPLTSR.[G]	Oxidation (M), TMT (N-Term)
[R].LHFFMPGFAPLTSR.[G]	TMT (S/T, N-Term)
[R].LHFFMPGFAPLTSR.[G]	TMT (S, T, N-Term)
[R].LHFFMPGFAPLTSR.[G]	TMT (N-Term)

Vergleichend über alle Peptide der Gewebeexperimente stellt diese hohe Anzahl an identifizierten Peptidoformen die Ausnahme dar. In Abbildung 3.7 sind jene Experimente dargestellt, welche den geringsten und höchsten prozentualen Anteil an durch Überlabeling verursachten Peptidoformen aufwiesen.

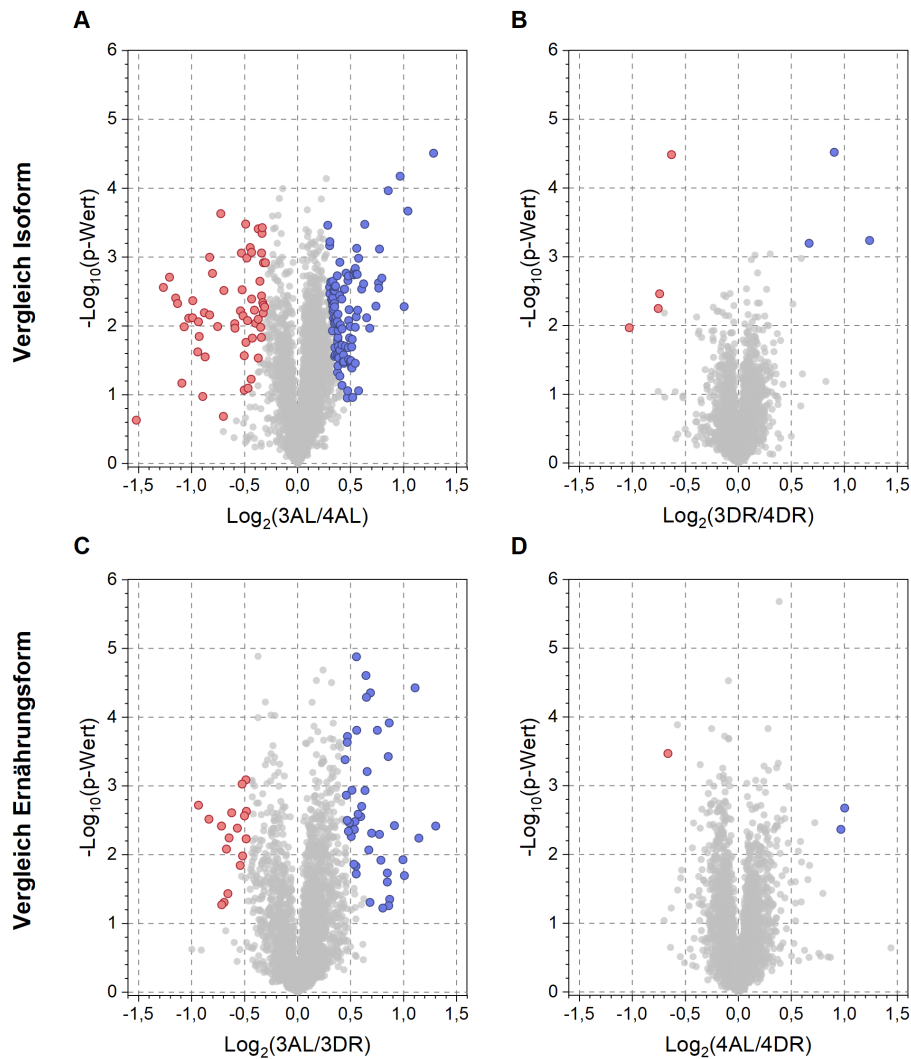


**Abbildung 3.7.:** Darstellung der Experimente mit der A) niedrigsten und B) höchsten Anzahl an Peptidoformen als direkte Folge von Überlabeling. A) Leber 3AL-4AL, B) Cortex 3AL-4AL.

Für das Leberexperiment 3AL-4AL wurde die geringste Anzahl überlabelter Peptide beobachtet, entsprechend wurden lediglich 0,4 % der Peptidoformen durch Überlabeling erhalten (Abb. 3.7 A). Für das Cortexexperiment 3AL-4AL, welches die höchste Anzahl überlabelter Peptide über alle Experimente aufwies, wurde folgend auch die prozentual höchste Anzahl an erhaltenen Peptidoformen beobachtet (Abb. 3.7 B).

### 3.3.2 Quantitative Analyse von Lebergewebe

Die statistische, quantitative Analyse der Gewebe-Proteome der APOE-Mäuse erfolgte unter Verwendung der Software Perseus durch einen zweiseitigen Student t-Test ( $s_0 = 0, 3$ ). Über alle Leberexperimente wurde hierbei eine annähernd identische Anzahl ( $\varnothing$  3536) an Proteinen quantifiziert (Abb. 3.8 A-D, grau; Abb. A.1).



**Abbildung 3.8.:** Volcano-Plots der quantitativen Leberexperimente unter farblicher Hervorhebung der erhaltenen signifikant abundanten Proteine (rot/blau) zwischen den einzelnen biologischen Zuständen. Die statistischen Signifikanzen und p-Werte wurden durch einen zweiseitigen Student t-Test berechnet. Darstellung der vier durchgeführten Experimente: **A)** 3AL-4AL; **B)** 3DR-4DR; **C)** 3AL-3DR; **D)** 4AL-4DR.

Vergleichend dazu zeigten sich deutliche Unterschiede in der Gesamtanzahl der differenziell abundanten Proteine zwischen den vier experimentellen Ansätzen

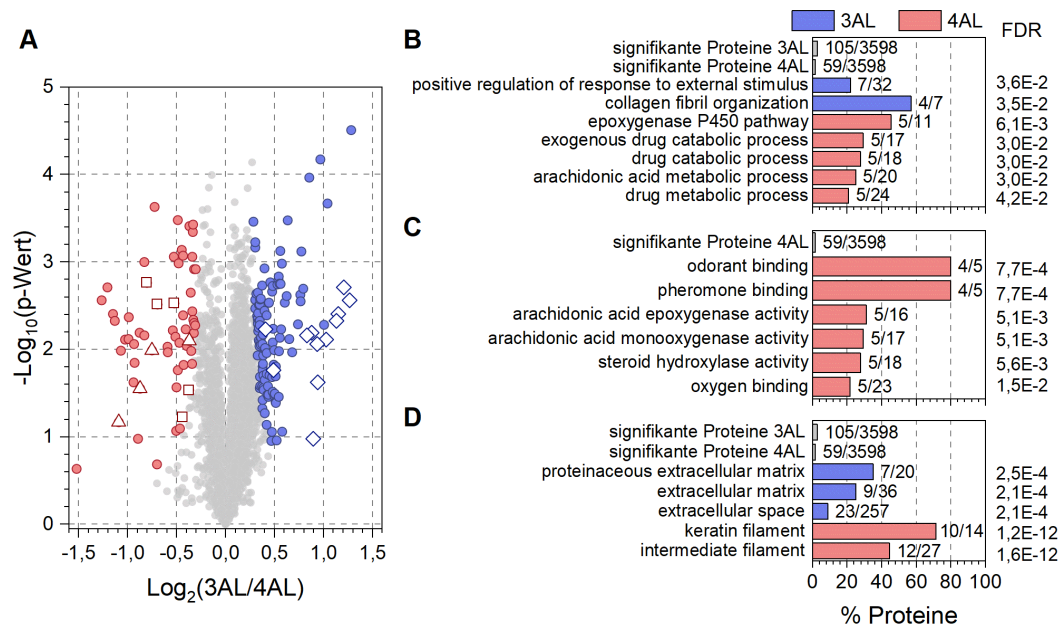
(Abb. 3.8 A-D, rot/blau). Zu erkennen ist, dass bei unbeschränktem Zugang der Mäuse zu einer fett- und zuckerreicher Ernährung (AL) ein deutlicher Genotyp-abhängiger Unterschied mit insgesamt 164 signifikant höher bzw. niedriger abundanten Proteinen aufgetreten ist (Abb. 3.8 A). Dieser Effekt der Genotypen scheint durch Ernährungsbeschränkung (DR) stark minimiert zu werden. Für das entsprechende Experiment 3DR-4DR (Abb. 3.8 B) wurden insgesamt lediglich 7 Proteine identifiziert, welche spezifisch signifikant abundant für einen der beiden Isoform-Typen waren. Innerhalb der beiden Experimente, in welchen die Auswirkungen der Ernährungsform beobachtet wurden (Abb. 3.8 C, D), ist erkennbar, dass für die *APOE3* exprimierenden Mäuse mit 60 signifikant abundanten Proteinen ein deutlicher Effekt auftrat. Für die *APOE4*-Mäuse hingegen scheint die Ernährungsform keinen erheblichen Einfluss auf das Leberproteom zu haben (3 Proteine mit höherer Abundanz). Dies spiegelt sich in den gemittelten Lebergewichten der verwendeten Mäuse wider: die Lebern der *APOE3*-Mäuse waren schwerer als jene der *APOE4*-Mäuse. Innerhalb der *APOE4*-Brutgeschwister wogen die AL-Lebern das 2,7-fache der DR-Lebern. Für die *APOE3*-Mäuse erhöhte sich dieser Faktor auf das 4,1-fache (Abb. A.2).

#### APOE3 AL vs. APOE4 AL

In diesem Experiment wurden die differenziell abundanten hepatogenen Proteine von Mäusen untersucht die unbeschränkten Zugang zu einer zucker- und fettreichen Ernährung (AL) erhielten. Hierfür wurde der Einfluss der *APOE3* Isoform auf das Leberproteom vergleichend zu *APOE4* analysiert. Insgesamt wurden von 3598 quantifizierten Proteinen 164 als differenziell abundant identifiziert, wovon 105 höher und 59 geringer abundant in *APOE3* vergleichend zu *APOE4* auftraten (*APOE3/APOE4*; Tab. A.3, A.4).

Statistische, nicht-zufällige Zusammenhänge zwischen den *Gene Ontology*-Annotationen innerhalb dieser differenziell abundanten Proteine wurden durch *Fisher exact tests* untersucht (Abb. 3.9). Zur Minimierung der Falscherkennungsrate (*false discovery rate*, FDR) und hierdurch Reduzierung von Typ 1-Fehlern (inkorrektore Ablehnung der Nullhypothese) wurde die Benjamini-Hochberg Prozedur mit einem Schwellenwert von 0,05 angewendet. Entsprechend dem THE GENE ONTOLOGY CONSORTIUM werden drei Kategorien zur Beschreibung der Genfunktionen ausgegeben: „*Molekulare Funktion (MF)*: die von einem Genprodukt auf molekularer Ebene ausgeführten Aktivitäten; *Zelluläre Komponente (CC)*: die Orte, an denen MFs ausgeführt werden, bezogen auf zelluläre Strukturen; *Biologische Prozess (BP)*: ein biologisches Programm, das molekulare Aktivitäten umfasst, die zusammenwirken,

um ein bestimmtes Ergebnis zu erzielen“.<sup>[85]</sup>



**Abbildung 3.9.:** GO-Annotationen des Leberexperimentes 3AL-4AL basierend auf dem Fisher's exact test. **A)** Volcano-Plot: Proteine der Annoationen *epoxygenase P450 pathway* (GOBP, Quadrate), *odorant binding* und *pheromone binding* (GOMF, Dreiecke) sowie des *intermediate filament* (GOCC, Rauten). **B)** GOBP-, **C)** GOMF- und **D)** GOCC-Annotationen. Aus Gründen der Transparenz und eindeutigen Zuordnung wurden die Annotationen entsprechend der GO-Datenbank in englischer Sprache beibehalten.

Basierend auf den 59 Proteinen, welche höher abundant in APOE4 AL-Mäusen auftraten, resultierten fünf angereicherte GOBP-Annotationen (Anreicherungs-faktoren: 12,7 - 27,7; Abb. 3.9 B, rot). In diese Prozesse waren die identischen fünf Proteine der Cytochrom P450-Familie involviert (Tab. 3.5; Abb. 3.9 A, Quadrate), welche eine Sequenzhomologie von 51,2 % bei 253 identischen Aminosäure-Positionen aufwiesen.

**Tabelle 3.5.:** Der GOBP-Annotationen der APOE4 AL Mäuse zugrunde liegenden signifikant abundante Cytochrome.

Protein	Protein-Accession	Gen	MW / kDa
Cytochrom P450 2C29	Q64458	<i>Cyp2c29</i>	55,7
Cytochrom P450 2C37	P56654	<i>Cyp2c37</i>	55,6
Cytochrom P450 2C44	E9Q5K4	<i>Cyp2c44</i>	56,4
Cytochrom P450 2C50	Q91X77	<i>Cyp2c50</i>	55,7
Cytochrom P450 2C54	Q6XVG2	<i>Cyp2c54</i>	55,8

Zwei dieser identifizierten biologischen Prozesse waren der Epoxygenase P450- (GO:0019373) und der Arachidonsäurestoffwechselweg (GO:0019369). Im gesamten Datensatz wiesen von 3598 Proteinen 11 die GOBP-Annotation „Epoxygenase P450-Stoffwechselweg“ auf (Abb. 3.9 B). Von diesen 11 Proteinen wurden 5 innerhalb der 59 signifikant abundanten Proteine der APOE4-Mäuse gefunden, dies entspricht über 40 % dieser Proteine. Bei den vorherig genannten verwandten Stoffwechselwegen wird unter anderem Arachidonsäure durch Cytochrom P450 Proteine (CYP) zu biologisch aktiven Verbindungen wie Epoxyeicosatriensäuren (EETs) epoxidiert.<sup>[94,95]</sup> Neben der gefäßerweiternden Wirkung, weisen EETs zusätzlich eine entzündungshemmende Wirkung auf Blutgefäße sowie die Niere auf und fördern die Angiogenese (Aussprossung neuer Blutgefäße).<sup>[95–97]</sup> SCHUCK *et al.*<sup>[98]</sup> untersuchten die Leber von Mäusen, welche eine fett- und cholesterinreiche Ernährung nach dem Diätmodell der Nicht-alkoholischen Fettlebererkrankung/nicht-alkoholischen Steatohepatitis (NAFLD/NASH) erhielten. Die Autoren konnten dabei feststellen, dass die Genexpression des Arachidonsäurestoffwechsels beziehungsweise die EET-Biosynthese in jenen Mäusen pathologisch unterdrückt wurde. Dies wurde auf die Unterdrückung der Expression der CYP und hierbei vor allem der *Cyp2c*- und *Cyp2j*-Epoxygenasen zurückgeführt (Vgl. Tab. 3.5).<sup>[98]</sup> Werden diese Beobachtungen in Kontext zu den hier vorliegenden Ergebnissen gesetzt, wird die Wichtigkeit von umfänglichen Proteomanalysen deutlich. Basierend auf den Ergebnissen des *Fisher exact tests* wurde gezeigt, dass die oben genannten Stoffwechselwege in APOE4 in Relation zu APOE3 produzierenden Mäusen mit erhöhter Abundanz bei gleicher Ernährung auftreten. Dies bedeutet, dass der APOE4-Genotyp vor den pathologischen Auswirkungen einer fett- und zuckerreichen Ernährung und damit verbunden vor NAFLD und NASH schützen könnte.

Diese These wird durch die zusätzlichen, zur massenspektrometrischen Proteomanalyse durchgeführten Analysen von HÜBBE *et al.*<sup>[24]</sup> unterstützt. Durch histopathologische Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Lebersteatose (Fettleber) in APOE3 Mäusen im Vergleich zu ihren APOE4 Brutgeschwistern stärker ausgeprägt waren und einen höheren NASH-Aktivitätswert erreichten. Zusätzlich wurde über gezielte quantitative Echtzeit-PCR- und Western-Blot-Analysen herausgefunden, dass APOE3 Mäuse stärker ausgeprägte Entzündungsreaktionen und Fibrosen aufwiesen. Die über LC-MS/MS identifizierten Proteine (Abb. 3.9 A) zeigten, dass die Proteine mit höherer Abundanz der APOE4 vergleichend zu APOE3 Mäusen in größerer Anzahl der Funktion einer gesunden Leber zugeordnet werden konnten.<sup>[24]</sup>

Für die 105 höher abundanten Proteine der APOE3-Mäuse wurden zwei GOBP-Annotationen, *collagen fibril organization* und *positive regulation of response to*

*external stimulus*, identifiziert (Abb. 3.9 B, blau; GO:0030199; GO:0032103). Die *collagen fibril organization* umfasst alle Prozesse welche die Bildung von Kollagenfibrillen innerhalb der extrazellulären Matrixen beeinflussen (Anreicherungsfaktor: 19,6). Die dabei zugrunde liegenden Proteine sind unter anderem Annexin A2 (P07356, ANXA2) und Collagen alpha-1 (XIV) chain (K3W4R4, COL14A1). Im Prozess *positive regulation of response to external stimulus* (Anreicherungsfaktor: 7,5) sind insgesamt sieben signifikant abundante Proteine involviert, unter anderem Chemerin (A0A0N4SVV4) und Fatty acid-binding protein (P04117). Die identifizierten GOCC-Annotationen der APOE3 AL Mäuse weisen besonders auf Strukturen ausserhalb der Zelle hin (Anreicherungsfaktoren: 9 - 35, Abb. 3.9 D). Anzumerken ist hier, dass es sich laut Beschreibung der GOCC-Annotationen bei *proteinaceous extracellular matrix* um ein Synonym der *extracellular matrix* handelt. Die involvierten Proteine sind, mit Ausnahme von zwei zusätzlichen Proteinen innerhalb der letzten Annotation (Chemerin, A0A0N4SVV4; Pyruvate kinase, P52480), identisch. Für die APOE4 AL Mäuse wurden die zellulären Komponenten Keratin- (*keratin filament*, GO:0045095) und Intermediatfilament (*intermediate filament*, GO:0005882) identifiziert, welche auf den gleichen 10 beziehungsweise 12 Keratinen beruhten (Tab. 3.6, Abb. 3.9 A, Rauten). Interessant ist, dass unter der Annotation Intermediatfilament neben den APOE4 zugehörigen Proteinen, ebenso drei für APOE3 Mäuse signifikant abundante Proteine auftraten: Keratin 18 (P05784), Vimentin (P20152) und Keratin 8 (P11679).

**Tabelle 3.6.:** In der GOCC-Annotation *intermediate filament* (GO:0005882) des Experiments 3AL-4AL involvierte Proteine.

	Protein	Protein- Accession	Gen	MW / kDa
4AL	Keratin 1	P04104	<i>Krt1</i>	65,6
	Keratin 1b	Q6IFZ6	<i>Krt77</i>	61,3
	Keratin 2 epidermal	Q3TTY5	<i>Krt2</i>	70,9
	Keratin 2 oral	Q3UV17	<i>Krt76</i>	62,8
	Keratin 5	Q922U2	<i>Krt5</i>	61,7
	Keratin 7	Q9DCV7	<i>Krt7</i>	50,7
	Keratin 10	P02535	<i>Krt10</i>	57,7
	Keratin 16	Q9Z2K1	<i>Krt16</i>	51,6
	Keratin 42	Q6IFX2	<i>Krt42</i>	50,1
	Keratin 72	Q6IME9	<i>Krt72</i>	56,7
	Keratin 78	E9Q0F0	<i>Krt78</i>	112,2
	Keratin 79	Q8VED5	<i>Krt79</i>	57,5
3AL	Keratin 8	P11679	<i>Krt8</i>	54,5
	Keratin 18	P05784	<i>Krt18</i>	47,5
	Vimentin	P20152	<i>Vim</i>	53,7

In einer Proteomstudie von PARK *et al.*<sup>[99]</sup>, in welcher normal mit fettreich ernährten männlichen Mäusen verglichen wurden, wurden über einen klassischen In-Gel Verdau die oben genannten drei Proteine als höher abundant in den übergewichtigen Mäusen identifiziert. Für alle drei konnte unter anderem eine Korrelation der Expression beziehungsweise Abundanz mit dem Fortschreiten der Fettleber gezogen werden.<sup>[99]</sup> Im Falle der hier untersuchten Mäuse, welche die humanen Isoformen *APOE3* und *APOE4* exprimieren, scheint der *APOE4*-Genotyp erneut die pathologischen Auswirkungen einer fett- und zuckerreichen Ernährung zu minimieren.

Die Annotationen der Gruppe „Molekulare Funktionen“ zeigten nur eine Häufung von Identifikationen innerhalb der *APOE4*-Mäuse (Abb. 3.9 C). Unter anderem die Pheromonbindung (*pheromone binding*, GO:0005550), welche zu den GOMF der Geruchsstoffbindungen (*odorant binding*, GO:0005549) gezählt wird (Anreicherungsfaktor 31 - 80). Beide molekulare Funktionen involvieren die gleichen vier Harnproteine (MUPs): Major urinary protein 1 (*Mup1*, A2CEL1), 5 (A2AKN8), 1 (*Mup22*, Q4FZE8) und 25 (Q3KQQ2) (Abb. 3.9 A, Dreiecke). Diese Geruchskommunikationsproteine binden die flüchtigen hydrophoben Pheromone, konzentrieren diese und tragen beim Transport zu vomeronasalen Rezeptoren bei.<sup>[100,101]</sup> Hierdurch stellen MUPs einen wichtigen Aspekt für die Fortpflanzung dar.<sup>[101]</sup> Interessanterweise fanden GILLER *et al.*<sup>[101]</sup> in mehreren Vergleichsexperimenten zwischen männlichen DR und AL ernährten Mäusen heraus, dass die mRNA- als auch die hepatischen Protein-Level der *Mup*-Gene bzw. Harnproteine in DR Mäusen geringer abundant waren. Die Autoren schlossen daraus, dass die Regulierung der *Mup*-Expression in Zeiten unzureichender Nahrungsaufnahme zwei Faktoren bedient: die Einsparung von Energie und die Verhinderung der Fortpflanzung zur Sicherung des Überlebens der Nachkommen.<sup>[101]</sup> Wird diese Theorie in Kontext zu den in dieser Arbeit erhaltene Ergebnissen gesetzt, könnte die höhere Abundanz von MUPs in *APOE4* AL Mäusen darauf hinweisen, dass eine verminderte Reproduktionsfähigkeit bei *APOE3* produzierenden Mäusen vorlag. Um diese Hypothese zu unterstützen bedarf es jedoch weiterer unabhängiger funktioneller Untersuchungen.

Die weiteren in Abbildung 3.9 C) dargestellten GOMF-Annotationen basieren ebenfalls auf den oben diskutierten Cytochrom P450-Proteinen (Tab. 3.5).

### APOE3 DR vs. APOE4 DR

Die Auswirkungen der *APOE*-Isoformen auf das Leberproteom wurden weitergehend bei Mäusen untersucht, welche einen beschränkten Zugang zur fett- und

zuckerreichen Ernährung in Höhe von 70 % zur *ad libitum*-Vergleichsgruppe erhielten (DR). Insgesamt wurden in diesem Experiment 3654 Proteine identifiziert, darunter sieben differenziell abundante (Tab. 3.7).

**Tabelle 3.7.:** Differenziell abundante Proteine des Leberexperimentes 3DR-4DR.

	<b>Protein</b>	<b>Protein- Accession</b>	<b>#Peptide (#seq.spez.* Peptide)</b>	<b>Sequenzab- deckung / %</b>
<b>3DR</b>	Apolipoprotein E3	P02649	5 (4)	21
	Immunoglobulin heavy constant gamma 2C	F6TQW2	23 (1)	66
	Serine protease inhibitor A3K	A0A0R4J0I1	17 (5)	41
<b>4DR</b>	Asparagine synthetase	Q61024	6 (6)	13
	Heme-binding protein 1	A0A140T8J4	5 (4)	21
	Ig gamma-2A chain C region, membrane-bound form	P01865	13 (13)	85
	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase NIMA-interacting 4	Q9CWW6	2 (2)	19

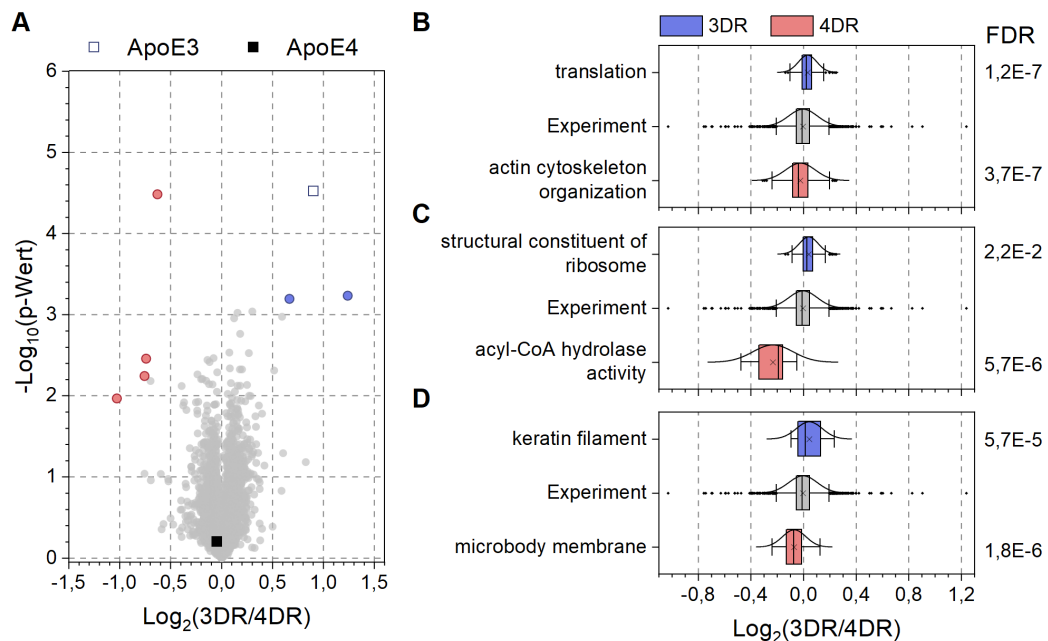
\*seq.spez. = sequenzspezifisch

Innerhalb der drei höher abundanten Proteine des Zustandes 3DR wurde auch Apolipoprotein E3 identifiziert (Abb. 3.10 A). Eine genauere Betrachtung der für die Quantifizierung in PD verwendeten Peptide zeigte, dass nur eines der 23 Peptide sequenzspezifisch für APOE3 ist (Tab. 3.7). Aufgrund der hohen Sequenzhomologie von 99,7 % der beiden APOE-Isoformen und der für die Datenbanksuche verwendeten Parameter wurden APOE3 alle identifizierten Peptide für die Quantifizierung zugeordnet, inklusive jener welche von beiden Isoformen stammen können. Eine genaue Bestimmung der Abundanz ist daher für die APOE-Isoformen mit den gewählten PD-Suchparametern nicht möglich. Die Quantifizierung der beiden APOE-Isoformen wäre zum Beispiel durch gezielte MS-basierte Ansätze (*targeted MS*) wie der *parallel reaction monitoring* (PRM) oder *selective reaction monitoring* (SRM) möglich.<sup>[102,103]</sup>

Die weiteren sechs quantifizierten signifikant abundanten Proteine treten ebenso im 3AL-4AL Experiment für die gleichen APOE-Isoformen höher abundant auf. Dies ist von besonderer Bedeutung, da diese Proteine somit unabhängig von der Ernährungsform der Mäuse und dadurch rein Isoform-spezifisch vorliegen. Infolge der geringen Anzahl an Proteinen mit höherer Abundanz wurde anstelle des *Fisher exact tests* eine 1D *Annotation Enrichment*-Analyse durchgeführt. Bei die-



ser Analyse wird über den gesamten quantifizierten Datensatz nach Annotationen gesucht, welche eine signifikante Abweichung zum Mittelwert des Experiments aufweisen (Abb. 3.10).



**Abbildung 3.10.:** GO-Annotationen der 1D *Annotation enrichment*-Analyse des 3DR-4DR Leberexperimentes. **A)** Volcano-Plot: mit Hervorhebung der APOE-Isoformen (Vierecke). **B)** GOBP-, **C)** GOMF- und **D)** GOCC-Annotationen innerhalb aller quantifizierter Proteine. Aus Gründen der Transparenz und eindeutigen Zuordnung wurden die Annotationen entsprechend der GO-Datenbank in englischer Sprache beibehalten.

In Abbildung 3.10 B)-D) sind jene Annotationen dargestellt, welche die größte Differenz zum Mittelwert des Experimentes aufwiesen. Der höchste Unterschied wurde für die Molekulare Funktion Acyl-CoA Hydrolase Aktivität (*acyl-CoA hydrolase activity*, GO:0047617) innerhalb der APOE4 DR Mäuse beobachtet (Abb. A.3 B). Die entsprechenden Acyl-Coenzyme A Thioesterasen (ACOTs) hydrolysieren Acyl-CoA zu Coenzym A und freien Fettsäuren, wodurch diese für den subzellulären Transport und Verwertung über Stoffwechselwege bioverfügbar werden.<sup>[104,105]</sup> Die genauen metabolischen Funktionen der ACOTs sind bislang nicht vollständig erforscht. Neue Studien deuten jedoch darauf hin, dass diese an der Entstehung von Stoffwechselkrankheiten wie nicht-alkoholischen Fettlebererkrankungen beteiligt sein könnten.<sup>[106]</sup>

Innerhalb der GOCC-Annotationen des gesamten Datensatzes wurde die zelluläre Komponente Keratinfilament (*keratin filament*, GO:0045095) für APOE3 DR Mäuse identifiziert (Abb. 3.10, A.3 C). Gegensätzlich dazu wurde diese Annotation bei den *ad libitum*-ernährten Brutgeschwistern (3AL-4AL) innerhalb der APOE4-Mäuse beobachtet.

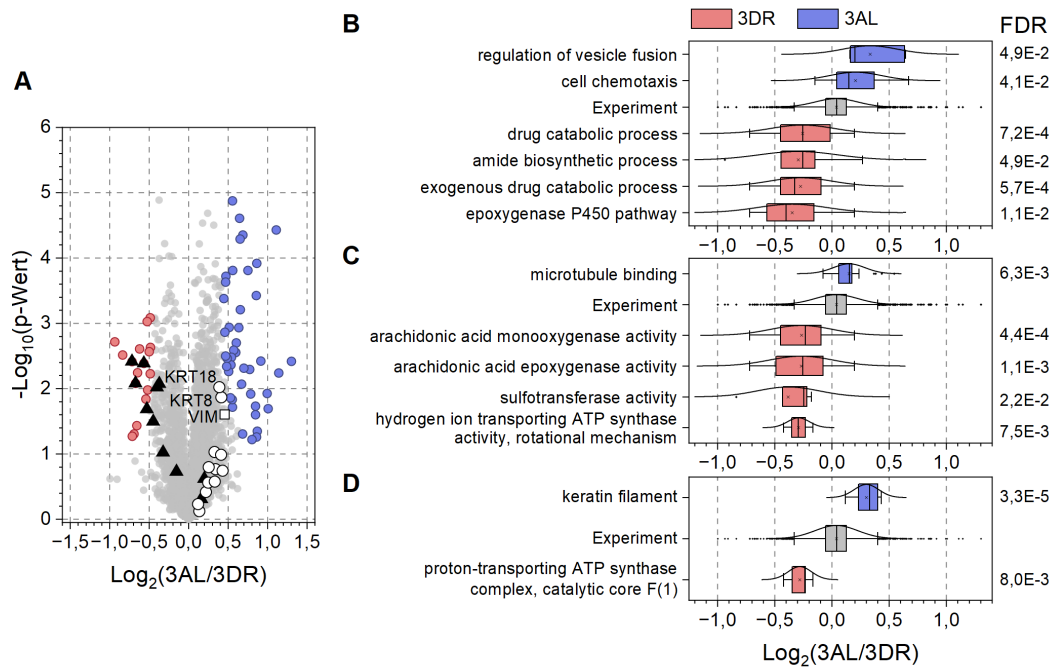
In den vorherigen Experimenten wurden die Effekte der APOE-Isoformen von identisch ernährten Mäusen untersucht. Ergänzend hierzu erfolgte die Analyse der Auswirkungen der Ernährungsform der *APOE3* exprimierenden Mäuse auf das Leberproteom. Für das Experiment 3AL-3DR wurden 3299 Proteine quantifiziert, hiervon zeigten 60 Proteine signifikant differenzielle Abundanzen (Tab. A.5, A.6). 43 dieser Proteine sind höher abundant für den Zustand 3AL und 17 für den Zustand 3DR. Vergleichend mit den höher abundanten Proteinen des Experimentes 3AL-4AL überschneiden sich 22 Proteine der 3AL-Zustände. Sieben dieser Proteine wurden dabei von Hübbe *et al.*<sup>[24]</sup> in direkten Kontext zu den Lebererkrankungen NAFLD/NASH gesetzt (Tab. A.5 blau). Gegenüber dem Experiment 3DR-4DR ergeben sich hingegen keine Überschneidungen innerhalb der Proteine mit differenzieller Abundanz.

Nach Durchführung des *Fisher's exact test* für das Leberexperiment 3AL-3DR wurde über alle signifikant abundanten Proteine lediglich die GOCC-Annotation *external side of plasma membrane* im Zustand 3AL identifiziert (GO:0009897; FDR 1,4E-2; Anreicherungsfaktor 11,8). Im gesamten Datensatz wurden 39 Proteine dieser Annotation zugeordnet, worunter sechs signifikant abundante Proteine innerhalb des Zustandes 3AL identifiziert wurden (Tab. 3.8). Proteine dieser Annotation werden dabei der Plasmamembran zugeordnet, sind dem Cytoplasma jedoch abgewandt.

**Tabelle 3.8.:** In dem GOCC-Term *external side of plasma membrane* des *Fisher exact tests* involvierte signifikant abundante Proteine der 3AL-Mäuse des Leberexperiments 3AL-3DR.

Protein	Protein-Accession	Gen	MW / kDa
Annexin A5	P48036	<i>Anxa5</i>	35,7
Galectin-3	P16110	<i>Lgals3</i>	27,5
H-2 class II histocompatibility antigen, A beta chain	P14483	<i>H2-Ab1</i>	30,1
High affinity immunoglobulin epsilon receptor subunit gamma	P20491	<i>Fcer1g</i>	9,6
Immunoglobulin heavy constant mu (Fragment)	A0A075B5P6	<i>Ighm</i>	50,0
Platelet glycoprotein 4	Q08857	<i>Cd36</i>	52,7

Für eine Einordnung der quantifizierten Proteine in einen biologischen Kontext wurde zusätzlich eine 1D *Annotation Enrichment*-Analyse durchgeführt (Abb. 3.11 B-D).



**Abbildung 3.11.:** GO-Annotationen der 1D *Annotation Enrichment*-Analyse des Leberexperimentes 3AL-3DR. **A)** Volcano-Plot: Proteine der Annotationen *epoxygenase P450 pathway* (GOBP, Dreiecke) und *keratin filament* (GOCC, Kreise). **B)** GOBP-, **C)** GOMF- und **D)** GOCC-Annotationen innerhalb aller quantifizierte Proteine. Aus Gründen der Transparenz und eindeutigen Zuordnung wurden die Annotationen entsprechend der GO-Datenbank in englischer Sprache beibehalten.

Unter den im gesamten Datensatz identifizierten biologischen Prozessen befinden sich die, bereits für das Experiment 3AL-4AL für den biologischen Zustand 4AL beobachteten, Annotationen *epoxygenase P450 pathway*, *exogenous drug catabolic process* und *drug catabolic process* (GO:0019373, GO:0042738, GO:0042737). Involviert sind hierbei mehrheitlich Cytochrom P450 Proteine, worunter drei auch unter den signifikant höher abundanten Proteinen des Zustandes 3DR identifiziert wurden (Abb. 3.11 A Dreiecke). Diese drei CYPs (CYP2C29, CYP2C37, CYP2C54) traten ebenso signifikant abundant im 3AL-4AL Experiment gegenüber dem Zustand 3AL auf. Dies deutet daraufhin, dass von einer verringerten Expression der CYPs in APOE3 AL Mäusen und nicht von einer gesteigerten Expression innerhalb der 3DR- bzw. 4AL-Mäuse auszugehen ist.

Zu den aufgeführten biologischen Prozessen lassen sich für den Zustand 3DR die molekularen Funktionen *arachidonic acid monooxygenase activity* und *arachidonic acid epoxygenase activity* zuordnen (GO:0008391; GO:0008392; Abb. 3.11 C). Zusätzlich wurde die GOMF-Annotation *sulfotransferase activity* in den 3DR-Mäusen identifiziert (GO:0008146). Hierbei katalysieren die zugrunde liegenden Sulfotransferasen (SULTs) die Übertragung einer Sulfogruppe von 3'-Phosphoadenosin-5'-

phosphosulfat auf eine Akzeptorgruppe. In Studien konnte ein Bezug der Expression von SULTs und der Auswirkung auf die Leber, insbesondere auf die Entwicklung von Lebererkrankungen, gezogen werden - auch wenn die konkrete Rolle bislang noch nicht ausreichend erforscht ist.<sup>[107–109]</sup>

Innerhalb der zellulären Komponenten wurde die Annotation Keratinfilament für APOE3 AL Mäuse identifiziert (Abb. 3.11 A Kreise, D). Interessant ist, dass vergleichend mit dem Experiment 3AL-4AL die involvierten Proteine dieser Annotation für den Zustand 4AL signifikant höher abundant waren. Werden allerdings die Keratine 8 und 18 hervorgehoben und zusätzlich noch Vimentin betrachtet, weisen diese die höchsten logarithmischen Werte innerhalb der Annotation auf (Abb. 3.11 A). Diese drei Proteine wurden bereits im Unterkapitel zu Experiment 3AL-4AL in Zusammenhang mit dem Fortschritt der Fettleber gesetzt (Kap. 3.3.2).

### APOE4 AL vs. APOE4 DR

Die Auswirkungen der beiden Ernährungsformen auf das Leberproteom wurde abschließend zusätzlich für die APOE4-Brutgeschwister untersucht. Hierbei wurden 3591 Proteine quantifiziert, worunter drei signifikant abundante Proteine identifiziert wurden (Tab 3.9). Vergleichend mit den anderen Leberexperimenten konnten für die APOE4-Mäuse bei Vergleich der Ernährungsformen der geringste Unterschied innerhalb der Leberproteome beobachtet werden.

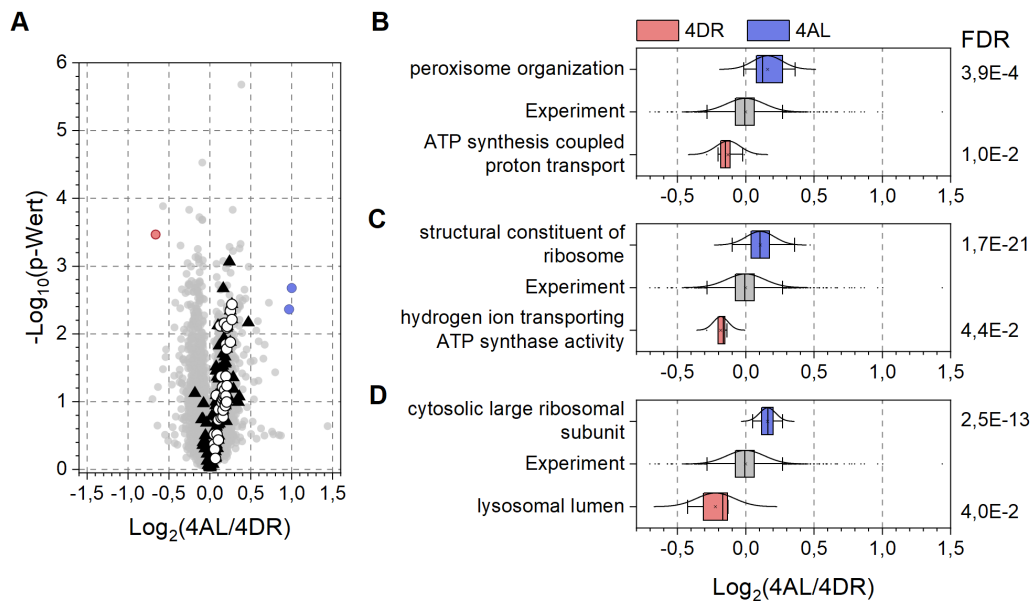
**Tabelle 3.9.:** Differenziell abundante Proteine des Leberexperimentes 4AL-4DR.

	Protein	Protein-Accession	#Peptide (#seq.spez.* Peptide)	Sequenzabdeckung / %
4AL	Perilipin-4	A0A571BEC9	14 (14)	41
	Thyroid hormone-inducible hepatic protein	Q62264	7 (7)	67
4DR	Extended synaptotagmin-2	Q3TZZ7	7 (7)	12

\*seq.spez. = sequenzspezifisch

Innerhalb der anderen Experimente wurde das Protein Extended synaptotagmin-2 für keinen biologischen Zustand als differenziell abundant identifiziert. Perilipin-4 hingegen wurde ebenfalls in den Experimenten 3AL-4AL sowie 3AL-3DR im Zustand 3AL identifiziert. Thyroid hormone-inducible hepatic protein wurde im Zustand 3AL des Experimentes 3AL-3DR beobachtet. Analog zu den vorheri-

gen Analysen wurde eine 1D *Annotation Enrichment*-Auswertung durchgeführt (Abb. 3.12).



**Abbildung 3.12.:** GO-Annotationen der 1D *Annotation Enrichment*-Analyse des Leber-experimentes 4AL-4DR. **A)** Volcano-Plot: Proteine der Annotationen *structural constituent of ribosome* (GOMF, Dreiecke) und *cytosolic large ribosomal subunit* (GOCC, Kreise). **B)** GOBP-, **C)** GOMF- und **D)** GOCC-Annotationen. Aus Gründen der Transparenz und eindeutigen Zuordnung wurden die Annotationen entsprechend der GO-Datenbank in englischer Sprache beibehalten.

In Abbildung 3.12 B)-D) sind jene Annotationen dargestellt welche die größte Differenz zum logarithmischen Mittelwert des Experimentes aufwiesen. In der Gruppe der biologischen Prozesse wurde für den Zustand 4AL die *peroxisome organization* identifiziert, in welcher Prozesse zusammengefasst wurden die mit dem Aufbau, der Anordnung und dem Abbau von Peroxisomen zusammenhängen (GO:0007031).<sup>[85]</sup> Peroxisomen bauen mittels Oxidation verschiedene Stoffwechselprodukte wie Fettsäuren ab.<sup>[110]</sup> Innerhalb der 3DR-Mäuse wurde die GOBP *ATP synthesis coupled proton transport* identifiziert, welche Prozesse umfasst, die einen elektrochemischen Gradienten erzeugen, der die ATP-Synthese antreibt (GO:0015986). Bei den involvierten Proteinen handelt es sich um ATP synthase subunits sowie V-type proton ATPase Proteine. Die entsprechende GOMF-Annotation *hydrogen ion transporting ATP synthase activity* wurde ebenfalls im Zustand 4DR identifiziert (Abb. 3.12 A, Kreise). Innerhalb der 4AL-Mäuse wurde die molekulare Funktion *structural constituent of ribosome* erhalten (GO:0003735). Die involvierten 120 ribosomalen Proteine tragen dabei zur strukturellen Integrität des Ribosoms bei. Von diesen ribosomalen Proteinen waren die 60S-Proteine am häufigsten vertreten,

wodurch die GOCC-Annotation *cytosolic large ribosomal subunit* begründet wird (GO:0022625; Abb. 3.12 A, Dreiecke).

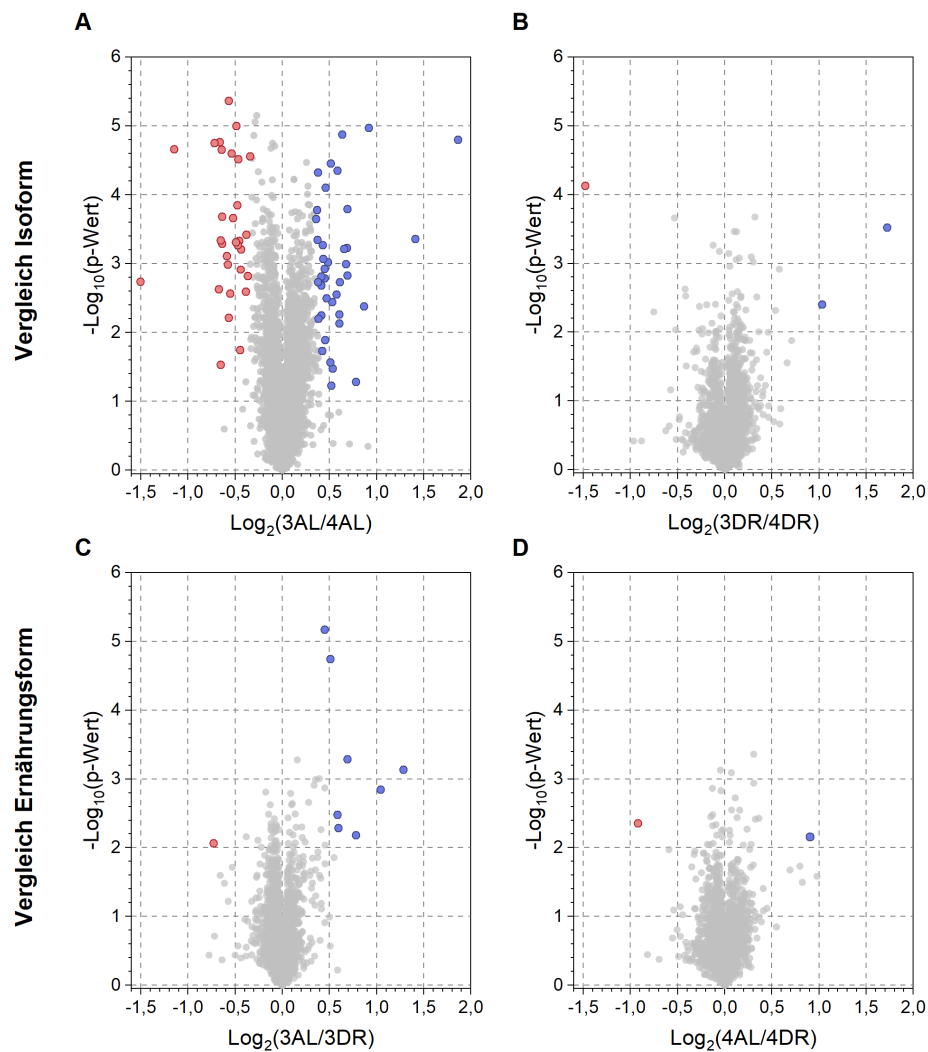
## Wichtigste Ergebnisse

Nachfolgend sind die wichtigsten Ergebnisse der quantitativen Leber-Analysen stichwortartig zusammengefasst.

1. Basierend auf der Anzahl der differenziell abundanten Proteine
  - a) Auswirkungen der APOE-Isoformen durch Ernährungsbeschränkung minimiert
  - b) Auswirkungen der Ernährungsformen in APOE3-Mäusen stärker ausgeprägt
2. APOE4 Isoform scheint pathologische Auswirkungen der fett- und zuckerreichen Ernährung zu minimieren
  - a) Cytochrom P450 Proteine, welche bei Mäusen die nach dem Diätmodell nach NAFLD/NASH ernährt wurden, unterdrückt wurden: höher abundant in 4AL (Experiment 3AL-4AL)
  - b) Keratin 8, 18 und Vimentin, bei welchen eine Korrelation zwischen Expression und Fortschritt der Steatosis besteht: höher abundant in 3AL (Experiment 3AL-4AL)
  - c) Major urinary proteins, erniedrigte Abundanz in Zusammenhang mit verringerter Reproduktionsfähigkeit: höher abundant in 4AL (Experiment 3AL-4AL)
3. Keratin 8, 18 und Vimentin
  - a) höher abundant für 3AL (Experiment 3AL-3DR); verdeutlicht NAFLD/NASH-Problematik in 3AL-Mäusen
  - b) keine Tendenzen in Experiment 3DR-4DR; Ernährungsform scheint ausschlaggebend

### 3.3.3 Quantitative Analyse von Nierengewebe

Zusätzlich zu den Untersuchungen des Lebergewebes wurden die Nierengewebe der identischen Mäusen analysiert. Über alle Nierenexperimente wurde mit 4701 die höchste Anzahl an Proteinen innerhalb des 3AL-4AL Experimentes quantifiziert (Abb. A.4). Diese Zahl nimmt über die Experimente 3DR-4DR (4289), 3AL-3DR (4106) zu 4AL-4DR auf 3930 Quantifizierungen ab.



**Abbildung 3.13.:** Volcano-Plots der quantitativen Nierenexperimente unter farblicher Hervorhebung der erhaltenen signifikant abundanten Proteine (rot/blau) zwischen den einzelnen biologischen Zuständen. Signifikanzen wurden durch einen zweiseitigen Student's t-Test mit  $S_0 = 0,3$  und  $\alpha = 0,05$  erhalten. Darstellung der vier durchgeführten Experimente: **A)** 3AL-4AL; **B)** 3DR-4DR; **C)** 3AL-3DR; **D)** 4AL-4DR.

Auch innerhalb der Gesamtanzahl der Proteine mit signifikanter Abundanz sind deutliche Unterschiede zu erkennen (Abb. 3.13 A-D, rot/blau). Mit 70 signifikant abundanten Proteinen, 40 höher abundanten im Zustand 3AL und 30 für den Zustand 4AL, weist das Experiment 3AL-4AL hierbei die größte Anzahl differenziell abundanten Proteine auf (Abb. 3.13 A). Analog zu den Analysen der Lebergewebe scheinen die Isoform-spezifischen Effekte bei restriktiver Ernährung der Mäuse zu schwinden. Für das entsprechende Experiment 3DR-4DR wurden lediglich 3 differenziell abundante Proteine identifiziert (Abb. 3.13 B). Innerhalb der Experimente, bei welchen der Einfluss der Ernährungsform untersucht wurden, zeigten sich für die APOE3 produzierenden Mäuse mit insgesamt 9 Proteinen eine leicht höhere Anzahl an signifikant abundanten Proteinen im Vergleich zu ihren APOE4-Brutgeschwistern (Abb. 3.13 C, D). Damit kann ein analoger Trend zu den Leberanalysen beobachtet werden. Der deutlichste Unterschied der biologischen Zustände in Form der differenziell abundanten Proteine wurde innerhalb der AL-Vergleiche erhalten, stark dahinter der Vergleich der APOE3-Isoformen. Interessanterweise wurde in den Nierenexperimenten eine höhere Zahl an Proteinen quantifiziert, allerdings bei ungefähr 65 % weniger identifizierten signifikant abundanten Proteinen. Die Auswirkungen der Ernährungsformen und APOE-Isoformen scheinen entsprechend in den Nierengeweben schwächer ausgeprägt zu sein als in den Lebern der Mäuse.

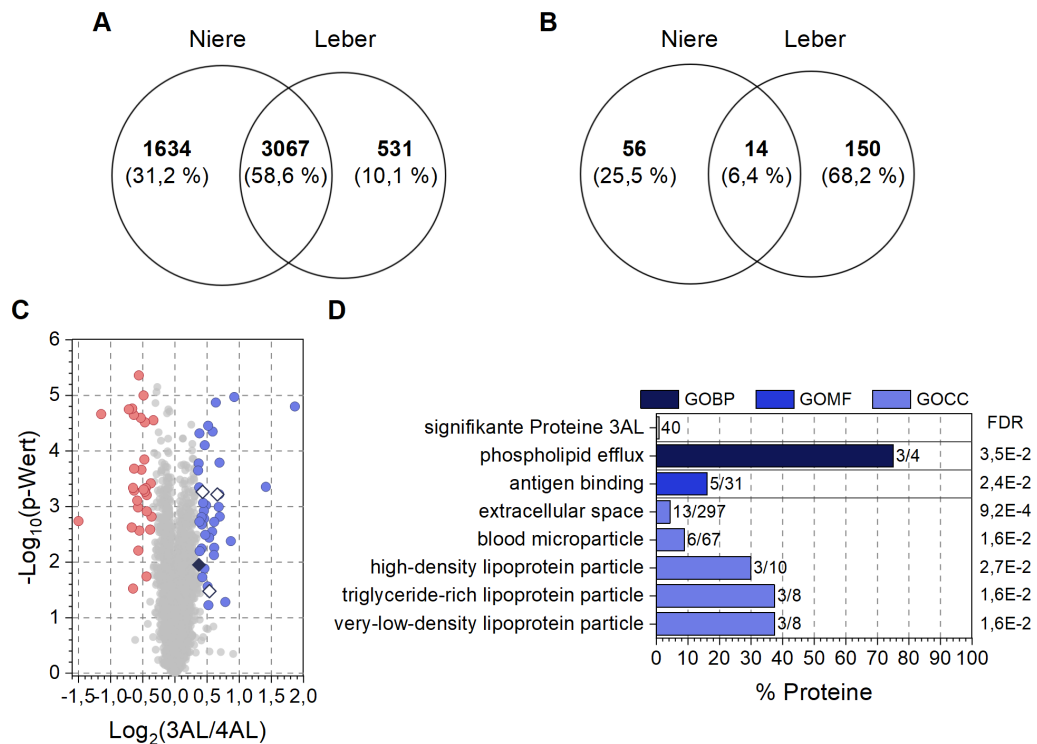
#### APOE3 AL vs. APOE4 AL

In diesem Experiment wurden die Auswirkungen der APOE-Isoformen bei Mäusen untersucht, welche einen unbeschränkten Zugang zu zucker- und fettreicher Ernährung erhielten. Mit insgesamt 70 differenziell abundanten Proteinen, 40 höher abundant in 3AL- und 30 in 4AL-Mäusen, war ein deutlicher Isoform-abhängiger Unterschied zu beobachten (Tab. A.7, A.8).

Ein gewebeübergreifender Vergleich zwischen Niere und Leber innerhalb der 3AL-4AL Experimente zeigte, dass rund 60 % aller quantifizierter Proteine in beiden Geweben identifiziert wurden. Ein Drittel der Proteine wurde dabei spezifisch für das Nierengewebe und 10 % spezifisch in den Leberanalysen identifiziert (Abb 3.14 A). Bei Vergleich der differenziell abundanten Proteine beider Analysen reduzierte sich die Überschneidung über beide Gewebe auf rund 6 % (14 signifikant abundante Proteine; Abb. 3.14 B). Diese Proteine wurden dabei in beiden Geweben höher abundant für die gleichen biologischen Zustände identifiziert (Tab. A.7, A.8 blau markiert). Über einen *Fisher exact test* konnten jedoch keine GO-Annotationen für diese Proteine erhalten werden.



Für die weitere Analyse der signifikant abundanten Proteine des Nierenexperimentes 3AL-4AL wurden nachfolgend die statistischen Zusammenhänge der zugehörigen GO-Annotationen über einen *Fisher exact test* ermittelt. In Abbildung 3.14 D) ist zu erkennen, dass keine Annotationen über die differenziell abundanten Proteine der 4AL-Mäuse erhalten wurden.



**Abbildung 3.14.:** Vergleich der Experimente 3AL-4AL von Niere- und Lebergeweben und Annotationen des *Fisher exact tests* des Nierenexperimentes 3AL-4AL. **A)** Überschneidung aller quantifizierter Proteine und **B)** aller signifikant abundanten Proteine der 3AL-4AL Experimente von Niere und Leber. **C)** Volcano-Plot des Nieren 3AL-4AL Experimentes: Proteine der Annotation *phospholipid efflux* (GOBP, Rauten). **D)** GO-Annotationen der signifikant abundanten Proteine. Aus Gründen der Transparenz und eindeutigen Zuordnung wurden die Annotationen entsprechend der GO-Datenbank in englischer Sprache beibehalten.

Als einzige Annotation der Gruppe *Biologische Prozesse* wurde der *phospholipid efflux* innerhalb der 3AL-Mäuse identifiziert, womit die gerichtete Bewegung von Phospholipiden durch die Zellmembran bezeichnet wird (GO:0033700; Anreicherungsfaktor: 88,1).<sup>[85]</sup> In diesem Prozess sind die drei Apolipoproteine (APO) C-I, A-II und A-IV involviert (Abb. 3.14 C, Rauten). Der renale Lipidstoffwechsel hat aufgrund des Transportes und Austausches von freien Fettsäuren und Apolipoproteinen aus dem peripheren Kreislauf signifikante Auswirkungen auf den Körper und die Nieren. APOs sind dabei ein essenzieller Bestandteil für den Transport und den Stoffwechsel von Lipiden, welche für eine normale physiologische Funktion

essentiell sind.<sup>[111]</sup> Allerdings stehen einige APOs auch in starkem Verdacht ein Risikofaktor für renale Erkrankungen zu sein. BOES *et al.* fanden beispielsweise in einer humanen Studie von Patienten mit milder und moderater Niereninsuffizienz heraus, dass die APOA-IV Level mit Fortschritt der Krankheit stiegen und daher APOA-IV als früher Marker für eine Nierenschädigung herangezogen werden könnte.<sup>[112]</sup> APOA-II ist eine wichtige Komponente von *High Density* Lipoproteinen (HDL) und zeigt antiatherosklerotische, -flammatrosiche und -oxidative Wirkung.<sup>[113]</sup> Isoformen von APOA-II hingegen sind entscheidend an der Entwicklung einer speziellen Form der renalen Amyloidose beteiligt.<sup>[114]</sup> Eine erhöhte Expression von APOC-I wurde in Relation zu einer erhöhten Sterblichkeit in Patienten mit klarzelligen Nierenzellkarzinom gestellt.<sup>[115]</sup> Dies verdeutlicht wie gravierend die Auswirkungen sein können, wenn die Expression und Translation auch nur eines der oben aufgeführten Apolipoproteine verändert vorliegt.

Apolipoproteine stellen den primären Proteinbestandteil der Hülle von Lipoproteinen dar, wodurch die sich im Kern befindlichen hydrophoben Triglyceride und Cholesterinester über den Blutstrom im Körper transportiert werden können.<sup>[116]</sup> Entsprechend begründen sich die höher abundant erhaltenen zellulären Komponenten *high-density*, *triglyceride-rich* und *very-low-density lipoprotein particle* auf den oben aufgeführten Apolipoproteinen (GO:0034364, GO:0034385, GO:0034361; Anreicherungsfaktor: 30 - 37,5). Neben den genannten GOCC-Annotationen traten ebenso die miteinander verwandten Annotationen *extracellular space* und *blood microparticle* innerhalb der 3AL-Mäuse auf (GO:0005615, GO:0072562; Anreicherungsfaktor: 4,4 - 9). Letztere sind per GO-Definition Phospholipid Mikrovessikel, welche von verschiedenen Zelltypen stammen können und Mutterzell-charakteristische Membranrezeptoren und Proteine enthalten.<sup>[85]</sup> Die hierbei zugrunde liegenden Proteine sind in Tabelle 3.10 aufgeführt.

**Tabelle 3.10.:** Der GOCC-Annotation *blood microparticle* des *Fisher exact tests* zugrunde liegenden signifikant abundanten 3AL-Proteine des Nierenexperimentes 3AL-4AL.

Protein	Protein-Accession	Gen	MW / kDa
Apolipoprotein A-II	P09813	<i>Apoa2</i>	11,3
Apolipoprotein A-IV	P06728	<i>Apoa4</i>	45
Ceruloplasmin	G3X8Q5	<i>Cp</i>	124,1
Haptoglobin	Q61646	<i>Hp</i>	38,7
Serotransferrin	Q921I1	<i>Tf</i>	76,7
Vitamin D-binding protein	P21614	<i>Gc</i>	53,6

Die Annotation *antigen binding* im Zustand 3AL wurde als einzige Annotation innerhalb der Gruppe der molekularen Funktionen identifiziert (GO:0003823; An-

reicherungsfaktor: 16,1). Hierunter werden in der GO-Terminologie Substanzen bezeichnet, welche eine Immunreaktion hervorrufen und mit jenen Produkten reagieren können.<sup>[85]</sup>

#### APOE3 DR vs. APOE4 DR

Analog zu den Leberexperimenten wurde das Proteom von Nierengewebe der ernährungsbedingt eingeschränkten *Apoe3* und *Apoe4* Knock-In Mäuse vergleichend analysiert. Insgesamt wurden 4289 Proteine quantifiziert, worunter durch einen zweiseitigen Student's t-Test drei signifikant abundante Proteine identifiziert wurden (Tab. 3.11, Abb. 3.11). Vergleichend mit der Analyse der AL-ernährten Brutgeschwister traten damit deutlich weniger differenziell abundante Proteine auf. Ein identischer Trend wurde in den Leberexperimenten beobachtet, wodurch deutlich gezeigt werden konnte, dass ein eingeschränkter Zugang zu fett- und zuckerreichen Ernährung die Auswirkungen der APOE-Isoformen minimiert.

**Tabelle 3.11.:** Differenziell abundante Proteine des Nierenexperimentes 3DR-4DR.

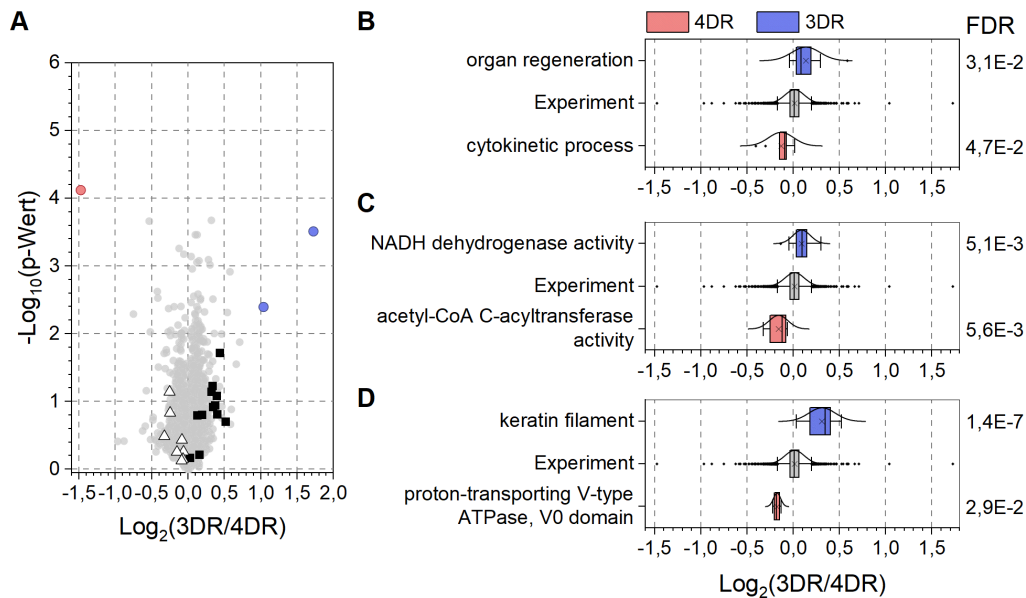
	<b>Protein</b>	<b>Protein- Accession</b>	<b>#Peptide (#seq.spez.* Peptide)</b>	<b>Sequenzab- deckung / %</b>
<b>3DR</b>	Immunoglobulin heavy constant gamma 2C	F6TQW2	6 (6)	25
	Serine protease inhibitor A3K	A0A0R4J0I1	14 (3)	41
<b>4DR</b>	Heme-binding protein 1	A0A140T8J4	7 (7)	54

\*seq.spez. = sequenzspezifisch

Unabhängig von der Ernährungsform wurden diese drei Proteine auch im Nierenexperiment 3AL-4AL für die gleichen Isoformen mit erhöhter Abundanz identifiziert. Dies deutet darauf hin, dass diese Abundanzunterschiede eine direkte und spezifische Auswirkung der APOE-Isoformen darstellen. Zusätzlich konnten diese drei Proteine für die gleichen Zustände in den Leberanalysen 3DR-4DR und 3AL-4AL identifiziert werden. Dies verdeutlicht, dass die Isoform-spezifische Änderung der Abundanzen dieser Proteine unabhängig von den untersuchten Geweben sind.

Für die weiteren Analyse des Datensatzes wurde eine 1D *Annotation Enrichment*-Auswertung über alle quantifizierten Proteine durchgeführt (Abb. 3.15). In Ab-

bildung 3.15 B)-D) sind jene GO-Annotationen dargestellt, welche die größten Abweichungen vom Mittelwert des Experimentes aufwiesen.

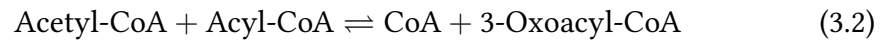


**Abbildung 3.15.:** Annotationen des Nierenexperiments 3DR-4DR der 1D *Annotation Enrichment*-Analyse. **A)** Volcano-Plot: Proteine der Annotationen *acetyl-CoA C-acyltransferase* (GOMF, Dreiecke) und *keratin filament* (GOCC, Vierecke). **B)** GOBP-, **C)** GOMF- und **D)** GOCC-Annotationen. Aus Gründen der Transparenz und eindeutigen Zuordnung wurden die Annotationen entsprechend der GO-Datenbank in englischer Sprache beibehalten.

In der Gruppe der biologischen Prozesse wies die Annotation *organ regeneration* für den Zustand 3DR die größte Differenz zum Mittelwert des gesamten Experimentes auf (GO:0031100). Innerhalb der GO-Datenbank wird darunter das Nachwachsen eines verlorenen oder zerstörten Organs verstanden.<sup>[85]</sup> Die Bildung neuer Nephronen (Neonephrogenese), der kleinsten Funktionseinheiten der Niere, ist ein Charakteristikum von Fischen, tritt jedoch bei Säugetieren nicht auf. Der unter normalen Bedingungen geringe Zellumsatz innerhalb der Nieren von Säugetieren steigt allerdings zum Zwecke der Gewebereparatur nach Verletzungen an.<sup>[117,118]</sup> Dieses Zellwachstum wird Zellproliferation genannt und zeigt sich unter anderem in der Cytokinese (Zellteilung). Diese wurde konträr dazu jedoch innerhalb der 4DR-Mäuse identifiziert (*cytokinetic process*, GO:0032506; Abb. 3.15 B). Die für beide biologischen Prozesse zugrunde liegenden Proteine sind dabei allerdings unterschiedlich.

Für die APOE3 synthetisierenden Mäuse wurde die molekulare Funktion *NADH dehydrogenase activity* identifiziert (GO:0003954). Die dieser Annotation zugehörigen Proteine bilden die NADH-Dehydrogenase (Komplex I), welche den Elektronentransfer von NADH durch die Atmungskette katalysiert.<sup>[8]</sup>

Mit deutlich größerer Differenz zum Mittelwert des Experimentes wurde die GOMF-Annotation *acetyl-CoA C-acyltransferase activity* für den 4DR Zustand identifiziert (GO:0003988; Abb. 3.15 A, C). Die Proteine dieser Annotation (3-Ketoacyl-CoA Thiolasen, Acetyl-CoA Acetyltransferasen, Trifunctional enzyme subunits) katalysieren die reversible Reaktion



welche dem letzten Schritt der  $\beta$ -Oxidation, dem Abbau aktivierter Fettsäuren, entspricht.<sup>[8,85]</sup> Dies könnte darauf hindeuten, dass der Fettsäurestoffwechsel in 4DR-Mäusen vergleichend zu ihren APOE3-Geschwistern marginal ausgeprägter ist.

Analog zur Analyse im Leberexperiment 3DR-4DR wurde die zelluläre Komponente *keratin filament* innerhalb der 3DR-Mäuse identifiziert (GO:0045095; Abb. 3.15 A, D). Mit Ausnahme des Keratin 6A überschneiden sich die in beiden Geweben zugrunde liegenden Cytokeratine. Identisch zum Leberexperiment (3DR-4DR) wurden für die drei mit der Fettleber assoziierten Proteine Keratin 8, 18 und Vimentin keine gemeinsamen Trends beobachtet. Zudem weisen alle drei nur geringe Unterschiede zum Nullpunkt des Experimentes auf.

### APOE3 AL vs. APOE3 DR

Die Analyse des Nierenproteoms der *APOE3* exprimierenden Mäuse bei unterschiedlicher Ernährung ergab eine Identifikation von insgesamt 4106 Proteinen. Innerhalb dieser wurden über einen zweiseitigen Student's t-Test neun differenziell abundante Proteine identifiziert, wobei die größte Anzahl mit acht Proteinen für den Zustand 3AL ermittelt wurde (Tab. 3.12). Sechs dieser signifikant abundanten 3AL-Proteine wurden ebenfalls in den APOE3 Mäusen des Nierenexperimentes 3AL-4AL identifiziert: darunter die Apolipoproteine A-II und C-I. Mit Ausnahme von Ceruloplasmin gibt es keine Überschneidung zum identischen Experiment des Lebergewebes.

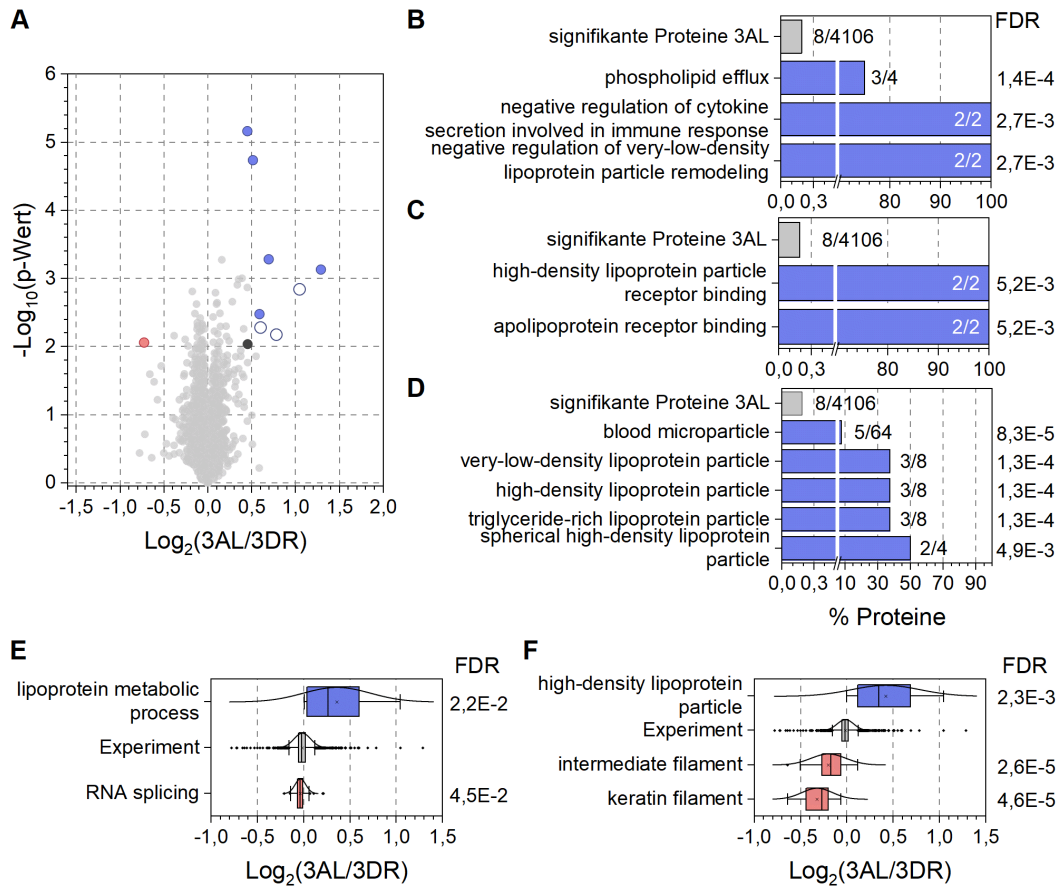
Für den Zustand 3DR wurde als einziges differenziell abundantes Protein Regenerating islet-derived protein 3-beta (REG3B) identifiziert. Dieses antimikrobielle C-Typ Lektin der RegIII-Familie wirkt bakterizid gegen verschiedene grampositive und gramnegative Darmbakterien, wobei bislang die Spezifität der Kohlenhydraterkennung und die mechanistischen Details der bakteriellen Translokation nicht vollständig bekannt sind.<sup>[119,120]</sup>

**Tabelle 3.12.:** Differenziell abundante Proteine des Nierenexperimentes 3AL-3DR.

	<b>Protein</b>	<b>Protein- Accession</b>	<b>#Peptide (#seq.spez.* Peptide)</b>	<b>Sequenzab- deckung / %</b>
<b>3AL</b>	Apolipoprotein A-I	Q00623	17 (17)	53
	Apolipoprotein A-II	P09813	2 (2)	19
	Apolipoprotein C-I	P34928	4 (4)	31
	Ceruloplasmin	G3X8Q5	31 (31)	34
	H-2 class I histocompati- bility antigen, Q10 alpha chain	P01898	8 (6)	24
	Haptoglobin	Q61646	16 (16)	45
	Serotransferrin	Q921I1	45 (43)	66
	Transthyretin	P07309	4 (4)	27
	Regenerating islet-derived protein 3-beta	P35230	2 (2)	9

\*seq.spez. = sequenzspezifisch

Entsprechend den vorherigen Analysen wurde mittels *Fisher's exact test* überprüft, ob innerhalb der neun differenziell abundanten Proteine Annotationen gegenüber dem gesamten Datensatz mit höherer Abundanz auftraten (Abb. 3.16). In Abbildung 3.16 B)-D) ist zu erkennen, dass aufgrund der zu geringen Anzahl von Proteinen mit signifikanter Abundanz des 3DR-Zustandes lediglich Annotationen für die 3AL-Mäuse erhalten wurden. Hervorzuheben ist, dass insbesondere in der Gruppe der biologischen Prozesse deutlich mehr als die hier dargestellten Annotationen identifiziert wurden (Anreicherungsfaktor > 10). In der Mehrheit dieser Prozesse sind, analog zu den in Abbildung 3.16 dargestellten, mindestens zwei der drei Apolipoproteine A-I, A-II und C-I involviert. Analog zu der Überschneidung der signifikant abundanten Proteine mit jenen des Experimentes 3AL-4AL besteht auch eine starke Überschneidung zu den GO-Annotationen von 3AL-3DR. Unterschiedlich sind jedoch die deutlich höheren Anreicherungsfaktoren von bis zu 515 in diesem Experiment. Als Beispiel sei hier der *phospholipid efflux* aufgeführt, welcher im Experiment 3AL-4AL einen Anreicherungsfaktor von 88,1 aufwies, im Experiment 3AL-3DR hingegen 386,3 (GO:0033700). In Abbildung 3.16 A) sind die in diesem Experiment für diese Annotation zugrunde liegenden Proteine hervorgehoben (weiße Kreise) sowie das APOA-IV, welches als einziges nicht-signifikant abundantes Protein im gesamten Datensatz ebenfalls dieser Annotation zugeordnet werden konnte (schwarzer Kreis).



**Abbildung 3.16.:** Graphische Darstellung der statistischen Analysen durch *Fisher's exact test* und 1D *Annotation Enrichment* des Nierenexperimentes 3AL-3DR. **A)** Volcano-Plot: Proteine der Annotation *phospholipid efflux* (GOBP, weiße Kreise) sowie aller Proteine des gesamten Datensatzes die diese Annotation tragen (schwarzer Kreis). Die über den *Fisher exact test* identifizierten **B)** GOBP-, **C)** GOMF- und **D)** GOCC-Annotationen. 1D *Annotation Enrichment* **E)** GOBP- und **F)** GOCC-Annotationen. Aus Gründen der Transparenz und eindeutigen Zuordnung wurden die Annotationen entsprechend der GO-Datenbank in englischer Sprache beibehalten.

Infolge der stark vertretenen Apolipoproteine sind über alle GO-Annotationen Prozesse, Funktionen und Komponenten in Bezug zu Lipoproteinen stark vertreten (Abb. 3.14 B-D). Über *negative regulation of very-low-density lipoprotein particle remodeling* zu *high-density lipoprotein particle receptor binding* und GOCC-Annotationen von verschiedenen Lipoproteinen unterschiedlicher Dichte (GO:0010903, GO:0070653; Anreicherungsfaktoren 515).

Zur erweiterten Auswertung des 3DR-Zustandes im Nierengewebe wurde zusätzlich eine 1D *Annotation Enrichment*-Analyse durchgeführt, wobei keine Annotationen der molekularen Funktionen erhalten wurden (Abb. 3.16 E, F). Erwartungsgemäß wurden über die statistische Analyse des gesamten Datensatzes Lipoprotein-

bezogene Annotationen innerhalb der 3AL-Mäuse identifiziert. In der Gruppe der biologischen Prozesse wurde für den Zustand 3DR lediglich die Annotation *RNA splicing* mit marginaler Differenz zum Mittelwert des Experimentes ermittelt (GO:0008380, Abb. 3.16 E). In Übereinstimmung mit dem Experiment 3DR-4DR wurde auch hier für den Zustand 3DR die Annotation *keratin filament* sowie ergänzend *intermediat filament* erhalten (GO:0045095; GO:0005882). Vergleichend mit dem analogen Leberexperiment 3AL-3DR, in welchem das *keratin filament* innerhalb des 3AL-Zustandes identifiziert wurde, sind diese Ergebnisse konträr. Dies zeigt deutlich die unterschiedlichen Auswirkungen der Ernährungsformen auf verschiedene Organe innerhalb der APOE3-Mäuse.

#### APOE4 AL vs. APOE4 DR

Der Tendenz innerhalb des Lebergewebes folgend wurden bei Vergleich der Auswirkungen der Ernährungsformen der *APOE4* exprimierenden Mäuse auf das Nierenproteom die geringste Anzahl an differenziell abundanten Proteinen beobachtet. Bei 3930 quantifizierten Proteinen wurden lediglich zwei signifikant abundante Proteine identifiziert (Abb. 3.17, Tab. 3.13).

Die UDP-Glucuronosyltransferase wurde dabei als höher abundantes Protein für die *ad libitum* ernährten Mäuse identifiziert (Tab. 3.13). Enzyme dieser Klasse katalysieren die Reaktion von UDP-Glucuronsäure auf meist hydrophobe Akzeptoren. Hierdurch wird die Hydrophilie erhöht und die Ausscheidung über den Urin und dadurch die Entgiftung verbessert (Glucuronidierung). Entsprechend sind diese Proteine wichtig für den Abbau von Schadstoffen aus dem Körper und bereits ein leichter Abfall in der Expression einer dieser Proteine kann weitreichende Konsequenzen auf den Metabolismus haben.<sup>[121,122]</sup>

**Tabelle 3.13.:** Differenziell abundante Proteine des Nierenexperimentes 4AL-4DR.

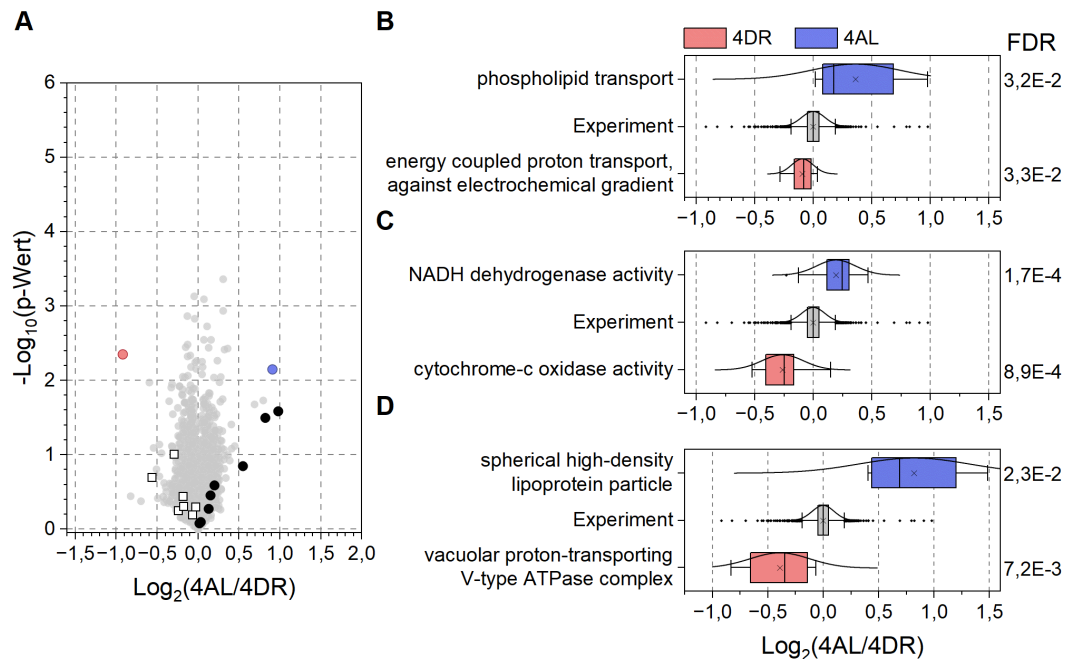
	<b>Protein</b>	<b>Protein- Accession</b>	<b>#Peptide (#seq.spez.* Peptide)</b>	<b>Sequenzab- deckung / %</b>
<b>4AL</b>	UDP-Glucuronosyl- transferase	Q8VCN3	6 (2)	14
<b>4DR</b>	Holocytochrome C-Typ Synthase	P53702	6 (6)	26

\*seq.spez. = sequenzspezifisch



In den 4DR-Mäusen wurde die Holocytochrom C-Typ Synthase als einziges differenziell abundantes Protein identifiziert. Diese Synthase katalysiert die posttranslationale Bindung von Apocytochrom C mit einer Häm-Gruppe zu einem funktionsfähigen Holocytochrom C.<sup>[123]</sup>

In Abbildung 3.17 B)-D) sind jene GO-Annotationen dargestellt, welche nach 1D *Annotation Enrichment*-Analyse des Datensatzes die größten Unterschiede zum Mittelwert des Experimentes aufwiesen.



**Abbildung 3.17.:** GO-Annotationen der 1D *Annotation Enrichment*-Analyse des Nieren-experiments 4AL-4DR. **A)** Volcano-Plot: Proteine der Annotationen *phospholipid transport* (GOBP, schwarze Kreise) und *vacuolar proton-transporting V-type ATPase complex* (GOBP; GOCC, Vierecke). **B)** GOBP-, **C)** GOMF- und **D)** GOCC-Annotationen die den größten Unterschied zum Mittelwert des Experimentes aufwiesen. Aus Gründen der Transparenz und eindeutigen Zuordnung wurden die Annotationen entsprechend der GO-Datenbank in englischer Sprache beibehalten.

In der Gruppe der biologischen Prozesse entspricht dies für den Zustand 4AL dem *phospholipid transport* (GO:0015914; Abb 3.17 A, schwarze Kreise). In den bereits beschriebenen Nierenexperimenten 3AL-4AL und 3AL-3DR tritt der *phospholipid efflux* innerhalb des Zustandes 3AL auf. Diese Annotation ist hierbei dem *phospholipid transport* untergegliedert. Interessant ist, dass der Lipidtransport im Vergleich 3AL-4AL sowie 3AL-3DR stärker in den APOE3 Mäusen ausgeprägt ist, innerhalb des Experimentes 4AL-4DR jedoch für 4AL. Dies lässt darauf schließen, dass der Fettsäurestoffwechsel in AL-Mäusen vergleichend zu ihren DR-Brutgeschwistern ausgeprägter vorliegt. Dieser Effekt allerdings durch die APOE3-Isoform noch weiter gesteigert wird.

Für den Zustand APOE4 DR wurde die GOBP-Annotation *energy coupled proton transport, against electrochemical gradient* identifiziert (GO:0015988). Bei diesem Prozess werden Protonen unter Verwendung der freigesetzten Energie der ATP Hydrolyse durch eine Membran entgegen eines elektrochemischen Gradientens transportiert.<sup>[85]</sup> Diese Hydrolyse wird durch die, dem *vacuolar proton-transporting V-type ATPase complex* zugrunde liegenden V-ATPasen katalysiert, wodurch der Protonengradient aufgebaut wird (GO:0016471). Die Proteine der *cytochrome-c oxidase activity* katalysieren dabei die Reduktion von Sauerstoff zu Wasser, dem letzten Schritt der mitochondrialen Atmungskette. Die dadurch freiwerdende Energie wird zur oxidativen Phosphorylierung von ADP zu ATP genutzt (GO:0004129). Die hierfür benötigten Elektronen stammen von vier Cytochrom C Molekülen, welche durch die Katalyse der Holocytochrom C-Typ Synthase zur Verfügung stehen. Diese ineinandergreifenden Prozesse, Funktionen und Komponenten in Kombination mit dem identifizierten signifikant abundanten Protein deuten darauf hin, dass der Energiestoffwechsel in 4DR im Vergleich zu 4AL Mäusen verändert vorliegt.<sup>[85,123]</sup>

## Wichtigste Ergebnisse

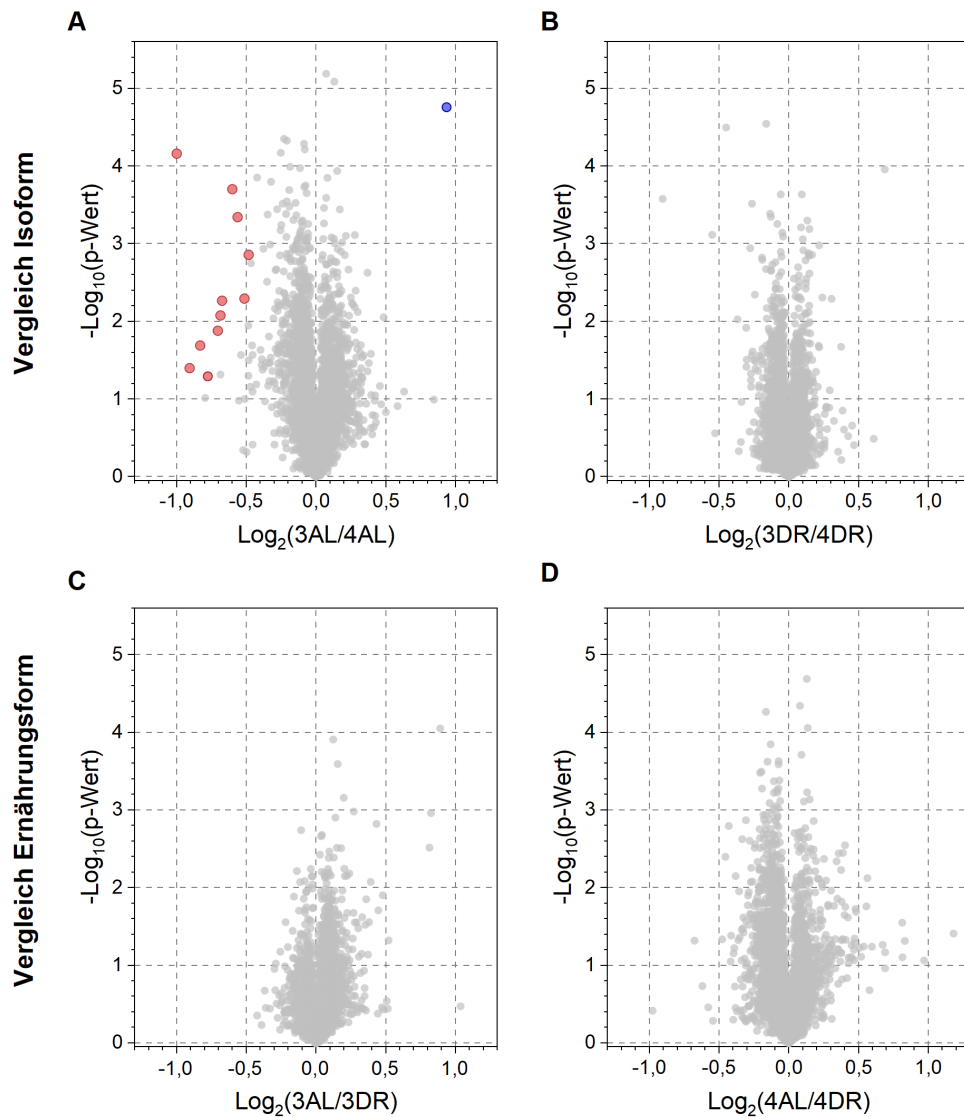
Nachfolgend sind die wichtigsten Ergebnisse der quantitativen Nieren-Analysen stichwortartig zusammengefasst.

1. Basierend auf der Anzahl der differenziell abundanten Proteine
  - a) Tendenzen analog zu Leber-Analysen
    - i. Auswirkung APOE-Isoformen durch Ernährungsbeschränkung minimiert
    - ii. Auswirkungen Ernährungsformen in APOE3-Mäusen stärker ausgeprägt
  - b) ca. 65 % weniger signifikant abundante Proteine vergleichend zu Leber-Analysen
2. Phospholipid-Stoffwechsel scheint in AL-Mäusen ausgeprägter zu sein, wird allerdings durch APOE3-Isoform noch zusätzlich verstärkt. Apolipoproteine (Annotationen: *phospholipid transport*; *phospholipid efflux*) höher abundant in
  - a) 3AL von 3AL-4AL
  - b) 3AL von 3AL-3DR

- c) 4AL von 4AL- 4DR
- 3. Veränderter Energiestoffwechsel in DR-Mäusen. Annotationen in Zusammenhang mit der mitochondrialen Atmungskette
  - a) 3DR von 3DR-4DR: Proteine der NADH-Dehydrogenase (Beginn Atmungskette)
  - b) 4DR von 4AL-4DR: Verschiedene ATPasen, V-ATPasen, Cytochrom C Oxidasen (letzter Schritte der Atmungskette)
- 4. Basierend auf Annotation *keratin filament*: unterschiedliche Auswirkungen der Ernährungsformen auf verschiedene Organe: identifiziert in
  - a) 3DR von 3DR-4DR der Niere - 3DR von 3DR-4DR der Leber
  - b) 3DR von 3AL-3DR der Niere - 3AL von 3AL-3DR der Leber

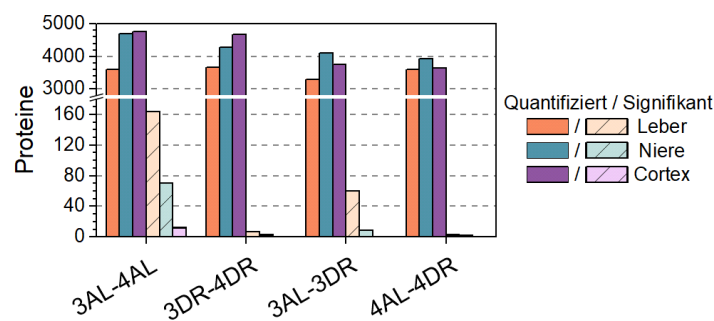
### 3.3.4 Quantitative Analyse von Cortexgeweben

Zusätzlich zu den Leber- und Nierengeweben wurde das Cortexgewebe der APOE TR Mäuse massenspektrometrisch analysiert. Die Gesamtanzahl quantifizierter Proteine liegt mit durchschnittlich 4203 gering hinter den Nieren-Ergebnissen. In Abbildung 3.18 sind die Volcano-Plots der entsprechenden Cortexexperimente dargestellt.



**Abbildung 3.18.:** Volcano-Plots der quantitativen Cortexexperimente unter farblicher Hervorhebung der erhaltenen signifikant abundanten Proteine (rot/blau) zwischen den einzelnen biologischen Zuständen. Signifikanzen wurden durch einen zweiseitigen Student's t-Test mit  $S_0 = 0,3$  und  $\alpha = 0,05$  erhalten. Darstellung der vier durchgeführten Experimente: **A)** 3AL-4AL; **B)** 3DR-4DR; **C)** 3AL-3DR; **D)** 4AL-4DR.

Deutlich zu erkennen ist, dass lediglich für das Experiment 3AL-4AL differenziell abundante Proteine über den zweiseitigen Student's t-Test identifiziert wurden (Abb. 3.18 A). Die Ernährungsformen bei gleicher APOE-Isoform haben demnach keinen Einfluss auf die Proteinbiosynthese und -zusammensetzung des Cortex der Mäuse (Abb. 3.18 C, D). Damit wurde die Tendenz der Analysen der Leber und Niere bestätigt, in welcher die APOE-Isoformen der *ad libitum* ernährten Mäuse den deutlichsten Unterschied im Proteom aufwiesen (Abb. 3.19). Zusätzlich zeigte sich, dass auch innerhalb des Cortexgewebes die Auswirkungen der Isoformen bei Ernährungsrestriktion reduziert wurden beziehungsweise in diesem Falle verschwinden (Abb. 3.18 B). Mit lediglich 12 signifikant abundanten Proteinen innerhalb des 3AL-4AL Experimentes wurde jedoch, vergleichend zu den anderen Geweben, eine deutlich geringere Anzahl beobachtet (Abb. 3.19).



**Abbildung 3.19.:** Vergleich der quantifizierten und differenziell abundanten Proteine aller Gewebe der quantitativen Proteomanalysen der APOE TR Mäuse.

Vergleichend über alle untersuchten Gewebe nimmt die Anzahl der differenziell abundanten Proteine von der Leber über die Niere bis hin zum Cortex deutlich ab, während die Gesamtzahl der quantifizierten Proteine für Niere und Cortex am höchsten ist.

#### APOE3 AL vs. APOE4 AL

Bei der Analyse des Cortexgewebes der *ad libitum* ernährten APOE3- und APOE4-Mäuse wurden 4759 Proteine quantifiziert. Dabei wurde ein Protein mit signifikant höherer Abundanz für den Zustand 3AL und 11 innerhalb des Zustandes 4AL identifiziert (Tab. 3.14).

Für den Zustand 3AL ist dies *WD repeat and FYVE domain-containing protein 1* (WDFY1), ein kritisches Adaptorprotein und Potentiator der Toll like receptor 3 (TLR3)- und TLR4-Stoffwechselwege.<sup>[124,125]</sup> Hu et al. konnten zeigen, dass WDFY1 die Verbindung von TLR-*TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β* (TRIF) überbrückt und dies entscheidend für die TLR-Signalübertragung ist.<sup>[124]</sup>

WDFY1 wurde ebenso in Leber und Niere innerhalb des gleichen Experimentes (3AL-4AL) signifikant höher abundant für den Zustand 3AL identifiziert.

**Tabelle 3.14.:** Differenziell abundante Proteine des Cortexexperimentes 3AL-4AL.

	Protein	Protein- Accession	#Peptide (#seq.spez.* Peptide)	Sequenzab- deckung / %
<b>3AL</b>	WD repeat and FYVE domain-containing prote- in 1	E9Q4P1	6 (6)	20
	BAI1-associated protein 3	S4R1E7	9 (9)	8
	Calretinin	Q08331	15 (14)	54
	FXVD domain-containing ion transport regulator 6	Q9D164	6 (6)	51
	Heme-binding protein 1	A0A140T8J4	6 (6)	38
<b>4AL</b>	Nucleosome assembly pro- tein 1-like 5	Q9JJF0	3 (3)	21
	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase NIMA-interac- ting 4	Q9CWW6	3 (3)	24
	Protein BEX2	Q9WTZ8	2 (2)	21
	Protein IMPACT	O55091	5 (5)	20
	Sodium- and chloride- dependent GABA trans- porter 3	P31650	10 (9)	16
	Synaptic vesicle membra- ne protein VAT-1 homolog- like	Q80TB8	15 (15)	41
	Transgelin	P37804	11 (10)	57

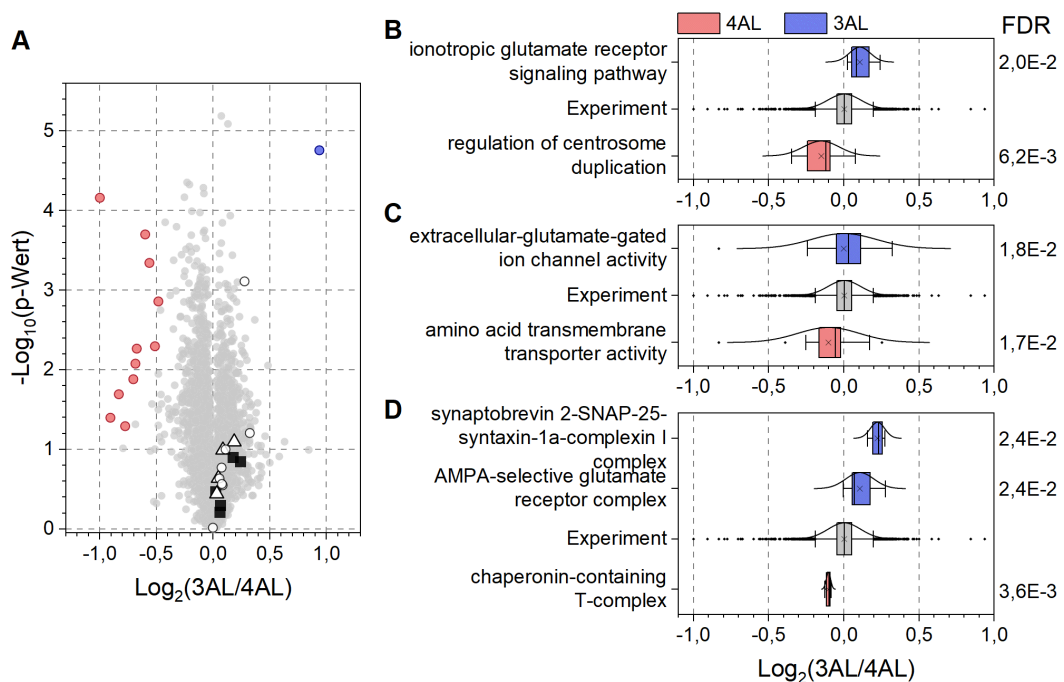
\*seq.spez. = sequenzspezifisch

Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen konnten ZHAO *et al.* durch umfangreiche transkriptomische und metabolomische Analysen des Cortex und des Blutes von menschlichen APOE-TR Mäusen zeigen, dass die Expressionslevel von *Wdfy1* innerhalb der APOE4-Mäuse herunterreguliert waren.<sup>[126]</sup>

Aus der Gruppe der 11 differenziell abundanten Proteine wurden lediglich zwei (Heme-binding protein 1; Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase NIMA-interacting 4) ebenso mit höherer Abundanz innerhalb der identischen Experimente der Leber und Niere gefunden. Das Protein Heme-binding protein 1 wurde als präsymptomatischer Marker der Alzheimer Erkrankung identifiziert und wurden mit häminduzierter Neurotoxizität in Verbindung gebracht.<sup>[127]</sup> Mit Ausnahme von Transgelin, welches in den quantifizierten Proteinen der beiden anderen Geweben identifiziert

wurde, sind die weiteren in Tabelle 3.14 aufgeführten Proteine somit spezifisch für das Cortexgewebe.

Die Durchführung eines *Fisher exact tests* führte zu keiner Identifikation von GO-Annotationen innerhalb der differenziell abundanten Proteine, wodurch entsprechend eine 1D *Annotation Enrichment*-Analyse über alle quantifizierten Proteine durchgeführt wurde (Abb. 3.20). In Abbildung 3.20 B)-D) ist zu erkennen, dass innerhalb der APOE3 AL Mäuse Glutamat-bezogene Annotationen über alle GO-Gruppen identifiziert wurden (GOBP: *ionotropic glutamate receptor signaling pathway*, GO:0035235; GOMF: *extracellular-glutamate-gated ion channel activity*, GO:0005234; GOCC: *AMPA-selective glutamate transport activity*, GO:0032281).



**Abbildung 3.20.:** GO-Annotationen der 1D *Annotation Enrichment*-Analyse des Cortexexperimentes 3AL-4AL. **A)** Volcano-Plot: Ionotrope (Dreiecke) Glutamatrezeptoren (Rechtecke) und weitere Proteine der Glutamat-bezogenen Annotationen des Zustandes 3AL (weiße Kreise). **B)** GOBP-, **C)** GOMF- und **D)** GOCC-Annotationen. Aus Gründen der Transparenz und eindeutigen Zuordnung wurden die Annotationen entsprechend GO-Datenbank in englischer Sprache beibehalten.

Involviert in all diese Annotationen sind Glutamatrezeptoren (Abb. 3.20 A, Rechtecke) sowie für die GOBP- und GOMF-Annotationen zusätzlich spezifisch deklarierte ionotrope Glutamatrezeptoren (Abb. 3.20 A, Dreiecke) (Tab. 3.15). Die Bindung des wichtigsten exzitatorischen Neurotransmitters Glutamat an die entsprechenden Rezeptoren aktiviert die ligandengesteuerten Ionenkanäle. Infolge dessen werden geladene Ionen wie Kalium und Natrium in das Innere der Membran transportiert.<sup>[128]</sup> Eine übermäßige Öffnung dieser Ionenkanäle führt zu einer aku-

ten oder chronischen Exzitotoxizität, welche eine Rolle bei verschiedenen neurodegenerativen Erkrankungen wie der Alzheimer- und Huntington-Krankheit spielen sollen.<sup>[129]</sup> Vergleichbare Ergebnisse wurden mittels *Selected reaction monitoring* (SRM)-LC-MS Analysen des präfrontalen Cortex von Alzheimer-Patienten, welche Träger des APOE4-Genotyps waren und durch In-Silico-Analysen beobachtet.<sup>[130,131]</sup> SWEET *et al.* zeigten, dass im Cortex von APOE4-Trägern mit AD-Pathologie die Abundanzen von Glutamatrezeptoren reduziert vorlagen. Bei weiterführenden Analysen in humanen APOE3-/APOE4-TR Mäusen wurde eine geringe Überschneidung von Proteinen die an der Glutamat-Signalkaskade beteiligt sind zwischen den AD-Patienten und den APOE4-Mäusen beobachtet.<sup>[130]</sup> Fünf dieser Proteine waren ebenso in die oben genannten Glutamat-Annotationen des Cortexexperimentes 3AL-4AL involviert (Tab. 3.15, blau).

**Tabelle 3.15.:** In die Glutamat-bezogenen Annotationen des Zustandes 3AL involvierte Proteine. Die ebenfalls von SWEET *et al.*<sup>[130]</sup> identifizierten Glutamatrezeptoren sind farblich hervorgehoben.

Protein	Protein-Accession	Gen	MW / kDa
Glutamate receptor	Q7TNB5	<i>Gria1</i>	101,5
Glutamate receptor	E9QKC0	<i>Gria2</i>	98,8
Glutamate receptor	G5E863	<i>Gria4</i>	100,8
Glutamate receptor	A2AI21	<i>Grin1</i>	107,9
Glutamate receptor 2	P23819	<i>Gria2</i>	98,6
Glutamate receptor 3	Q9Z2W9	<i>Gria3</i>	100,5
Glutamate receptor ionotropic, delta-1	Q61627	<i>Grid1</i>	112,1
Glutamate receptor ionotropic, delta-2	Q61625	<i>Grid2</i>	113,0
Glutamate receptor ionotropic, kainate 2	P39087	<i>Grik2</i>	102,4
Glutamate receptor ionotropic, kainate 3	B1AS29	<i>Grik3</i>	104,0

Für den Zustand 4AL wurde eine Häufung von Proteinen mit Differenz zum logarithmischen Mittelwert des Experimentes beobachtet, welche für den Transport von Aminosäuren durch die Membran zuständig sind (*amino acid transmembrane transport activity*, GO:0015171).<sup>[85]</sup> Nahezu alle Proteine dieser Annotation gehören der SLC-Familie (*solute carrier proteins*) an. Entgegen den Ionenkanälen binden diese Trägerproteine entsprechende gelöste Stoffe (bspw. Zucker, Aminosäuren, anorganische Ionen) und transportieren diese durch die Membran.<sup>[132,133]</sup> Unter den in dieser Annotation involvierten Proteinen befinden sich auch die für den Abbau der Neurotransmitter Glutamat und  $\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA) wichtigsten Trans-



porter innerhalb des Gehirns: EAA2 (Excitatory amino acid transporter 2, *Slc1a2*); SC6A1 und S6A11 (Sodium- und chloride-dependent GABA transporter 1 bzw. 3, *Slc6a1*, *Slc6a11*). Die Konzentration dieser Transmitter ist ausschlaggebend für die Stimulation der oben beschriebenen Rezeptoren und die übermäßige Aktivierung entsprechend schädlich.<sup>[134]</sup> Interessanterweise scheinen innerhalb der 3AL-Mäuse insbesondere Annotationen in Zusammenhang mit Glutamatrezeptoren verändert vorzuliegen, während Glutamat- und GABA-Transporter involvierte Annotationen im Zustand 4AL beobachtet wurden.

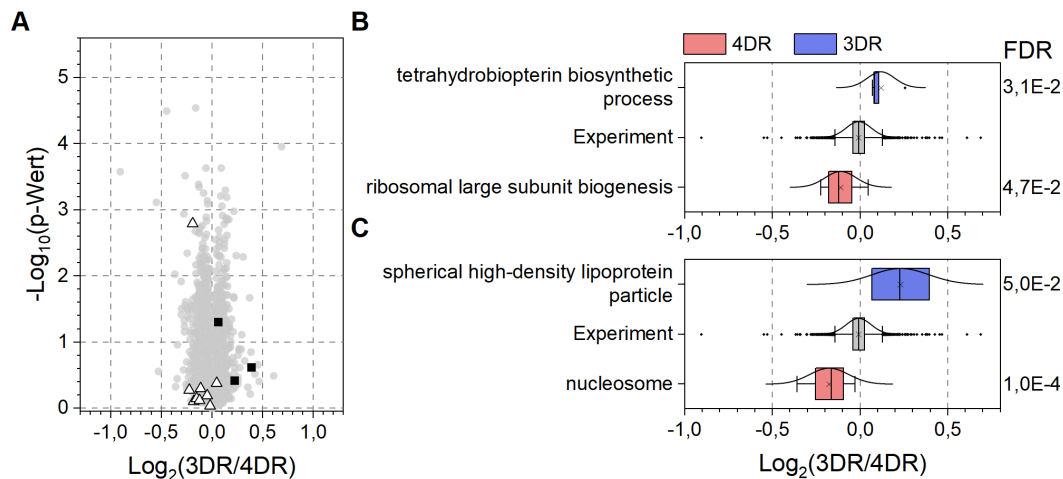
Für die Gruppe der APOE4 AL Mäuse wurde zusätzlich der biologische Prozess *regulation of centrosome duplication* identifiziert, worunter alle Prozesse zusammengefasst sind welche die Zentrosomenduplikation innerhalb des Zentrosom-Zyklus beeinflussen (GO:0010824).<sup>[85]</sup> Bei diesem Vorgang duplizieren sich die beiden Zentriolen eines Zentrosoms und formen Tochterzentriolen aus, welche über den Zellzyklus weiter wachsen.<sup>[135,136]</sup> Zentrosomen selbst stellen das wichtigste Organisationszentrum für Mikrotubuli (*microtubule organizing center*, MTOC) innerhalb der Zelle dar und sind daher unter anderem entscheidend für den Spindelapparat und somit die Zellteilung und Zellpolarität.<sup>[136]</sup>

### APOE3 DR vs. APOE4 DR

Bei der Analyse des Effektes der APOE-Isoformen der ernährungseingeschränkten Mäuse auf das Cortexproteom wurden 4666 Proteine quantifiziert. Durch einen zweiseitigen Student's t-Test wurden jedoch keine differenziell abundanten Proteine identifiziert (Abb. 3.19). Entsprechend scheint die Restriktion der zucker- und fettreichen Ernährung die Auswirkungen der APOE-Isoformen auf die Expression der Cortex-Proteine zu negieren.

Analog zu den Experimenten des Leber- und Nierengewebes erfolgte die 1D *Annotation Enrichment*-Analyse, wobei keine relevant zum Mittelwert des Experimentes veränderten GOMF-Annotationen identifiziert wurden (Abb. 3.21). Die nachfolgend in Abbildung 3.21 B) und C) dargestellten GOBP- und GOMF-Annotationen wiesen dabei innerhalb ihrer Gruppe die größte Differenz zum Mittelwert des Experimentes auf.

Die Proteine der GOBP-Annotation *tetrahydrobiopterin biosynthetic process* des Zustandes 3DR sind an der Bildung von Tetrahydrobiopterin beteiligt, welcher ein entscheidender Kofaktor für eine Reihe verschiedener Enzyme ist (GO:0046146).<sup>[85]</sup> Unter anderem der Hydroxylasen der Aminosäuren Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan, welche essentiell für die Bildung der Neurotransmitter Dopamin, Noradrenalin und Serotonin sind.<sup>[137]</sup> Eine deutlich größere Differenz zum Mit-



**Abbildung 3.21.:** GO-Annotationen der 1D *Annotation Enrichment*-Analyse des Cortex-experimentes 3DR-4DR. **A)** Volcano-Plot: Proteine der Annotationen *ribosomal large subunit biogenesis* (GOBP, Dreiecke) und *spherical high-density lipoprotein particle* (GOCC, Vierecke). **B)** GOBP- und **C)** GOCC-Annotationen. Aus Gründen der Transparenz und eindeutigen Zuordnung wurden die Annotationen entsprechend GO-Datenbank in englischer Sprache beibehalten.

telwert des Experimentes wurde für die GOCC-Annotation *spherical high-density lipoprotein particle* der 3DR-Mäuse erhalten (GO:0034366). Die Hauptproteinkomponente dieser sphärischen HDL-Partikel ist APOA-I. Diese APOA-I-Moleküle sind, im Gegensatz zu den Vorläufern den diskoidalen Partikeln (auch Prä- $\beta$ -HDL genannt), dabei Kleeblattförmig angeordnet, wodurch sich die reife, sphärische Form ergibt.<sup>[138]</sup> Die in dieser Annotation involvierten Proteine sind entsprechend Apolipoprotein A-I, sowie APOA-II und Clusterin (Q00623, P09813, Q06890; Abb. 3.21 A, Vierecke). Innerhalb des Zustandes 4DR wurde die GOBP-Annotation *ribosomal large subunit biogenesis* (Abb. 3.21 A, Dreiecke) identifiziert, welche alle Prozesse beschreibt die an der Biosynthese, dem Transport und der räumlichen Anordnung einer großen ribosomalen Untereinheit beteiligt sind (GO:0042273).<sup>[85]</sup>

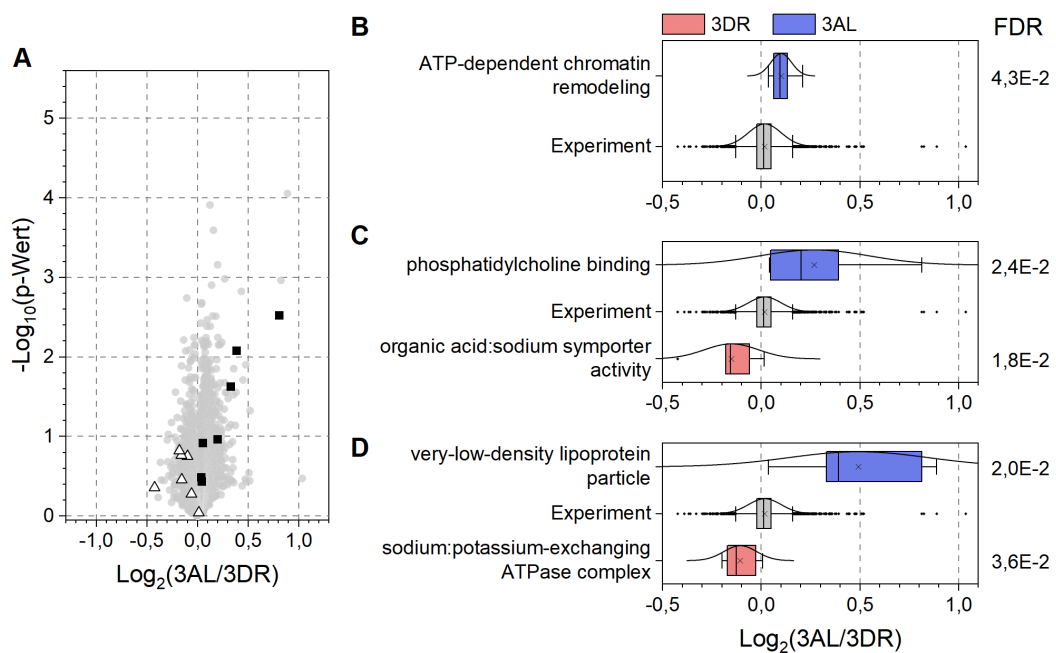
Den Hauptteil der zugrundeliegenden Proteine der GOCC-Annotation *nucleosome* des 4DR-Zustandes stellen Histone dar. Diese basischen Verpackungsproteine binden an die negativ geladenen Phosphatgruppen der DNA und bilden dadurch das Nucleosom (GO:0000786).<sup>[8]</sup>

#### APOE3 AL vs. APOE3 DR

Zusätzlich zu den Untersuchungen des Leber- und Nierengewebes erfolgte die Analyse des Cortex der unterschiedlich ernährten APOE3 produzierenden Mäuse.

Bei 3751 quantifizierten Proteinen wurden, analog zum Experiment 3DR-4DR, nach Durchführung eines zweiseitigen Student's t-Test keine differenziell abundanten Proteine identifiziert. Entgegen der identischen Experimente der Leber und Niere, welche teils deutliche Unterschiede der Proteome aufwiesen, hat die Ernährungsform bei APOE3 Mäusen somit keinen signifikanten Einfluss auf das Cortexgewebe.

Für die biologische Einordnung der quantifizierten Proteine wurde eine 1D *Annotation Enrichment*-Analyse durchgeführt (Abb. 3.22). Innerhalb der Gruppe der biologischen Prozesse wurde dabei keine Annotation für den Zustand 3DR mit relevanter Differenz zum Mittelwert des Experimentes identifiziert (Abb. 3.22 B).



**Abbildung 3.22.:** GO-Annotationen der 1D *Annotation Enrichment*-Analyse des Cortexexperiments 3AL-3DR. **A)** Volcano-Plot: Proteine der GOMF-Annotationen *organic acid:sodium symporter activity* (Dreiecke) und *phosphatidylcholine binding* (Vierecke). **B)** GOBP-, **C)** GOMF- und **D)** GOCC-Annotationen. Aus Gründen der Transparenz und eindeutigen Zuordnung wurden die Annotationen entsprechend GO-Datenbank in englischer Sprache beibehalten.

Innerhalb der 3AL-Mäuse zeigten an der Reorganisation des Chromatins beteiligte Proteine einen leichten Unterschied zum Experiment-Mittelwert (*ATP-dependent chromatin remodeling*, GO:0043044). Bei diesem Vorgang werden durch die Energie der ATP-Hydrolyse die DNA-Histon-Kontakte innerhalb des Nukleosoms verändert, wodurch Prozesse wie die Gentranskription, DNA-Replikation, -Reparatur und -Rekombination reguliert werden.<sup>[139]</sup> Interessant ist, dass im vorherig beschriebenen Experiment 3DR-4DR das Nukleosom, welches in Kombination

mit DNA Hauptbestandteil der Chromatine darstellt, für den Zustand 4DR auftrat. Dies könnte darauf hindeuten, dass innerhalb des Cortex der 3DR-Mäuse Prozesse bezüglich der Chromosomen verändert vorliegen.

Die GOMF-Annotation *phosphatidylcholine binding* beschreibt die Bindung von Proteinen an das Glycophospholipid Phosphatidylcholin (GO:0031210; Abb. 3.22 B, Vierecke). Proteine dieser, für den Zustand 3AL, identifizierten Annotation sind unter anderem die Apolipoproteine A-I, A-II und A-IV. Jene Proteine sind ebenso in der GOCC-Annotation *very-low-density lipoprotein particle* innerhalb des gleichen Zustandes involviert (GO:0034361). Diese Annotation wurde ebenfalls im identischen Nierenexperiment 3AL-3DR sowie 3AL-4AL für den 3AL-Zustand identifiziert, jedoch nicht in den Experimenten der Lebergewebe.

Durch die in der GOMF-Annotation *organic acid:sodium symporter activity* involvierten Proteine des 3DR Zustandes wird der Transport von Na<sup>+</sup>-Ionen und organischen Säuren in eine Richtung durch die Membrane ermöglicht (GO:0005343; Abb. 3.22 A, Vierecke).<sup>[85]</sup> Analog zum Experiment 3AL-4AL (*amino acid transmembrane transport activity*, GOMF, 3AL) gehören die zugrundeliegenden Proteine der SLC-Familie an (Tab. 3.16). Mit Ausnahme des Proteins *SLC family 13 member 5* überschneiden sich die Proteine der Annotationen des Experimentes 3AL-3DR mit jenen von 3AL-4AL. Interessant ist, dass die Transporteraktivitäten im Experiment 3AL-3DR für den Zustand 3DR und in 3AL-4AL für den Zustand 4AL identifiziert wurden. Dies könnte entsprechend auf eine reduzierte Aktivität innerhalb der 3AL-Mäuse zurückzuführen sein.

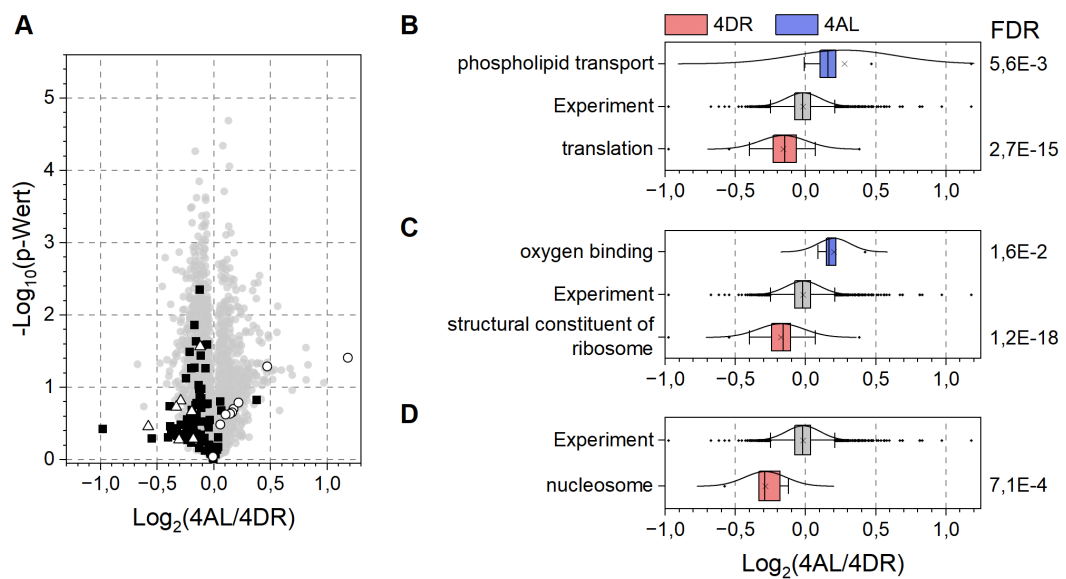
**Tabelle 3.16.:** Die in der GOMF-Annotation *organic acid:sodium symporter activity* der 1D Annotation Enrichment-Analyse involvierten Proteine des Cortexexperimentes 3AL-3DR.

Protein	Protein-Accession	Gen	Sequenzabdeckung / %
Excitatory amino acid transporter 1	P56564	<i>Slc1a3</i>	23
Excitatory amino acid transporter 2	P43006	<i>Slc1a2</i>	33
Neutral amino acid transporter A	O35874	<i>Slc1a4</i>	21
Sodium- and chloride-dependent GABA transporter 1	P31648	<i>Slc6a1</i>	17
Sodium- and chloride-dependent GABA transporter 3	P31650	<i>Slc6a11</i>	19
Sodium- and chloride-dependent glycine transporter 1	P28571	<i>Slc6a9</i>	9
Solute carrier family 13 member 5	Q67BT3	<i>Slc13a5</i>	5

Zusätzlich zu den oben beschriebenen Transportprozessen des Experimentes 3AL-3DR wurde die GOCC-Annotation *sodium:potassium-exchanging ATPase complex* ebenfalls innerhalb des Zustandes 3DR identifiziert (GO:0005890). Die  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPasen sind im Gegensatz zu den vorherig genannten Transportern Antiporter: je Zyklus werden drei  $\text{Na}^+$ -Ionen aus der Zelle transportiert, während zeitgleich zwei  $\text{K}^+$ -Ionen unter ATP Hydrolyse importiert werden.<sup>[8]</sup>

## APOE4 AL vs. APOE4 DR

Innerhalb des Experimentes der unterschiedlich ernährten *APOE4* exprimierenden Mäuse wurden, mit insgesamt 3636 quantifizierten Proteinen, die geringste Protein-Anzahl über alle Cortexexperimente beobachtet. Folgend zu den Experimenten 3DR-4DR und 3AL-3DR wurden auch in dieser Analyse durch einen Student's t-Test keine differenziell abundanten Proteine identifiziert. In Abbildung 3.23 sind die GO-Annotationen der 1D *Annotation Enrichment*-Analyse dargestellt. In der Gruppe der zellulären Funktionen wurden dabei keine Annotationen für den Zustand 4AL mit relevanter Differenz zum Mittelwert des Experimentes identifiziert (Abb. 3.23 D).



**Abbildung 3.23.:** GO-Annotationen der 1D *Annotation Enrichment*-Analyse des Experiments 4AL-4DR des Cortexgewebes. **A)** Volcano-Plot: Proteine der Annotationen *phospholipid transport* (GOBP, Kreise), *translation* (GOBP, Vierecke) und *nucleosome* (GOCC, Dreiecke). **B)** GOBP-, **C)** GOMF-, **D)** GOCC-Annotationen. Aus Gründen der Transparenz und eindeutigen Zuordnung wurden die Annotationen entsprechend GO-Datenbank in englischer Sprache beibehalten.

Übereinstimmend mit dem identischen Experiment im Nierengewebe wurde in diesem Cortexexperiment für den Zustand 4AL ebenso die GOBP-Annotation *phospholipid transport* identifiziert (GO:0015914; Abb. 3.23 A, Kreise). Dieser veränderte Lipidstoffwechsel innerhalb der *ad libitum* ernährten Mäuse spiegelt die Ergebnisse der Nierenexperimente wider. Die involvierten Proteine der identifizierten GOBP-Annotation *translation* und der GOMF-Annotation *structural constituent of ribosome* überschneiden sich um circa 80 % (GO:0006412, GO:0003735). In Abbildung 3.23 A) sind die Proteine der Annotation *translation* mit schwarzen Vierecken visuell hervorgehoben. Deutlich ist hierbei der Trend der logarithmischen Abundanzen der Proteine in Richtung des 4DR Zustandes zu erkennen. Analog zum Experiment 3DR-4DR konnte auch innerhalb dieses Experimentes die GOCC-Annotation *nucleosome* für den Zustand 4DR identifiziert werden (GO:0000786; Abb. 3.23 D, Dreiecke). Werden die Annotationen für den Zustand 4DR zwischen den beiden Experimenten (3DR-4DR; 4AL-4DR) verglichen, wird ersichtlich, dass Prozesse des Ribosoms betreffend und spezifisch des Nucleosoms im Cortex der APOE4 DR-Mäuse relevant vertreten sind.

## Wichtigste Ergebnisse

Nachfolgend sind die wichtigsten Ergebnisse der quantitativen Cortex-Analysen stichwortartig zusammengefasst.

1. Basierend auf der Anzahl der differenziell abundanten Proteine
  - a) Tendenz analog zu Leber- und Nieren-Analysen
    - i. Signifikanteste Auswirkungen der APOE-Isoformen innerhalb der *ad libitum* ernährten Mäuse
    - ii. Auswirkung APOE-Isoformen durch Ernährungsbeschränkung minimiert
  - b) Keine differenziellen Änderungen der Cortex-Proteome innerhalb der Experimente 3DR-4DR, 3AL-3DR und 4AL-4DR
2. Veränderte Abundanz von Glutamatrezeptor-Proteinen in APOE4 AL Mäusen könnten in Relation zur Alzheimer-Krankheit stehen
3. Veränderter Ionentransport in 3AL Mäusen: Identifizierte Annotationen, welche Transportproteine der SLC-Familie involvierte:
  - a) 4AL von 3AL-4AL
  - b) 3DR von 3AL-3DR

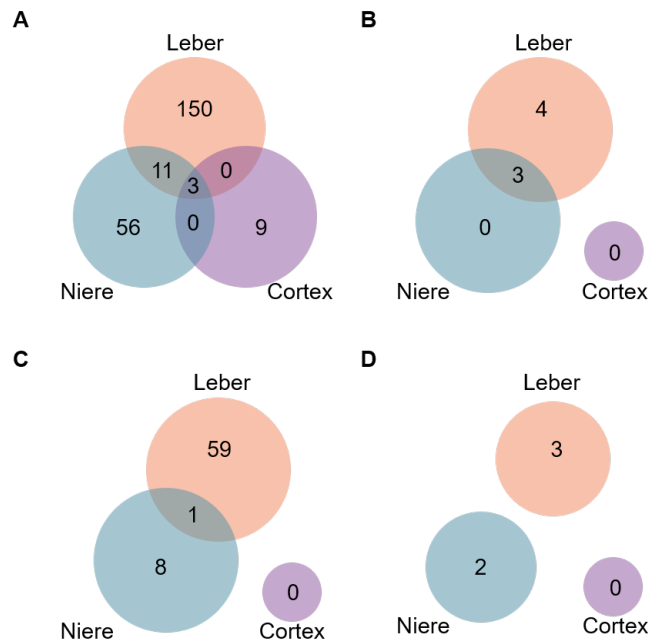
4. Basierend auf Lipid-Annotationen: Veränderter Lipidstoffwechsel in *ad libitum* ernährten und APOE3-Mäusen
  - a) 3DR von 3DR-4DR (*spherical high-density lipoprotein particle*)
  - b) 3AL von 3AL-3DR (*phosphatidylcholine binding, very-low-density lipoprotein particle*)
  - c) 4AL von 4AL-4DR (*phospholipid transport*)
  - d) Teilweise Überschneidung der Annotationen mit identischen Nierenexperimenten
  
5. Annotationen des Nucleosoms und Ribosomes betreffend in APOE4 DR Mäusen
  - a) 4DR von 3DR-4DR
  - b) 4DR von 4AL-4DR

### 3.3.5 Vergleich der differenziell abundanten Proteine

Der Vergleich aller identifizierter, signifikant abundanter Proteine zwischen den zwölf durchgeführten Gewebeexperimenten ergab insgesamt 15 Proteine, welche in mindestens zwei der drei Geweben beobachtet wurden (Tab. A.9). Innerhalb der 3AL-4AL Experimente wurden hierbei die einzigen differenziell abundanten Proteine identifiziert, welche in allen drei Geweben auftraten (Abb. 3.24 A). Zwei dieser Proteine wurden für den Zustand 4AL (Heme-binding Protein 1, Peptidylprolyl cis-trans isomerase NIMA-interacting 4) und eines für den Zustand 3AL (WD repeat and FYVE domain-containing protein 1) identifiziert. Heme-binding Protein 1 (Hebp1) wurde als einziges dieser drei Proteine ebenso im Experiment 3DR-4DR in Leber und Niere beobachtet, allerdings für den Zustand 4DR. Dies deutet auf einen ernährungsunabhängigen Zusammenhang zwischen der Abundanz von Hebp1 und dem APOE4-Genotyp hin.

Alle differenziell abundanten Proteine des Nierenexperimentes 3DR-4DR wurden ebenso im gleichen Leberexperiment beobachtet (Abb. 3.24 B). Interessant ist, dass alle hier beobachteten höher abundanten Proteine der Experimente 3DR-4DR ebenfalls in den Geweben der AL-Mäuse identifiziert wurden (Tab. A.9).

Für die 3AL-3DR Experimente wurde nur das Protein Ceruloplasmin mit höherer Abundanz gewebeübergreifend identifiziert (Abb. 3.24 C). Innerhalb des gleichen Experimentes der Brutgeschwister (4AL-4DR), welches die geringste Anzahl an



**Abbildung 3.24.:** Überschneidung der identifizierten signifikant abundanten Proteine zwischen den analysierten Geweben (Leber, Niere und Cortex). Korrespondierende Venn-Diagramme der Experimente **A)** 3AL-4AL, **B)** 3DR-4DR, **C)** 3AL-3DR und **D)** 4AL-4DR.

signifikant abundanten Proteinen aufwies, konnte keine Überschneidung zwischen den Geweben beobachtet werden (Abb. 3.24 D).

## 3.4 Ausblick

In den vorangegangenen quantitativen Analysen wurden die Gewebe von Leber, Niere und Cortex der *APOE3* bzw. *APOE4* exprimierenden Mäuse, welche eine *ad libitum* (AL) oder *dietary restricted* (DR) Ernährung erhielten, mittels isobaren Massenmarkierungen massenspektrometrisch analysiert.

Für die funktionelle Interpretation der identifizierten Proteine über *Fisher's exact tests* beziehungsweise 1D *Annotation enrichment* Analysen wurde geprüft ob statistische Häufungen der korrespondierenden *Gene Ontology* Annotationen gegenüber der globalen Verteilung vorlagen.<sup>[140]</sup> Die *Gene Ontology*, welche eine der meist verwendeten Ontologien darstellt, verbindet über ein einheitliches, systematisches Vokabular und eine gerichtete azyklische Darstellung (*directed acyclic graphs*, DAG) das aktuelle biologische Wissen über Gene und Genprodukte.<sup>[141,142]</sup> Da dieser Wissensstand stark dynamisch ist, verändern sich GO-Terme und Annotationen



entsprechend stetig mit neuen experimentellen Daten. In einer großangelegten, systematischen Studie evaluierten TOMCZAK *et al.* den Effekt dieser Dynamik auf die Ergebnisse von Anreicherungsverfahren.<sup>[143]</sup> Die beobachteten geringen Übereinstimmungen der Ergebnisse zwischen den älteren und neueren GO-Versionen zeigen die Problematik dieser Dynamik, jedoch auch die deutlichen Fortschritte der Forschung auf. Ein zusätzlicher zu beachtender Faktor bei der Verwendung von Ontologien und Anreicherungsverfahren sind die sogenannten *Annotation Bias*<sup>1</sup>, welche Folge von ungleichmäßiger Informationstiefe der Annotierungen verschiedener Gene innerhalb des gleichen Organismus sind.<sup>[141,143]</sup> In Hinblick auf die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse könnte eine zukünftige, neue Evaluierung mittels Anreicherungsverfahren weitere Einblicke in die tatsächliche molekulare Mechanistik und die biologischen Zusammenhänge der APOE-Isoformen und die Auswirkungen einer fett- und zuckerreichen, westlichen Ernährung liefern.

Die Analyse der APOE-Isoformen und ernährungsformabhängigen Effekte könnte von den drei untersuchten Geweben (Leber, Niere und Cortex) auf eine globale, Multi-Gewebe-Proteomanalyse ausgeweitet werden. Die hierüber zu gewinnenden gewebespezifischen Informationen der Proteome würden erheblich zur Aufklärung der biologischen Mechanismen und Interaktionen von Apolipoprotein E mit spezifischen Proteinen beitragen. Insbesondere von Interesse könnte hierbei die Analyse von krankheitsspezifisch produzierten Proteinen und Proteinmustern, innerhalb von Krankheitsbildern welche bereits mit APOE als Risikofaktor assoziiert wurden, darstellen. Hierbei könnten essenzielle Einblicke in die mechanistischen Details beispielsweise von Kardiovaskuläre Erkrankungen, der Alzheimer Krankheit oder der nicht-alkoholische Fettlebererkrankung gewonnen werden.<sup>[21,24,144–146]</sup> Die von GEIGER *et al.*, durch globale Proteomanalysen von 28 Geweben von SILAC-Mäusen, erhaltenen Proteom-„Karten“ (*mapping*) könnten für die Analysen der zucker- und fettreich ernährten Mäuse einen guten Vergleichshintergrund liefern.<sup>[147]</sup>

Infolge der hohen zeitlichen Dynamik des Proteoms ist auch ein Vergleich der translatierten Proteine unterschiedlich alter APOE-Mäuse äußerst interessant. Hierdurch wäre die Möglichkeit gegeben die Krankheitsentwicklung beziehungsweise die Zusammensetzung des Proteoms bei ernährungseingeschränkten und *ad libitum* ernährten Mäusen und die Auswirkungen der entsprechenden APOE-Isoformen nachzuvollziehen. Daraus könnten entscheidende Informationen zu den oben genannten Krankheiten sowie zu den zugrundeliegenden biologischen Mechanismus gewonnen werden.

Ein großer und gut erforschter genetischer Risikofaktor für eine sporadisch, wie auch spät auftretende familiäre Alzheimer Erkrankung, ist das  $\epsilon 4$ -Allel des APOE-Gens.<sup>[20,21]</sup> Interessanterweise wurden dennoch weder in den quantitativen Prote-

---

<sup>1</sup>*Bias* = systematischer Fehler, welcher zu einer Verzerrung der Ergebnisse führt

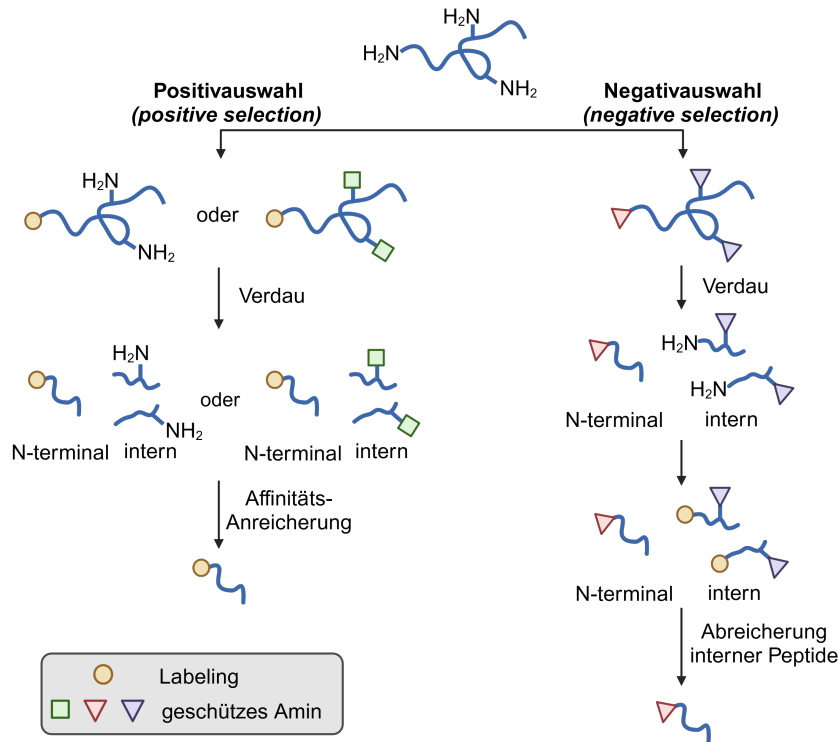
Proteomanalysen des Cortex der AL- noch der DR-Mäuse Proteine oder Proteinmuster, die charakteristisch für neurodegenerative Erkrankungen sind, beobachtet (Kap. 3.3.4). Anstatt der verwendeten männlichen Mäuse könnte die Analyse des Cortex von weiblichen Mäusen, welche das Geschlecht mit einem deutlich erhöhten Risiko einer AD Erkrankung darstellt, für die Aufklärung der bislang unbekannten mechanistischen Details der Alzheimer Krankheit führen.<sup>[148–150]</sup> Folgend könnte auch eine Gender-vergleichende Proteomanalyse der Gewebe der AL und DR APOE-Mäuse für die Erforschung der molekularen Auswirkungen der APOE-Isoformen von großem Interesse sein.

## 4.1 Einleitung

Ein in der Proteomik stetig wachsender Forschungszweig ist die spezifische Analyse von Protein N-Termini (N-Terminomik), wodurch verkürzte, alternativ gespleißte und co- oder posttranslational modifizierte Proteoformen identifiziert werden können.<sup>[151,152]</sup> Protein N-Termini haben entscheidenden Einfluss auf die Eigenschaften, Funktionen und der Halbwertszeit (entsprechend der *N-End Rule* bzw. *N-Degron Pathway*) der Proteine.<sup>[153,154]</sup> Fehlerhafte Prozessierung in den für die Entstehung verschiedener N-Termini zugrunde liegenden Mechanismen, beispielsweise der Proteolyse, stehen in starker Assoziation zu Krankheiten wie der Alzheimer Erkrankung oder verschiedenen Krebserkrankungen.<sup>[155,156]</sup> Eine tiefgehende Proteom-weite Analyse der Abundanzen entsprechender N-Termini könnte dahergehend wichtige Ansatzpunkt für spezifische Medikamente liefern sowie potenzielle Proteoform-Biomarker identifizieren.<sup>[154,157,158]</sup> LC-MS-basierte Methodiken sind, analog zur quantitativen Proteomik, aufgrund ihrer hohen Sensitivität und Durchsatzleistung unerlässlich innerhalb der N-Terminomik geworden. Innerhalb klassischer *Bottom-Up* Datenbanksuchen wird, um die Rechenzeit und den Suchraum zu verringern, oftmals eine Voll-enzymatische Suche durchgeführt.<sup>[159]</sup> Jedoch ist auch bei Durchführung einer semi-enzymatischen Suche eine Identifizierung von N-terminalen Peptiden, welche die Spaltstellen-Spezifität der Protease am C-Terminus aufweisen, aufgrund der geringen Häufigkeit in Relation zur Gesamtzahl aller generierten Peptide des Proteoms oft nur bedingt erfolgreich.<sup>[160]</sup> Ein weiterer entscheidender Punkt ist, dass in den komplexen BU-Datensätzen nicht differenziert werden kann welche der identifizierten N-Termini *in vivo* und welche *in vitro* generiert wurden.

Aufgrund dessen wurden zahlreiche An- bzw. Abreicherungsstrategien entwickelt um native und neo-N-terminale Peptide von internen, durch den *in vitro* Verdau entstandenen, Peptiden zu trennen. Diese Strategien lassen sich in die zwei Kategorien positive und negative Anreicherungen (*positive and negative selection enrichment*) einteilen (Abb. 4.1). In positiven Anreicherungsverfahren werden die  $\alpha$ -Amine der N-terminalen Peptide z.B. mit Biotin oder hydrophoben Labelreagenzien markiert, während die  $\epsilon$ -Amine der Lysin Seitenketten ungeschützt oder geschützt vorliegen (Abb. 4.1, links). Nach enzymatischen Verdau werden die N-terminalen Peptide

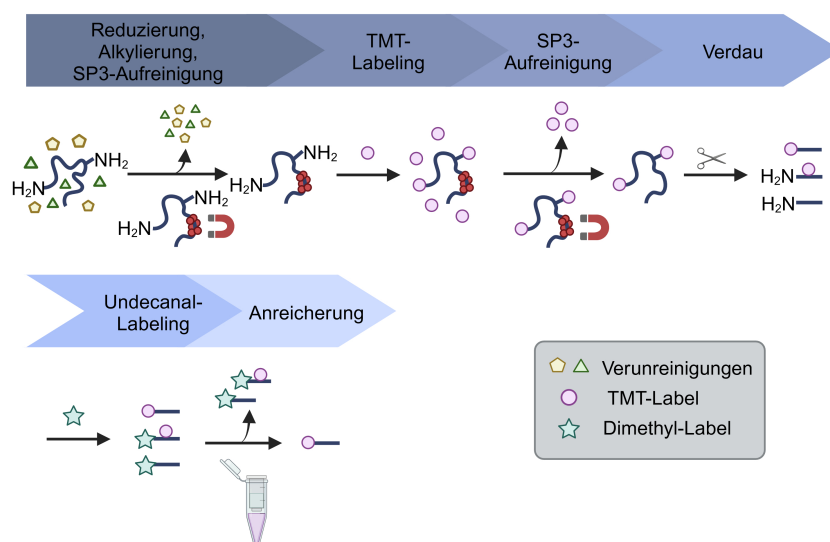
selektiv über die Affinitätslabel separiert und hierdurch angereichert.<sup>[154,159]</sup> Ein Nachteil stellt die nicht-kovalente Bindung zwischen Streptavidin beziehungsweise Avidin und Biotin dar, infolge dessen unspezifische Peptidverluste auftreten.<sup>[161]</sup> Zu dieser Anreicherungsmethode zählen unter anderem die Biotinylierung, CHOPS (*chemical enrichment of protease substrates*) oder N-TOP (*N-terminal-oriented proteomic*).<sup>[162–164]</sup>



**Abbildung 4.1.:** Schematische Darstellung der positiven und negativen Anreicherungsmethoden für N-terminale Peptide. Erstellt mit Biorender.com.

Die negative Anreicherungsmethodik von N-terminalen Peptiden basiert auf der selektiven Abreicherung der gelabelten  $\alpha$ -Amine von internen Peptiden (Abb. 4.1, rechts). Hierzu werden die N-terminalen  $\alpha$ -Amine und die  $\epsilon$ -Amine von Lysin geschützt. Optional können nach proteolytischem Verdau auch die freien, internen Aminoamine gelabelt werden.<sup>[154,159]</sup> Die nachfolgende Separation kann beispielsweise chromatographisch (z.B. COFRADIC (*combined fractional diagonal chromatography*); SCX (*strong cation exchange*)-basierte Ansätze) oder über aminreaktive Reagenzien (z.B. TAILS (*terminal amine isotopic labeling of substrates*)) erfolgen.<sup>[165–167]</sup> Ein weiterer Ansatz ist die Erhöhung der Hydrophobizität durch zusätzliche Modifikation der internen Peptide, wodurch diese leicht von nativen oder chemisch gelabelten N-terminalen Peptiden durch Umkehrphasenchromatographie (*reversed-phase chromatography*, RP-LC) getrennt werden können.<sup>[159]</sup> Innerhalb des *hydrophobic tagging-assisted N-termini enrichment* (HYTANE)-Ansatzes werden die freien primären Aminoamine auf Proteinebene dimethyliert und nach proteolytischem

Verdau die  $\alpha$ -Amine der internen Peptide mit Hexadecanal modifiziert und über RP-LC abgereichert.<sup>[168]</sup> Ein Nachteil der hohen Hydrophobizität von Hexadecanal ist, dass die Bindung zum C<sub>18</sub>-Material der Säule selbst durch Waschen der Säule mit hohen Anteilen organischen Lösungsmitteln erhalten bleiben kann. Zusätzlich weist Hexadecanal einen hohen Gefrierpunkt von 35 °C auf, wodurch dieses bei Raumtemperatur gefriert und innerhalb von Hexadecanal-haltigen Lösungen Phasentrennungen beobachtet werden können. Hierdurch wird die Reproduzierbarkeit dieser N-Terminomik Ansätze reduziert und unspezifische Verluste treten auf.<sup>[159]</sup> WENG *et al.* entwickelten einen HYTANE-ähnlichen Ansatz für die Anreicherung N-terminaler Peptide. In der *High-efficiency undecanal based N-termini enrichment* (HUNTER)-Strategie wird das kurzkettigere und bei Raumtemperatur flüssige Undecanal verwendet. Zur Verbesserung der Reproduzierbarkeit und Minimierung von unspezifischen Verlusten nutzten die Autoren für die Proteinreinigung hydroxylierte, magnetische Partikel (*Beads*) entsprechend der *single-pot solid-phase-enhanced sample preparation* (SP3)-Strategie.<sup>[169]</sup> In der Adaption dieses Ansatzes durch MEYER *et al.* wurde die Dimethylierung der N-termini auf Proteinebene durch Labeling mit *tandem mass tags* (TMT) ersetzt (Protokoll für diese Methode: <https://www.protocols.io/view/tmtprohunter-n-terminomics-bi44kgyw>; Abb. 4.2).<sup>[170]</sup> Hierdurch wird das *Multiplexing* von Proben ermöglicht, dessen Vor- und Nachteile bereits in Kapitel 3.1 erläutert wurden. Da das Labeling zu Beginn der Probenvorbereitung stattfindet können zudem die unterschiedlichen Proben anschließend zusammengeführt und als eine einzige Probe weiterführend bearbeitet werden.



**Abbildung 4.2.:** Schematische Darstellung des Ablaufes der *Tandem Mass Tag-High-efficiency Undecanal based N-Termini EnRichment* (TMT-HUNTER)-Strategie nach MEYER *et al.*<sup>[171]</sup>. Erstellt mit Biorender.com.

## 4.2 Material und Methoden

### 4.2.1 Chemikalien

**Tabelle 4.1.:** Verwendete Chemikalien.

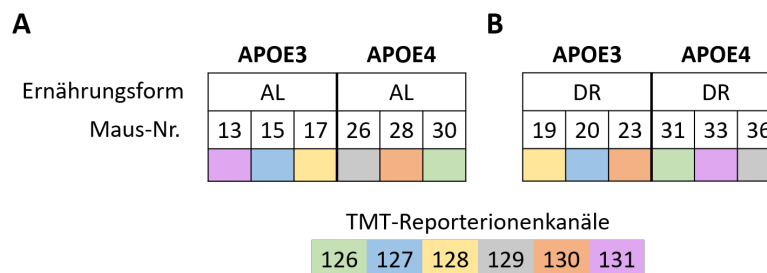
Chemikalien	Information
2-Chloracetamid (2-CAA)	$\geq 98,0$ %, Sigma-Aldrich
Acetonitril (ACN)	$\geq 99,9$ %, Sigma-Aldrich
Ethanol (EtOH)	$\geq 99,6$ %, Sigma-Aldrich
Guanidiniumchlorid	$\geq 99,5$ %, Roth
Hydroxylamin (50 %)	Thermo Fisher Scientific
Methanol (MeOH)	$\geq 99,6$ %, Sigma-Aldrich
Deionisiertes Wasser	18,2 M $\Omega$ , Arium611-System, Satorius
RapiGest™ SF Tensid	Waters
Natriumcyanoborhydrid	5 M in 1 M NaOH, Sigma-Aldrich
Sera-Mag™ SpeedBeads™	
Kat. Nr.: 65152105050350	Cytiva
Kat. Nr.: 45152105050250	Cytiva
TMTsixplex™ Labeling Kit	Thermo Fisher Scientific
Trifluoressigsäure (TFA)	$\geq 99,0$ %, Sigma-Aldrich
Tris(2-carboxyethyl)phosphin (TCEP)	Merck
Trypsin (Pierce™, MS-Qualität)	Thermo Fisher Scientific
Undecanal	$\geq 97,0$ %, Sigma-Aldrich

### 4.2.2 APOE3 und APOE4 *Targeted Replacement* Mäuse

Die untersuchten Leberlysate der AL- und DR-ernährten, gezielt genmodifizierten *APOE3* bzw. *APOE4* exprimierenden Mäuse wurden von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. RIMBACH erhalten. Informationen zu den Haltungsbedingungen sowie Aufarbeitung der Gewebe können Kapitel 3.2.2 entnommen werden.

### 4.2.3 TMT-HUNTER Ansatz

Die Probenvorbereitung basiert auf dem HUNTER-Ansatz von Weng *et al.*, welcher nachfolgend von Meyer *et al.* adaptiert wurde.<sup>[169,171]</sup> Für jeden biologischen Zustand (AL, DR) wurden, identisch zu den quantitativen Proteomanalysen (Kap. 3), Lysate von drei Mäusen verwendet und in Aliquote zu 150 bzw. 100 µg Protein aliquotiert (Abb. 4.3).



**Abbildung 4.3.:** Experimentelles Design der N-Terminomik Ansätze. Angabe der für das **A)** AL- und **B)** DR-Experiment verwendeten Mäuse und der nach dem Zufallsprinzip zugeordneten TMT-Reporterionenkanäle.

Die Aliquote wurden mit deionisiertem Wasser auf 100 µL aufgefüllt, 2,08 µL 300 mM TCEP zugegeben und 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die Alkylierung erfolgte durch Zugabe von 7,32 µL 400 mM 2-CAA (lichtgeschützt, 30 min, 20 °C). Entsprechend des SP3-Protokolls von Hughes *et al.* wurden 200 µL je SpeedBeads™-Stocklösung (50 mg/mL) in einem neuen Reaktionsgefäß kombiniert, die Partikel mittels Magnet fixiert und der Überstand entfernt.<sup>[172]</sup> Nach dreimaligem Waschen mit je 1 mL deionisiertem Wasser wurden die Partikel in 1 mL deionisiertem Wasser (20 µg/µL) aufgenommen. Je Probe wurden die präparierten SP3-Partikel in einem Verhältnis von 20:1 (wt/wt) zugegeben. Die Bindung wurde durch Zugabe von EtOH (Endkonzentration: 80 %) und anschließender Inkubation (18 min, 20 °C) initiiert. Nach dreimaligem Waschen mit 200 µL 80 % EtOH, bei welchem ein Aufwirbeln der Partikel zu vermeiden ist, wurde der Überstand verworfen. Die magnetischen Partikel wurden in 22,5 µL 6 M Guanidiniumchlorid, 30 µL 0,5 M HEPES (pH 8) und 4,5 µL 126,6 M TCEP resuspendiert und inkubiert (30 min, 20 °C). Die TMT-6plex-Reagenzien wurden bei Raumtemperatur equilibriert, in je 57 µL EtOH gelöst und entsprechend dem in Abbildung 4.3 dargestellten Schema zugegeben. Nach Inkubation (90 min, 20 °C) wurde das überschüssige Labelreagenz durch Zugabe von je 8 µL 5 % Hydroxylamin (45 min, 20 °C) gequencht. Die Proben inklusive der magnetischen Partikel wurden zusammengeführt und für die weitere Aufarbeitung in zwei Aliquote zu je 366 µL (450 bzw. 300 µg Peptide) aufgeteilt. Je Aliquot wurde eine Endkonzentration von 80 % EtOH eingestellt und

erneut inkubiert (15 min, 20 °C). Nach dreimaligen Waschen mit 600 µL 90 % EtOH wurden die Überstände verworfen. Für den enzymatischen Verdau wurde Trypsin in 200 mM HEPES in einem Verhältnis von 1:50 (wt/wt) zugegeben (18 h, 37 °C). Für nachfolgende Analysen des sogenannten Pre-HUNTERS wurden je Experiment 5 Gew.-% der Peptide in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Zu den ursprünglichen Aliquoten wurden, nach Zugabe von 100 % EtOH (Endkonzentration: 40 %), Undecanal in einem 1:20 (wt/wt) Verhältnis und 300 mM Natriumcyanoborhydrid zugegeben. Die Aliquote eines Experimentes wurden inklusive der magnetischen Partikel zusammengeführt und nach Prüfung des pH-Wertes (pH 8,0) für 1 h bei 37 °C inkubiert. Nach Fixierung der Partikel wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 10 % TFA angesäuert (pH 3,0). Die Anreicherung der N-terminalen, mit TMT-gelabelten Peptide erfolgte mittels C<sub>18</sub>-SepPak-Kartusche (50 cc, Waters). Hierzu wurde diese dreimal mit 1 mL 0,1 % TFA in 40 % EtOH equilibriert, die Probe geladen und der Durchfluss, welcher die angereicherten Peptide enthält, aufgefangen (im Folgenden HUNTER-Probe). Die Pre-HUNTER- und HUNTER-Proben wurden im Vakuum getrocknet und jeweils über eine weitere C<sub>18</sub>-SepPak-Kartusche (50 cc, Waters) entsalzt. Dafür wurden die Kartuschen zweimalig mit 1 mL 50 % ACN gewaschen, zweimal mit 1 mL 3 % ACN, 0,1 % TFA equilibriert und die Proben ebenfalls zweimalig geladen. Nach zweimaligem waschen mit 1 mL 5 % MeOH in 0,1 % TFA, erfolgte die Elution mit 400 µL 70 % ACN und 400 µL 100 % ACN.

## 4.2.4 HUNTER-Ansatz

Die Probenaufarbeitung nach dem HUNTER-Ansatz<sup>[169]</sup> erfolgte mit 100 µg Proteinmenge der Leber-Lysate der ernährungseingeschränkten Mäuse, entsprechend dem experimentellem Design in Abbildung 4.3. Das Volumen der Proben wurde mit 100 mM HEPES auf 50 µL aufgefüllt. Nach erfolgter Reduzierung durch Zugabe von 5 µL 100 mM DTT (30 min, 37 °C) wurden die Proben mit 13,1 µL 400 mM 2-CAA (30 min, 20 °C, lichtgeschützt) alkyliert. Überschüssiges Reduzierungsreagenz wurde mit 29,2 µL 100 mM DTT (20 min, 20 °C, lichtgeschützt) abgefangen. Die Präparation der SP3-Partikel erfolgte analog zu Kapitel 4.2.3. Je Probe wurden 50 µL SP3-Lösung (20 µg/µL) zugeben und die Bindung durch Zugabe von 100 % EtOH (Endkonzentration: 40 %) und Inkubation (18 min, 20 °C) initiiert. Der Überstand wurde nach Fixierung der Partikel durch einen Magneten entfernt, die Partikel folgend zweimal mit 400 µL 90 % EtOH gewaschen und der Überstand erneut entfernt. Je Probe wurden 240 µL 200 mM HEPES (pH 7,5), 5,1 µL 2 M Formaldehyd und 10,2 µL 1 M Natriumcyanoborhydrid zugegeben. Nach Inkubation (2 h, 37 °C)



wurden erneut 5,1  $\mu\text{L}$  2 M Formaldehyd sowie 10,2  $\mu\text{L}$  1 M Natriumcyanoborhydrid zugegeben und über Nacht (17,5 h, 37 °C) inkubiert. Das Quenching der überschüssigen Reagenzien erfolgte durch Zugabe von 47,8  $\mu\text{L}$  4 M TRIS-Lösung (pH 6,8) und 3 h Inkubation bei 37 °C. Je Probe wurden 25  $\mu\text{L}$  einer neu präparierten SP3-Lösung sowie 1057  $\mu\text{L}$  100 % EtOH zugegeben und inkubiert (25 min, 20 °C). Nach Entfernung des Überstandes wurden die Partikel zweimalig mit 400  $\mu\text{L}$  90 % EtOH gewaschen und in 50  $\mu\text{L}$  200 mM HEPES aufgenommen. Für den enzymatischen Verdau wurde Trypsin (in 200 mM HEPES) in einem Verhältnis von 1:50 (wt/wt) zugegeben und inkubiert (über Nacht, 37 °C). Durch Kühlung der Proben auf Eis wurde der Verdau gestoppt und analog zu Kapitel 4.2.3 wurden 5 Gew.-% der Peptidmenge für Pre-HUNTER-Analysen in neue Reaktionsgefäße überführt. Vor dem Labeling mit Undecanal wurde die EtOH-Konzentration mit 63,3  $\mu\text{L}$  100 % EtOH auf 40 % eingestellt. Anschließend wurde jeder Probe 2,3  $\mu\text{L}$  Undecanal sowie 4,97  $\mu\text{L}$  1 M Natriumcyanoborhydrid zugegeben, der pH-Wert überprüft (pH 7-8) und inkubiert (1 h, 37 °C). Die magnetischen Partikel wurden fixiert, der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 10 % TFA angesäuert (pH 3-4). Die Anreicherung und anschließende Entsalzung der N-terminalen Peptide erfolgte analog zum TMT-HUNTER-Ansatz (Kap. 4.2.3).

## 4.2.5 LC-MS/MS Analyse

Die chromatographische Auftrennung und massenspektrometrische Analyse der Pre-HUNTER- und HUNTER-Proben der TMT-HUNTER- bzw. HUNTER-Ansätze (Kap. 4.2.3, 4.2.4) erfolgte an einem UltiMate™ 3000-RSLCnano-System (Acclaim™ PepMap™ 100 C18-HPLC-Säule, 3  $\mu\text{m}$ , 100 Å, 150 mm x 75  $\mu\text{m}$ ), welches *online* an ein Q Exactive™ Plus Orbitrap Massenspektrometer gekoppelt wurde.

Die Proben wurden in drei technischen Replikaten bei einem Injektionsvolumen von je 1  $\mu\text{L}$  analysiert. Die Fraktionierung der Proben erfolgte entsprechend der quantitativen Proteomanalysen (Kap. 3.2.6, Abb. 3.4), über einen 210 min Gradienten von Eluent A (0,05 % Ameisensäure in deionisiertem Wasser) und Eluent B (0,05 % Ameisensäure, 80 % ACN in deionisiertem Wasser) bei einer Flussrate von 300  $\text{nL}/\text{min}$ . Die massenspektrometrische Analyse erfolgte bei einer Kapillarentemperatur von 250 °C im *centroid* Profilmodus. Die MS1 Spektren wurden mit einer Auflösung von 70.000, einem *AGC target* von  $3 \cdot 10^6$  und einer maximalen Injektionszeit von 100 ms über einen Scanbereich von 375-1400  $m/z$  aufgenommen. Für die HCD-Fragmentierung bei einer normalisierten Kollisionsenergie von 33 %, wurden die 15 intensivsten Vorläuferionen eines MS1 *Full Scans* verwendet. Ionen mit einem Ladungszustand von  $z = +1$  und  $z > +7$  wurden nicht berücksichtigt.

Das AGC *target* für MS2 Spektren wurde auf  $1 \cdot 10^5$ , das Isolationsfenster auf  $1,2 \text{ m/z}$  und der Scanbereich auf  $200\text{-}2000 \text{ m/z}$  eingestellt. Das Wiederholungszeitfenster der *Dynamic Exclusion* betrug 40 s.

## 4.2.6 Datenverarbeitung

Die Software Proteome Discoverer (V2.5.0.400, Thermo Fisher Scientific) wurde für die Datenbanksuche der LC-MS/MS Rohdaten verwendet. Die Proteindatenbank des Mausproteoms von UniProt<sup>[78]</sup> (*Mus Musculus*, 55.493 Einträge, Juni 2021) wurde durch die Sequenzen der humanen APOE3 und APOE4 Isoformen (August 2021) sowie bekannten Kontaminanten (cRAP, *list of laboratory and contact dust contaminations*, <https://www.thegpm.org/crap/>, Mai 2021) ergänzt und die Datenbanksuche über den SequestHT Suchalgorithmus durchgeführt. Hierbei wurden Peptidlängen zwischen 6 bis 144 Aminosäuren, bei maximal zwei verpassten Spaltstellen des volltryptischen Verdauers erlaubt. Es wurde eine Fragmentionen-Massentoleranz von  $\pm 0,02 \text{ Da}$  und eine Vorläuferionen-Massentoleranz von 8 ppm gewählt. Für beide Ansätze wurde als variable Modifikation die Oxidation (M, +15,995 Da) und als statische Modifikation die Carbamidomethylierung (C, +57,021 Da) gesetzt. Entsprechend der verwendeten Labelreagenzien wurden für die TMT-HUNTER-Ansätze zusätzlich die statische Modifikation TMT6plex (N-Terminus und K, +229,163 Da) beziehungsweise für den HUNTER-Ansatz die Modifikation Dimethylierung (N-Terminus und K, +28,031 Da) als weitere Parameter gewählt. Für die Berechnung der Labeleffizienzen wurden zusätzliche Datenbanksuchen mit den Modifikationen TMT6-plex bzw. Dimethylierung (N-Terminus und K) als variable Modifikationen durchgeführt.

## 4.3 Ergebnisse und Diskussion

Für die Identifizierung von *in vivo* generierten N-terminalen Peptiden innerhalb der Leberproteome der APOE produzierenden Mäuse wurden zwei verschiedene Markierungen auf Proteinebene verwendet (TMT bzw. Dimethylierung). Zur Analyse der Auswirkungen der APOE-Isoformen wurden, durch die sich entwickelte Steatosis der *ad libitum* ernährten Mäuse<sup>[24]</sup> (Kap. 3.3.2), insbesondere die Leberproteome der ernährungseingeschränkten Mäuse betrachtet.

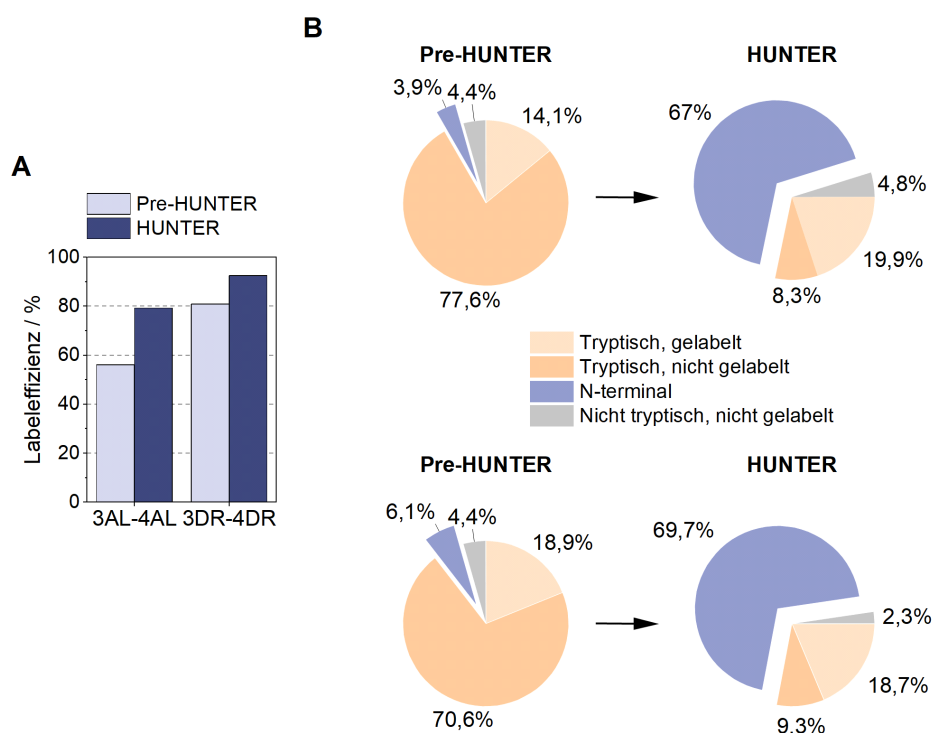
### 4.3.1 TMT-HUNTER Ansätze

#### 4.3.1.1 Qualitätsanalyse TMT-Labeling und Anreicherung

Für die Qualitätsanalyse der Protein-Derivatisierung durch TMT-6plex-Reagenzien wurden die Peptidlisten auf *peptide spectrum match* (PSM)-Ebene der PD-Datenbanksuche verwendet. Die Ermittlung der Labeleffizienz entsprach der Berechnung des prozentualen Anteiles der tatsächlich modifizierten Lysin-Reste verglichen mit der Gesamtzahl an Lysin-Resten in einer Peptidsequenz. Entsprechend wurden für die Berechnung alle Peptide ausgeschlossen, welche keine Lysin-Reste in der Sequenz aufwiesen. Die Effizienzen der Derivatisierung der AL- sowie DR-ernährten Mäuse, vor und nach der negativen Anreicherung der N-terminalen Peptide (Pre-HUNTER und HUNTER), sind in Abbildung 4.4 A) graphisch dargestellt. In beiden Experimenten konnte erwartungsgemäß eine erhöhte Anzahl der derivatisierten Lysin-Reste durch Abreicherung der tryptischen Peptide erzielt werden. Die Steigerung innerhalb des 3AL-4AL Experimentes betrug hierbei ca. 23 % und jene des DR-Experimentes rund 12 %. Innerhalb der DR-Mäuse wurde hierbei mit 93 % eine deutlich höhere Labeleffizienz als für die AL-Brutgeschwister beobachtet (Abb. 4.4 A). Vergleichend mit den beobachteten Effizienzen auf Peptid-Ebene (vgl. Kap. 3.3.1, > 99 %) sind diese deutlich geringer. Generell stellt das Labeling von Proteinen im Vergleich zu Peptiden eine größere Herausforderung, z.B. durch Präzipitation der Proteine in Folge der für das Labeling notwendigen Bedingungen, dar. Entsprechend sind geringere Labeleffizienzen in diesen Strategien zu erwarten, welche durch gezielte Optimierung der Labeling-Bedingungen (bspw. pH-Wert, Konzentration des zum Quenchen verwendeten Puffers) gesteigert werden können.<sup>[173,174]</sup>

Zur Prüfung der Effizienz der Anreicherung wurden zusätzlich die Anteile an

N-terminal tryptischen Peptiden (gelabelt und nicht gelabelt) und nativen bzw. neo-N Termini („N-terminal“) der Pre-HUNTER- und HUNTER-Proben ermittelt (Abb. 4.4 B). Eine deutliche prozentuale Steigerung der N-terminalen Peptide zwischen Pre-HUNTER und HUNTER konnte sowohl in den Analysen der AL- (Abb. 4.4 oben) als auch der DR-Mäuse (Abb 4.4 unten) beobachtet werden. Mit Hilfe der Anreicherung war in beiden Experimenten hierdurch die Identifizierung von  $\sim 60\%$  zusätzlichen N-terminalen Peptiden vergleichend zur Pre-HUNTER Analyse möglich. Während eine geringere Anzahl an nicht tryptischen und nicht gelabelten Peptiden (Abb. 4.4 B, grau) in der Analyse der DR-Mäuse zwischen Pre-HUNTER und HUNTER identifiziert wurden, ist diese innerhalb der AL-Mäuse leicht gestiegen.



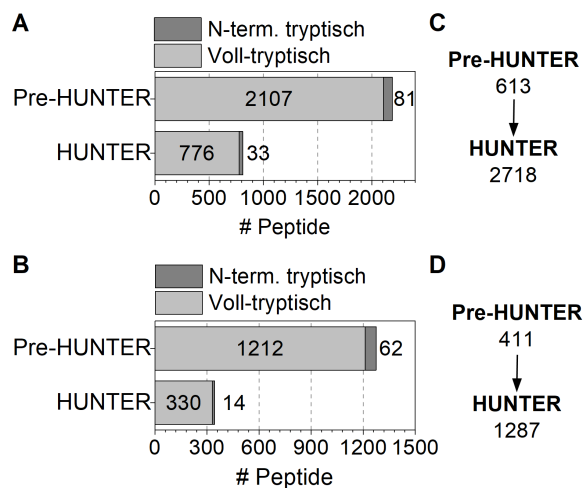
**Abbildung 4.4.:** Qualitätsanalyse der TMT-HUNTER-Ansätze. **A)** Ermittelte Labeleffizienzen der Analyse des Lebergewebes der AL- und DR-Mäuse. **B)** Prozentuale Anteile an N-terminalen und durch enzymatischen Verdau generierten Peptide (mit TMT gelabelt und nicht-gelabelt) vor (Pre-HUNTER) und nach (HUNTER) Anreicherung. Oben: 3AL-4AL; Unten: 3DR-4DR.

Der prozentuale Anteil der tryptischen, nicht gelabelten Peptide (Abb. 4.4 B, orange) konnte in den HUNTER-Proben vergleichend zu den Pre-HUNTER Analysen deutlich reduziert werden. Jedoch weisen alle Proben mit 14,1-19,9 % hohe Anteile an TMT-gelabelten tryptischen Peptiden auf (Abb. 4.4 B, hellorange). Dies könnte bedeuten, dass zum Zeitpunkt des enzymatischen Verdaus Labelreagenzien in der Probenlösung verblieben sind. In diesem Schritt der Probenvorbereitung sind die Proteine an die magnetischen Partikel, entsprechend SP3-Protokoll, gebunden.

Nach durchgeführtem Labeling und quenchen der überschüssigen Labelreagenzien erfolgte eine mehrstufige Aufreinigung, wobei mehrfach die gesamten flüssigen Bestandteile entfernt wurden. Die Wahrscheinlichkeit, dass ausreichend und nicht gequenhtes Labelreaganz in der Probe verbleibt um die hier beobachteten großen Anteile tryptischer Peptide zu markieren ist gering, kann jedoch allein auf Grundlage des hier durchgeführten Experimentes nicht ausgeschlossen werden. Für eine eindeutige Aussage sind entsprechend weiterführende experimentelle Untersuchungen, beispielsweise unter Verwendung verschiedener Proteasen, nötig. Weisen die durch unterschiedliche Proteasen generierten Peptide ebenfalls eine Derivatisierung des N-Terminus durch TMT auf, würde dies auf unzureichend entferntes und gequenhtes Labelreaganz hindeuten.

Neben einer unvollständigen Entfernung der Labelreagenzien vor dem Verdau besteht die Möglichkeit, dass diese Peptide *in vivo* generiert wurden und somit vor der Aufarbeitung in der Probe vorlagen. Die Überprüfung der vollständigen Spaltspezifität der generierten gelabelten N-terminalen tryptischen Peptide ergab, dass mit Ausnahme weniger Peptide, in beiden Experimenten die Spaltmuster N- und C-terminal spezifisch für Trypsin sind (Voll-tryptisch, Abb. 4.5 A, B).

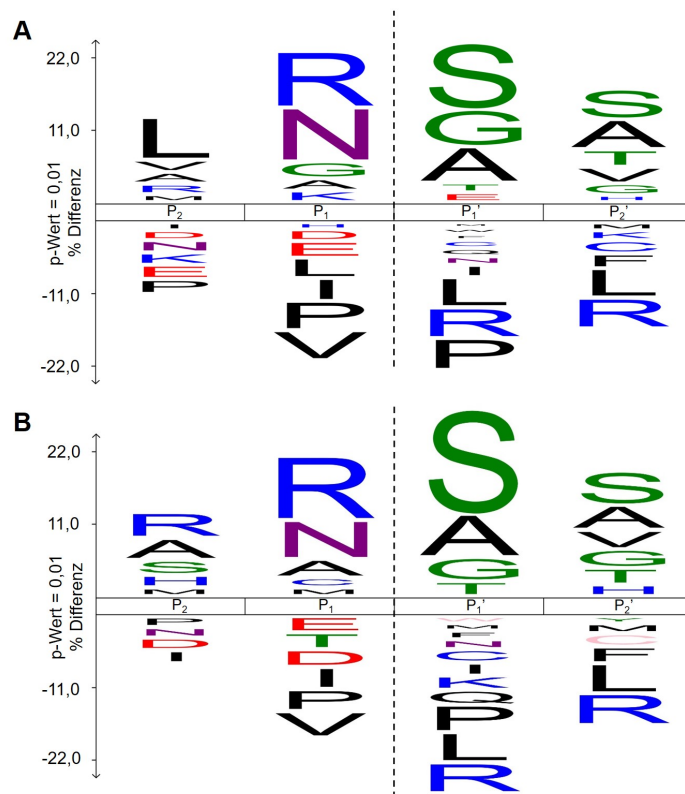
Interessanterweise wurden die gelabelten, tryptischen Peptide trotz TMT-Label am N-Terminus in beiden Experimenten in den HUNTER-Proben in geringerer Anzahl vergleichend zu den Pre-HUNTER-Proben identifiziert (Abb. 4.5 A, B). In den HUNTER-Proben wurden hierbei nur noch 27 beziehungsweise 37 % der zuvor in den Pre-HUNTER Analysen beobachteten Peptide identifiziert.



**Abbildung 4.5.:** Betrachtung der gelabelten tryptischen, sowie N-terminalen Peptide der TMT-HUNTER Ansätze. Aufschlüsselung der gelabelten tryptischen Peptide in vollständig tryptische (N- und C-terminal tryptisch) und rein N-terminal tryptische Peptide des **A**) 3AL-4AL und **B**) 3DR-4DR Experimentes. Angabe der durch Anreicherung erhöhten Anzahl der *in vivo* generierten N-terminal gelabelten, identifizierten Peptide des **C**) 3AL-4AL und **D**) 3DR-4DR Experimentes.

Die Zahl der identifizierten TMT-gelabelten nativen bzw. neo-N-terminalen Peptide konnte hingegen sowohl in der Analyse der AL- als auch der DR-Mäuse deutlich gesteigert werden (Abb. 4.5 C, D). Innerhalb der Lebern der *ad libitum* ernährten Mäuse wurden mit insgesamt 2718 N-terminalen Peptiden mehr N-Termini identifiziert als in ihren DR-Brutgeschwistern.

Abschließend wurde überprüft welche Spaltmuster über alle angereicherten, TMT-gelabelten Peptide vorlagen (Abb. 4.6, A: 3AL-4AL, B: 3DR-4DR). Hierfür wurden die exportierten Peptidlisten der PD-Datenbanksuchen (Parameter: statische Modifikation: TMT-6plex (N-Term und K)) nach internen Peptiden gefiltert, die vorangegangene Aminosäuresequenz des Proteins zugeordnet und über die Software iceLogo<sup>[175]</sup> unter Verwendung der Swiss-Prot Datenbank von *Mus musculus* die iceLogos der experimentellen Ansätze generiert (Abb. 4.6).



**Abbildung 4.6.:** IceLogo der Spaltstelle zwischen  $P_1$  und  $P_1'$  der identifizierten N-terminal gelabelten Peptide der TMT-HUNTER Ansätze 3AL-4AL und 3DR-4DR, unter Verwendung des Swiss-Prot Proteoms von *Mus musculus*. Dargestellt sind die Aminosäuren der N-Termini der identifizierten Peptide ( $P_1'$  und  $P_2'$ ) sowie die Aminosäuren des vor der Spaltstelle befindlichen C-Terminus ( $P_1$  und  $P_2$ ). Generierte iceLogos basierend auf **A)** 2420 (3AL-4AL) und **B)** 1455 (3DR-4DR) Peptiden ( $p = 0,01$ ).

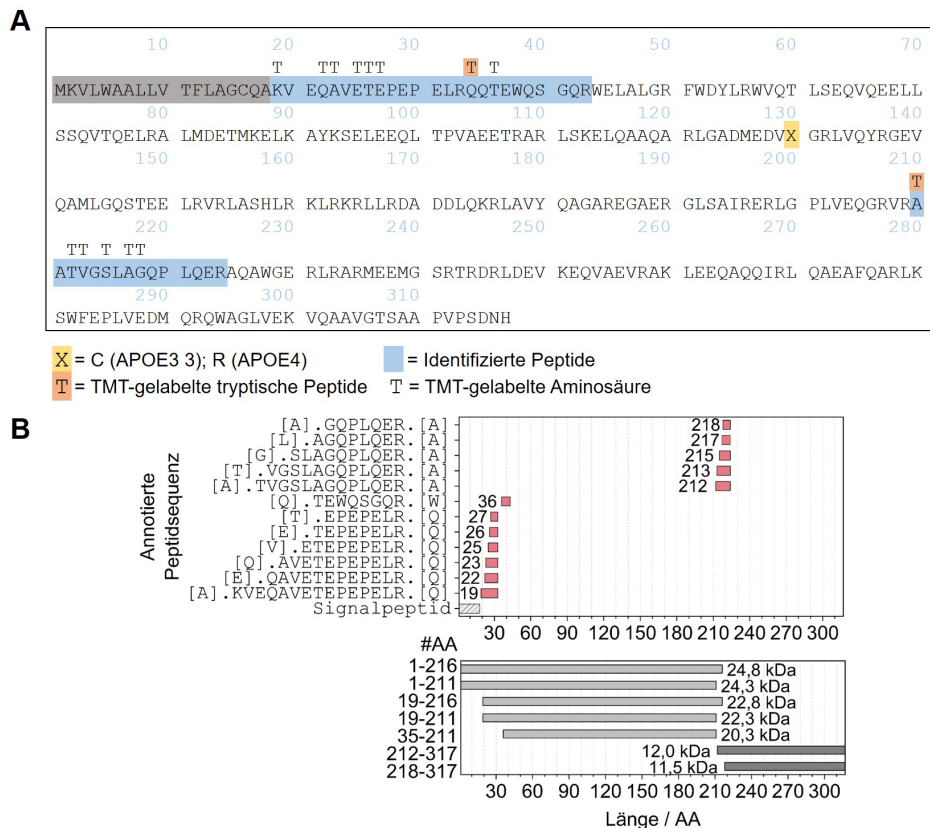
Sowohl in den Analysen der AL- als auch DR-Mäuse wurden mit höchster Häufigkeit die Aminosäuren Serin (S), Alanin (A) und Glycin (G) am N-Terminus der

internen Peptide beobachtet ( $P_1$  ' Position, Abb. 4.6). Der C-Terminus der Spaltstelle ergab, neben der erwarteten Aminosäure Arginin (R), eine Häufung von Asparagin (N) an  $P_1$  Position.

#### 4.3.1.2 Analyse N-Termini *ad libitum* Mäuse

Verkürzte Proteoformen von Apolipoprotein E wurden unter anderem bereits im Gehirngewebe von Alzheimer Patienten sowie in transgenen APOE Mäusen identifiziert. Die in diesen Studien identifizierten C-terminal verkürzten Proteoformen weisen infolge von Akkumulation innerhalb des Gehirngewebes neurodegenerative Effekte auf.<sup>[176–178]</sup> Zusätzlich wurde eine weitere, durch Thrombin generierte ca. 22 kDa Proteoform ebenso in kultivierten Hepatozyten nachgewiesen.<sup>[179]</sup> Für die Identifizierung möglicher verkürzter Proteoformen von APOE im Lebergewebe der *ad libitum* ernährten Mäuse wurde ein TMT-HUNTER Ansatz durchgeführt. In der TMT-HUNTER Analyse wurden insgesamt 3113 gelabelte N-terminale Peptide mit einer durchschnittlichen Sequenzlänge von  $\sim 14$  Aminosäuren identifiziert. Innerhalb dieser Peptide wurden über die PD-Datenbanksuchen 13 Peptide APOE zugeordnet (Tab. A.10, Abb. 4.7). Zwei dieser N-terminalen Peptide wiesen für die Protease Trypsin spezifische Spaltmuster auf und wurden aufgrund des unklaren Ursprunges von der weiteren Analyse ausgeschlossen (Abb. 4.7 A, orange).

Die Differenzierung der APOE-Isoformen mit den identifizierten Peptiden war durch die fehlende Sequenzabdeckung der Position 130 nicht möglich (Abb. 4.7 A, gelbes X). Hingegen wurden N-terminale Peptide konzentriert an zwei Bereichen innerhalb der Sequenz von APOE beobachtet. Folgend zum Signalpeptid (Reste 1-18; nach UniProt<sup>[78]</sup>) konnte eine leiterähnliche Degradierung des N-Terminus zwischen den Resten 20-36 beobachtet werden, während der zweite Bereich die Reste zwischen 212-218 abdeckt (Abb. 4.7 A). Aus diesen identifizierten N-Termini können mögliche verkürzte Proteoformen abgeleitet werden (Abb. 4.7 B). Hierfür wurden die bekannten N-Termini mit möglichen jedoch nicht identifizierten C-Termini, welche entweder in der Proteinsequenz vor den identifizierten N-Termini lagen oder dem Protein C-Terminus entsprachen, verknüpft. Hierbei konnten zwei potentielle ca. 22 kDa Proteoformen, welche die Sequenz zwischen den Aminosäureresten Lys19-Leu216 bzw. Lys19-Ala211 überspannen, identifiziert werden. Entgegen der von FARKAS *et al.*<sup>[179]</sup> beobachteten Proteoform nach Thrombin Behandlung, weist diese mögliche Proteoform keine Thrombin-spezifischen Spaltmuster (Spaltung nach Arginin (R), weniger häufig nach Lysin (K))<sup>[180]</sup> auf. Für die verkürzte Proteoform Lys19-Leu216 existiert unter Einbezug des Signalpeptides eine UniProt-Accession<sup>[78]</sup> (E9PEV4), wobei unter anderem die über verschiedene



**Abbildung 4.7.:** Identifizierte N-terminale Peptide von Apolipoprotein E innerhalb der Analyse des Lebergewebes der AL-Mäuse (3AL-4AL). **A)** Proteinsequenz von APOE unter Angabe der identifizierten Peptide (blau), der TMT-gelabelten N-Termini (T) und der tryptischen Peptide (orange). Farbliche Hervorhebung des Signalpeptides nach UniProt<sup>[78]</sup> (grau). **B)** Auftragung der identifizierten, nicht-tryptischen Peptide entsprechend ihrer Sequenzlänge (oben) und die möglichen korrespondierenden verkürzten APOE Proteoformen (unten).

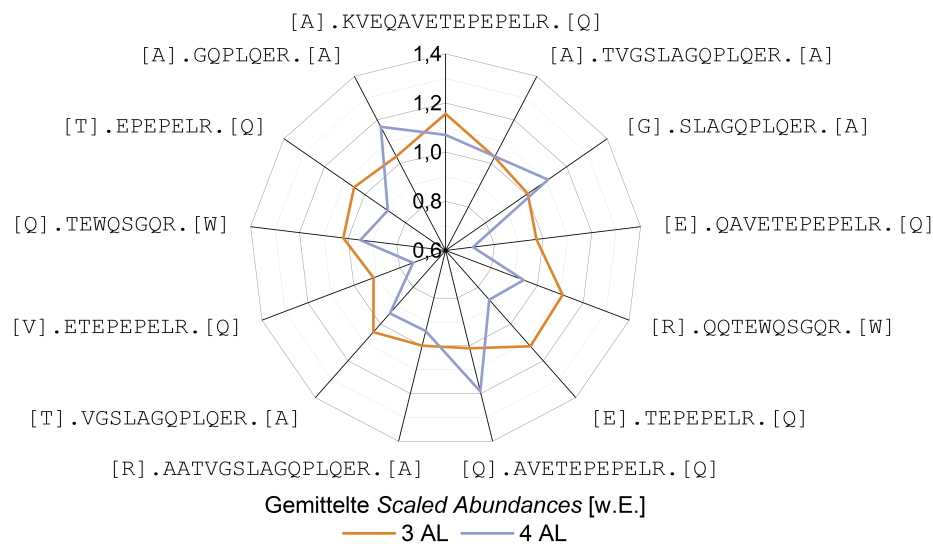
Projekte identifizierten Peptide dieser Proteoform auf ProteomicsDB<sup>[181]</sup> eingesehen werden können. Die kürzeste mögliche interne Proteoform in diesem Experiment mit 20,3 kDa spannt sich zwischen den Aminosäureresten Gln35-Ala211. Die bislang genannten Proteoformen besitzen die Gemeinsamkeit, dass die LDL-Rezeptor-Bindungsregion (Reste 154-168) intakt bleibt, die im Protein C-Terminus befindliche lipidbindende Region (Reste 262-290) hingegen fehlt. Die Bindung von Lipiden über diese C-terminale Region ist entscheidend für die Bindungsaffinität von APOE zu LDL-Rezeptoren.<sup>[10]</sup> Lipid-freies APOE weist hierbei eine reduzierte Affinität gegenüber LDLR auf, was erheblichen Einfluss auf den peripheren Transport und dadurch Lipoproteinstoffwechsel hat. Folgend kann das vollständige Fehlen der lipidbindenden Region innerhalb der Proteoformen Auswirkungen auf den Lipidstoffwechsel haben. KYPREOS *et al.*<sup>[182]</sup> konnten beispielsweise zeigen, dass die in APOE<sup>-/-</sup> Mäusen durch Adenoviren Infektion induzierte Produktion



der verkürzten APOE4-220 (ohne Signalpeptid APOE4-202) Proteoform die Entwicklung einer Hypertriglyceridämie verhindert wird.

Die Identifizierung der N-Termini im Bereich der Aminosäurereste 212-218 bedingt potentielle N-terminal verkürzte APOE-Proteoformen, welche Massen zwischen 11,5-12 kDa aufweisen und entsprechend die C-terminale Lipid-Bindungsdomäne, jedoch nicht die LDLR-Bindungsregion, von APOE beinhalten. Der Studie von KYPREOS *et al.*<sup>[182]</sup> zufolge tragen diese Proteoformen zur APOE-induzierten Hypertriglyceridämie bei.

Durch Mittlung der von PD skalierten Intensitäten (*scaled abundances*, [w.E.]) der identifizierten und APOE zugeordneten Peptide innerhalb eines biologischen Zustandes, wurde überprüft in wie weit sich die Abundanzen der hepatogenen Peptide zwischen APOE3 und APOE4 produzierenden Mäusen unterscheiden (Abb. 4.8). Interessanterweise wurden nur geringe Unterschiede zwischen den Abundanzen der beiden biologischen Zustände beobachtet. Während das Peptid [E].QAVETEPEPELR.[Q] eine minimal höheren Abundanz innerhalb der APOE3-Mäuse aufwies, wurde das stärker degradierte [Q].AVETEPEPELR.[Q] mit einer höheren Abundanz innerhalb der APOE4 Brutgeschwister identifiziert. Die Unterschiede der Abundanzen waren jedoch für kein Peptid statistisch signifikant (Student's t-Test, FDR = 0,05), wodurch die proteolytische Prozessierung von APOE innerhalb des Lebergewebes Isoform-unabhängig zu sein scheint.



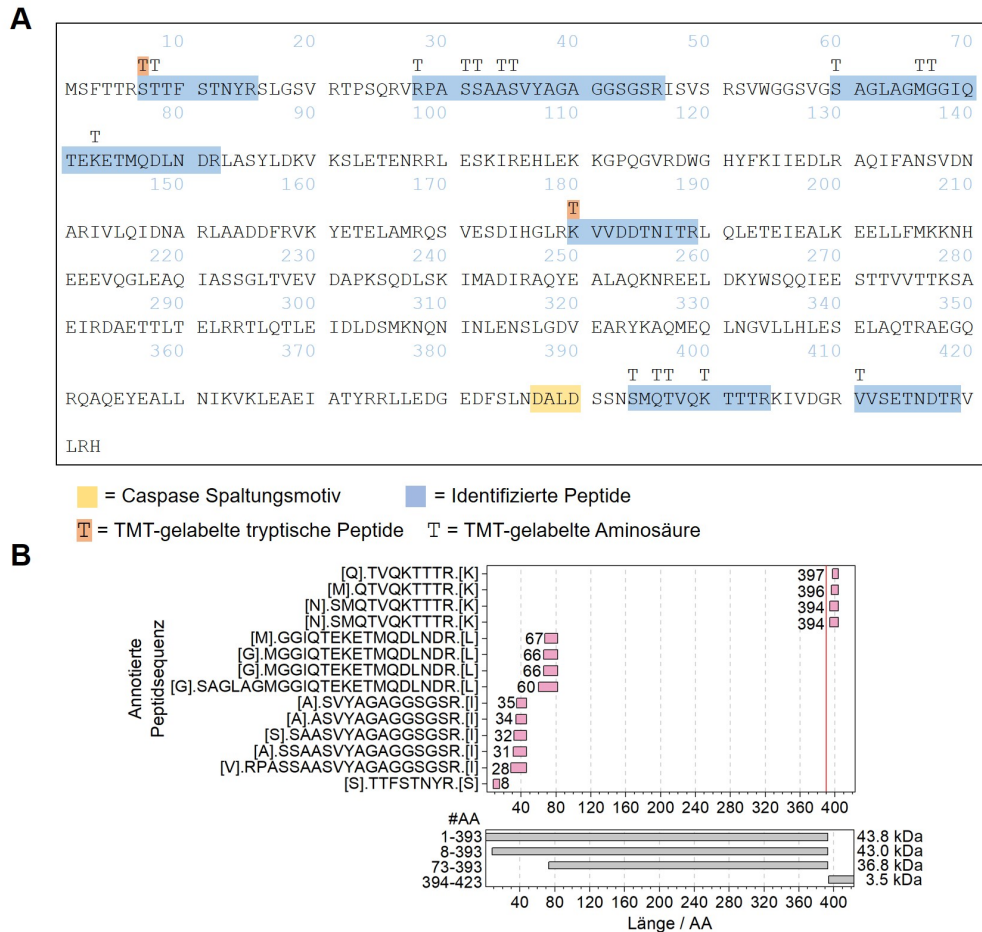
**Abbildung 4.8.:** Gemittelte PD-skalierte Intensitäten (*scaled abundances*, [w.E.]) der identifizierten APOE-Peptide von 3AL und 4AL Mäusen.

Analog konnten über alle im Experiment 3AL-4AL identifizierten Peptide bzw. der zugehörigen  $\log_2$ -transformierten Abundanz-Werte, keine differenziell abundanten Peptide zwischen beiden biologischen Zuständen identifiziert werden (Abb. A.5).

Die quantitativen Leber-Analysen der *ad libitum* ernährten Mäuse (Kap. 3) sowie die weiterführenden Analysen durch HÜBBE *et al.*<sup>[24]</sup> deuten auf die Entwicklung einer nicht-alkoholischen Fettlebererkrankung/Steatohepatitis (NAFLD/NASH) hin. Ein Charakteristikum von NASH ist die Apoptose von Leberzellen, wobei diese ebenso in Zusammenhang mit dem Fortschreiten der Erkrankung steht.<sup>[99]</sup> Infolge der Apoptose werden Caspasen, insbesondere Caspase-3 und Caspase-7, aktiviert. Diese intrazellulären Proteasen spalten unter anderem Proteine des Intermediärfilaments (IF).<sup>[183]</sup> Als das häufigste Typ I Cytokeratin des IF stellt Keratin 18 (KRT18) entsprechend einen potenziellen pathologischen Marker für eine nicht-invasive Abklärung einer NASH-Erkrankung dar.<sup>[99,183,184]</sup> Eine mögliche proteolytische Prozessierung durch Caspase-3 bzw. 7, welche KRT18 C-terminal des <sup>387</sup>DALD<sup>390</sup> Motives spalten, wurde im Folgenden untersucht (Abb. 4.9 A, gelb).

Innerhalb der sechzehn identifizierten und KRT18 (P05784) zugeordneten Peptide wiesen zwei ein tryptisches Spaltmuster auf und wurden aufgrund des unklaren Ursprungs, analog zur Analyse von APOE, ausgeschlossen (Tab. A.11; Abb. 4.9 A, orange). In Abbildung 4.9 A) ist zu erkennen, dass die Identifizierung des direkt der Caspase-Spaltstelle folgenden N-Terminus (Ser391) nicht möglich war. Der erste N-Termini nach der Spaltungsstelle war Ser394, mit einer scheinbaren N-terminalen Degradierung über Gln396 und Thr397. In Kombination mit den Ergebnissen der quantitativen Proteomanalyse des Lebergewebes der AL-Mäuse (Kap. 3.3.2, Abb. A.6), in welcher das Peptid identifiziert wurde, dass die Caspase-Spaltstelle überbrückt (Leu376 - Lys400), deuten die Analysen nicht auf eine Caspase-spezifische Spaltung von Keratin 18 hin.

Unabhängig von der Untersuchung der Caspase-Spaltstelle wurden insbesondere N-Termini zu Beginn der Proteinsequenz von KRT18 identifiziert (Abb. 4.9 B, oben). Dabei wurde eine leiterähnliche Prozessierung der N-Termini zwischen den Resten Arg28 bis Ser35 beobachtet. Die aus den identifizierten Peptiden möglichen resultierenden verkürzten Proteoformen weisen eine Masse zwischen 36,8-43,8 kDa bzw. für die Peptide folgend zu Ser394 3,5 kDa auf (Abb. 4.9 B, unten).



**Abbildung 4.9.:** Identifizierte N-terminale Peptide von Keratin 18 (KRT18, P05784) innerhalb der TMT-HUNTER Analyse des Lebergewebes der AL-Mäuse (3AL-4AL). **A)** Proteinsequenz von KRT18 unter Angabe der identifizierten Peptide (blau), des Caspase Spaltmotivs (gelb) und der tryptischen Peptide (orange). **B)** Auftragung der identifizierten, nicht-tryptischen Peptide entsprechend ihrer Sequenzlänge (oben) und die möglichen korrespondierenden verkürzten KRT18 Proteoformen (unten).

#### 4.3.1.3 Analyse N-Termini *dietary restricted* Mäuse

Für die Untersuchung der ernährungsspezifischen Abhängigkeit der proteolytischen Prozessierung von Apolipoprotein E wurden zusätzlich Lebergewebe der *dietary restricted* (DR)-Brutgeschwister untersucht. Insgesamt wurden in diesem Experiment (3DR-4DR) 1609 N-terminale Peptide identifiziert, dies ist  $\sim 52\%$  weniger vergleichend zu der Analyse der AL-Mäuse (Tab. 4.2).

Verglichen mit der Anzahl identifizierter und APOE zugeordneter Peptide des Lebergewebes der AL-Mäuse wurden in der Analyse der DR-Brutgeschwister mit insgesamt sechs Peptiden eine geringere Anzahl identifiziert (Tab. A.12). Analog zu

**Tabelle 4.2.:** Vergleich der identifizierten Proteine und Peptide der TMT-HUNTER Ansätze 3AL-4AL und 3DR-4DR.

Ansatz	Proteine	Ø #Peptide <sub>je Protein</sub>	#Peptide <sub>ges</sub>	Ø Sequenzlänge / AA
3AL-4AL	1213	2,4	3113	13,7
3DR-4DR	847	1,9	1609	15,1

den Beobachtungen in den AL-Mäusen konnte eine leiterähnliche Degradierung des Protein N-Terminus folgend zum Signalpeptid von Lys20 bis zu Glu25 beobachtet werden (Abb. 4.10).

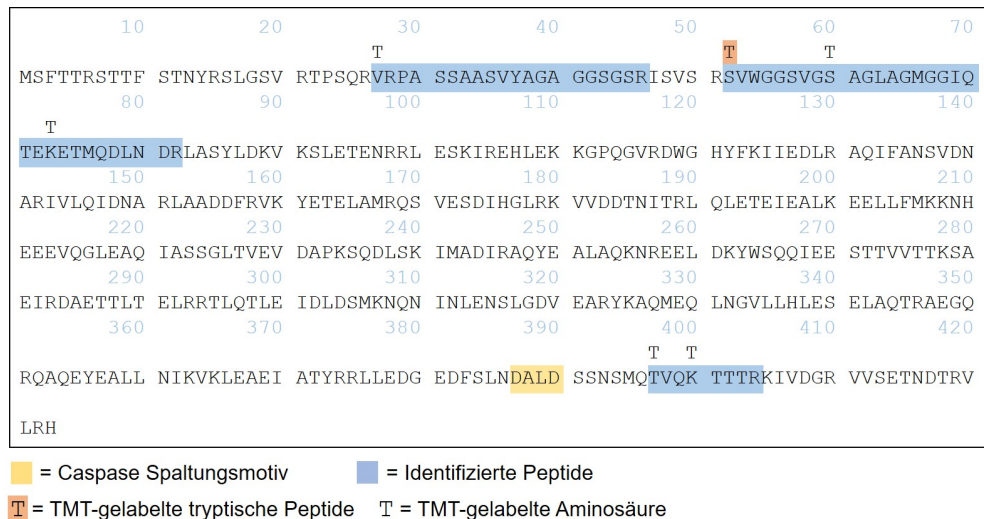
10	20	30	40	50	60	70
TT	TTT					
MKVLWAALLV	TFLAGCQAKV	EQAVETEPEP	ELRQQTEWQS	QQRWELALGR	FWDYLRWVQT	LSEQVQEELL
80	90	100	110	120	130	140
SSQVTQELRA	LMDETMKELK	AYKSELEEQL	TPVAEETRAR	LSKELQAAQA	RLGADMEDVX	GRLVQYRGEV
150	160	170	180	190	200	210
QAMLGQSTEE	LRVRLASHLR	KLRKRLLRDA	DDLQKRLAVY	QAGAREGAER	GLSAIRERLG	PLVEQGRVRA
220	230	240	250	260	270	280
ATVGSLAGQP	LQERAQAWGE	RLRARMEEMG	SRTRDRLDEV	KEQVAEVRAR	LEEQAQQIRL	QAEAFQARLK
290	300	310				
SWFEPLVEDM	QRQWAGLVEK	VQAAVGTSA	PVPSDNH			

X = C (APOE3); R (APOE4)  
T = TMT-gelabelte Aminosäure

**Abbildung 4.10.:** Identifizierte N-terminale Peptide von APOE innerhalb der TMT-HUNTER Analyse des Lebergewebes der DR-Mäuse (3DR-4DR). Hervorhebung des Signalpeptides nach UniProt<sup>[78]</sup> (grau) sowie der Position 130 (X, gelb) durch welche sich die APOE-Isoformen unterscheiden.

Interessanterweise wurden konträr zu den AL-Mäusen in den Lebern der DR-Brutgeschwister keine internen, N-terminalen Peptide, beispielsweise an den Positionen 212-218, identifiziert. Dies könnte darauf hindeuten, dass das Vorliegen von verkürzten Proteoformen abhängig von der Ernährungsform der Mäuse beziehungsweise auch eine Folge der sich daraus entwickelten NASH Erkrankung sein kann. Der aktuelle Studienstand zu APOE Proteoformen in Geweben außerhalb des Gehirnes bzw. neuronalen Zellen ist jedoch gering.<sup>[185]</sup> Bislang ist der Zusammenhang zwischen der Ernährungsform und der proteolytischen Prozessierung von APOE innerhalb des Lebergewebes noch nicht untersucht wurden.

Folgend zur Analyse der AL-Mäuse wurde innerhalb des TMT-HUNTER Ansatzes 3DR-4DR Keratin 18 nach möglicher Spaltung durch die Protease Caspase untersucht (Abb. 4.11). Analog zur Untersuchung der AL-Mäuse wurde auch in den Lebern der DR-Mäuse der N-Termini direkt folgend zur Caspase-Spaltstelle (Ser391) nicht identifiziert (Tab. A.13). Dies steht im Einklang mit den quantitativen Proteomanalysen, bei welchen keine Fettleber-Entwicklung in den ernährungs-



**Abbildung 4.11.:** Identifizierte N-terminale Peptide von Keratin 18 (KRT18, P05784) innerhalb der TMT-HUNTER Analyse des Lebergewebes der DR-Mäuse (3DR-4DR). Farbliche Hervorhebung aller identifizierter N-terminaler Peptide (blau1) und der Caspase-3 bzw. 7 Spaltstelle (gelb).

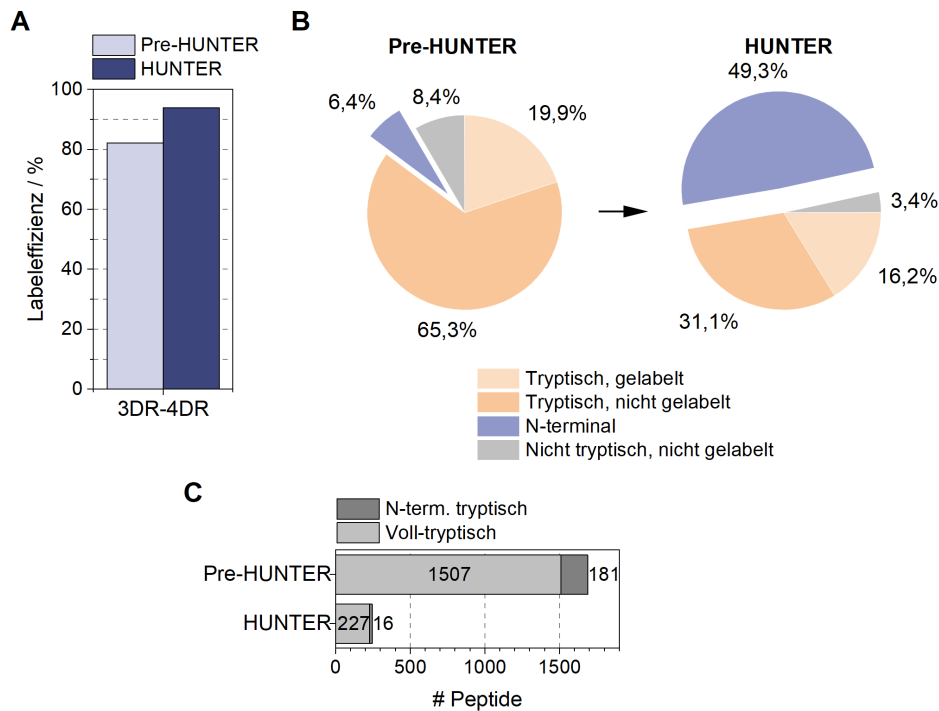
eingeschränkten Mäuse beobachtet werden konnte und entsprechend auch keine durch Apoptose-induzierte Caspase-Spaltung zu erwarten war.

Zwischen beiden Experimenten überschnitten sich die Identifizierungen der N-Termini der Peptide Ser60-Arg82 und Thr397-Arg404. Konträr wurde das N-terminale Peptid Val27-Arg46 lediglich innerhalb der DR-Mäuse identifiziert.

### 4.3.2 HUNTER Analyse von Lebern der DR-Mäuse

Folgend zu den TMT-HUNTER Ansätzen wurde die Analyse der Lebern der ernährungseingeschränkten Mäusen nach dem *High-efficiency Undecanal-based N Termini Enrichment* (HUNTER) Ansatz von WENG *et al.*<sup>[169]</sup> durchgeführt. Analog zu den vorherigen Analysen wurden die Labeleffizienzen der Pre-HUNTER sowie der HUNTER Probe ermittelt (Abb. 4.12 A). Die erzielten Effizienzen der Derivatisierung sind mit 82 % für den Pre-HUNTER bzw. 94 % für die HUNTER Probe vergleichbar mit jenen der TMT-HUNTER Analyse der DR-Mäuse (Kap. 4.3.1.1). Entsprechend scheinen sowohl das Protein Labeling mittels TMT-Reagenz, als auch die Dimethylierung mit Formaldehyd und Natriumcyanoborhydrid annähernd gleich effizient zu sein.

Zur Überprüfung der Anreicherungs-effizienz wurden die prozentualen Anteile der identifizierten N-terminalen Peptide innerhalb der Pre-HUNTER und HUNTER



**Abbildung 4.12.:** Qualitätsanalyse des HUNTER-Ansatzes der Lebern von DR-Mäusen. **A)** Berechnete Labeleffizienz und **B)** prozentuale Anteile an N-terminalen und durch enzymatischen Verdau generierten Peptiden (mit Dimethyl gelabelt und nicht-gelabelt) vor (Pre-HUNTER) und nach (HUNTER) Anreicherung. **C)** Aufschlüsselung der identifizierten tryptischen Peptide in vollständig tryptische (N- und C-terminal tryptisch) und rein N-terminal tryptische Peptide.

Probe untersucht (Abb. 4.12 B). Folgend zu den vorherigen Experimenten wurde auch in der HUNTER Analyse der DR-Mäuse eine hohe Anzahl an Peptiden mit tryptischer Spaltspezifität identifiziert. Der größte Anteil mit 89-93 % weist hierbei N- sowie C-terminale tryptische Spaltmuster auf („Voll-tryptisch“; Abb. 4.12 C). Die prozentualen Anteile der Pre-HUNTER und HUNTER Analysen weisen auf eine Anreicherung der nativen und neo-N-Termini, bei gleichzeitiger Abreicherung der tryptischen gelabelten und nicht gelabelten Peptide hin.

Bei Betrachtung der zugrunde liegenden Zahlen der Pre-HUNTER und HUNTER-Proben wird deutlich, dass die Gesamtzahl der identifizierten tryptischen Peptide erheblich reduziert wurde, die Zahl der N-terminalen Peptide allerdings nicht analog dazu anstieg (Tab. 4.3). Während die Anreicherung lediglich zur Identifizierung von rund 200 zusätzlichen Peptiden vergleichend zum Pre-HUNTER führte, wurden rund 1400 gelabelte, tryptische und 5000 nicht gelabelte tryptische Peptide abgereichert.

In den erhaltenen Ergebnissen der PD-Datenbanksuche (Parameter: statische Modifikation: Dimethyl (N-Term und K)) des HUNTER Ansatzes der DR-Mäuse

**Tabelle 4.3.:** Anzahl der identifizierten gelabelten N-terminalen und aller tryptischer Peptide der semi-tryptischen PD-Datenbanksuche.

	Pre-HUNTER	HUNTER
N-terminal	546	739
Tryptisch, gelabelt	1688	243
Tryptisch, nicht gelabelt	5547	466

wurden insgesamt 944 Peptide mit einer durchschnittlichen Sequenzlänge von 14,7 Aminosäuren identifiziert. Hierunter wurden jeweils vier N-terminale Peptide sowohl Apolipoprotein E als auch Keratin 18 zugeordnet (Abb. A.7). Analog zur TMT-HUNTER Analyse von APOE wurden nur gelabelte, N-terminale Peptide folgend zum Signalpeptid, zwischen den Resten Lys19-Ala23, identifiziert. Damit deuten beide Analysen der Lebern von DR-Mäusen auf eine reine N-terminale Degradierung von APOE hin und entgegen der AL-Brutgeschwister nicht auf das Vorhandensein von verkürzten internen APOE-Proteoformen. Konsistent zu den vorherigen Untersuchungen, wurde auch innerhalb des HUNTER Ansatzes kein direkt auf die Caspase-Spaltstelle <sup>387</sup>DALD<sup>390</sup> folgendes Peptid identifiziert.

## 4.4 Ausblick

In den vorhergehend beschriebenen Studien wurde die TMT-HUNTER bzw. HUNTER-Methode für die Identifizierung von nativen und neo-N-Termini innerhalb des Lebergewebes von *ad libitum* und ernährungseingeschränkten Mäusen, welche *APOE3* bzw. *APOE4* exprimieren, verwendet. Hierzu wurden die N-terminalen  $\alpha$ -Amine sowie  $\varepsilon$ -Amine der Lysinreste mit TMT gelabelt bzw. dimethyliert, die Proben mit Trypsin verdaut und die entstandenen Peptide mittels Undecanal markiert. Für die Anreicherung der N-terminalen TMT gelabelten bzw. dimethylierten Peptide wurden die tryptischen, Undecanal-markierten Peptide durch Bindung an das C18-Material eines Filters abgereichert. Insbesondere die proteolytische Prozessierung von Apolipoprotein E und von Keratin 18, einem potentiellen pathologischen Marker für eine Fettlebererkrankung, standen im Fokus der Analysen. Weitere Untersuchungen bezüglich der hohen Anzahl an identifizierter tryptischer Peptiden (gelabelt und nicht gelabelt) in den HUNTER-Proben sind äußerst wichtig für das weitere Vorgehen. Die Herstellung und Verwendung frischer Leberlysate könnte hierbei erhebliche Aufschlüsse geben, in wie weit diese Peptide bereits vor der Aufarbeitung der Proben im Organismus existierten. Zusätzlich könnte durch den enzymatische Verdau unter Verwendung verschiedener Proteasen überprüft



werden, ob das Quenchen des Labelreagenzes mit Hydroxylamin und die nachfolgenden Reinigungsschritte ungenügend waren. Werden dennoch Peptide mit tryptischen Spaltmustern identifiziert, könnte dies auf eine Degradierung der Probe hindeuten. Interessant könnte die Identifizierung der N-Termini auf Proteinebene (*Top-Down* Proteomik) sein, wodurch zusätzliche Informationen der Proteoformen, beispielsweise auch der C-Termini, erhalten werden können.<sup>[186]</sup>

Aufgrund der geringen Studienlage in Bezug zu Proteoformen von Apolipoprotein E ausserhalb des Gehirngewebes und entsprechend unabhängig der Alzheimer-Erkrankung, könnte die weitere, tiefgehende Analyse der Leber-, aber auch Nierengewebe interessante Informationen zur Prozessierung des peripheren APOEs liefern. Insbesondere die Untersuchung des ernährungsabhängigen Auftretens der APOE Proteoformen, welche nach aktuellen Erkenntnissen Isoform-unabhängig sind, könnte Rückschlüsse auf die mechanistischen, zellulären Details der Entstehung der nicht-alkoholischen Fettlebererkrankung liefern. In diesem Zusammenhang können weiterführende Fragestellungen, beispielsweise zu gewebespezifischen Auswirkungen der APOE Proteoformen, untersucht werden. Hierfür könnten APOE<sup>-/-</sup> Mäuse entsprechend KYPREOS *et al.*<sup>[182]</sup> verwendet werden, welche durch Adenovirus-Infektion induziert spezifische verkürzte Proteoformen bzw. die kanonischen Isoformen produzieren. Hierdurch könnte zusätzlich differenziert werden, ob die in dieser Studie beobachteten Proteoformen eine Folge der Fettlebererkrankung oder der zucker- und fettreichen Ernährungsform der Mäuse waren. Interessant könnte ebenso die Analyse von gewebespezifisch auftretenden und Isoform-abhängigen APOE Proteoformen, beispielsweise zwischen Leber und Niere, sein.

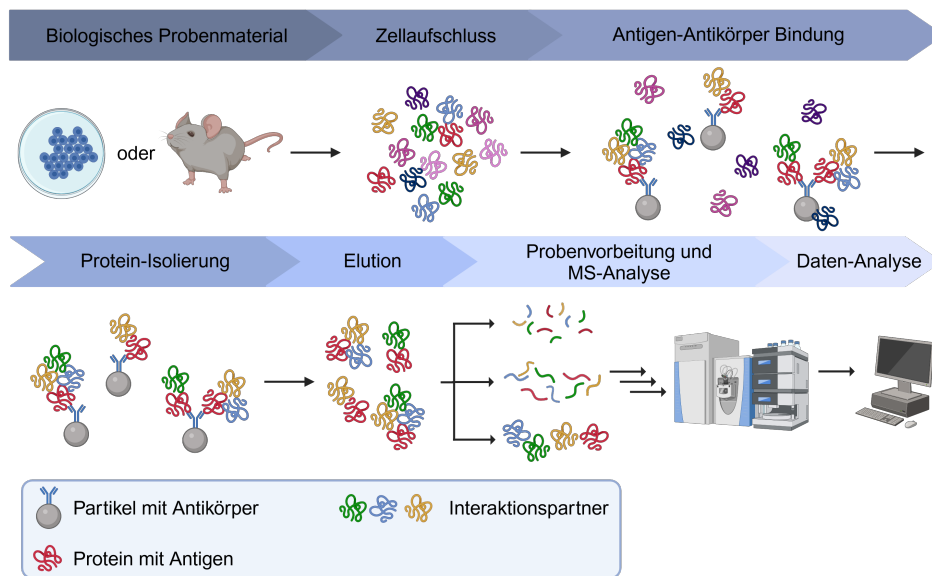


# Identifizierung von Protein-Protein-Interaktionen mit *Bottom-Up*- und *Middle-Down*-Analysen

## 5.1 Einleitung

Nach aktuellen Schätzungen agieren über 80 % der Proteine *in vivo* nicht alleine sondern innerhalb von Proteinkomplexen.<sup>[187,188]</sup> Diese Komplexe, in welchen zwei oder mehr Proteine durch sogenannte Protein-Protein-Interaktionen (PPI) interagieren, basieren auf Wasserstoffbrückenbindungen, elektrostatischen Interaktionen, hydrophoben Effekten und kovalenten Bindungen zwischen den Oberflächen der Proteine.<sup>[189]</sup> STUMPF *et al.*<sup>[190]</sup> schätzten auf Grundlage von mathematischen Simulationen, dass es rund 650.000 Protein-Protein-Interaktionen im menschlichen Organismus gibt. Entsprechend sind PPI an einer Vielzahl von zellulären Prozessen, beispielsweise Signalkaskaden, Regulationsprozessen und dem Zellzyklus, beteiligt.<sup>[188,191,192]</sup> Die Identifizierung dieser Interaktionen ist somit entscheidend für das Verständnis der molekularen Mechanismen in Zellen.<sup>[193]</sup> Über die identifizierten Interaktionspartner eines Proteins können zusätzlich Informationen zu potentiellen neuen Funktionen, Lokalisierung innerhalb der Zelle sowie involvierten biologischen Stoffwechselwegen des Proteins gewonnen werden.<sup>[194,195]</sup> Für die Identifizierung und Charakterisierung von PPI wurden verschiedene experimentelle Methoden entwickelt, welche auf unterschiedlichen physikalischen, chemischen und molekularbiologischen Prinzipien basieren. Beispielsweise das von FIELDS und SONG<sup>[196]</sup> entwickelte *Yeast-Two Hybrid*-System (Y2H). Dieses System nutzt die zwei funktionellen Domänen (Bindung an DNA und Transkriptionsaktivierung) von Transkriptionsfaktoren aus. Das Zielprotein ist mit der DNA-Bindungsdomäne fusioniert, das potentielle Interaktionsprotein mit der Domäne der Transkriptionsaktivierung. Bei Interaktion dieser Proteine werden beide Domänen zusammengebracht und bilden einen intakten Transkriptionsfaktor, welcher die Transkription eines Reportergens induziert.<sup>[188,196,197]</sup> Der Biolumineszenz-Resonanzenergietransfer (BRET)<sup>[198]</sup> hingegen nutzt den physikalischen Prozess der strahlungsfreien Energieübertragung eines Akzeptorfluorophors auf einen Donor. Eine weitere effektive Methodik zur Identifizierung von PPI ist die Affini-

tätsreinigung des zu untersuchenden Proteins (Antigen) unter Verwendung eines spezifischen Antikörpers.<sup>[199]</sup> Dieses als Co-Immunpräzipitation (Co-IP) bezeichnete Verfahren stellt durch die Kopplung mit massenspektrometrischen Analysen eine sensitive und leistungsstarke Methodik für die Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen dar.<sup>[193]</sup> Der generelle experimentelle Ablauf eines Co-IP Experimentes beginnt mit der Generierung des biologischen Probenmaterials (Zellen oder Gewebe) und dem anschließenden Aufschluss der Zellen (Abb. 5.1).



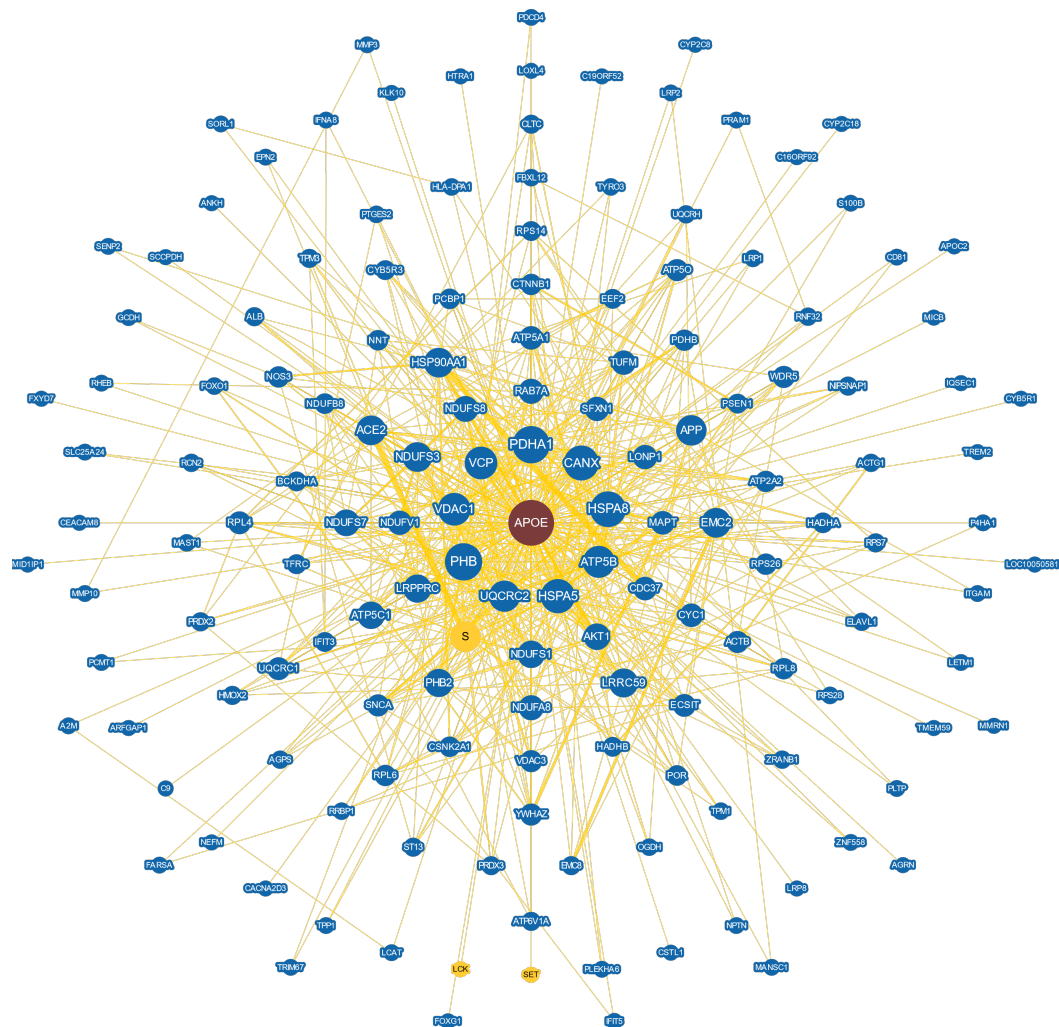
**Abbildung 5.1.:** Schematische Darstellung einer Co-Immunpräzipitation (Co-IP) und massenspektrometrischen Analyse. Nach Generierung des biologischen Probenmaterials (Zellen oder Gewebe) und Zellaufschluss, erfolgen die Bindungen des Antigen-tragenden *Bait*-Proteins bzw. *Bait*-Proteinkomplexes mit dem Antikörper. Gereinigte Proteinkomplexe werden unter nativen oder denaturierenden Bedingungen eluiert, durch *Bottom-Up*, *Middle-Down* oder *Top-Down* Methodiken aufgearbeitet und massenspektrometrisch analysiert. *Erstellt mit Biorender.com*

Die Isolierung des Zielproteins (*Bait*-Protein) und der zugehörigen Interaktionsproteine (*Prey*-Proteine) erfolgt durch Bindung des *Bait*-Proteins an einen immobilisierten spezifischen Antikörper.<sup>[194]</sup> Die Immobilisierung des Antikörpers durch kovalente Bindung an eine Matrix kann hierbei vor oder nach Bindung des *Bait*-Proteins erfolgen. Durch intensive Waschschrte werden die Protein-Protein Komplexe isoliert.<sup>[199]</sup> Die gewählten Bedingungen dieser Waschschrte sind, neben den Bedingungen des Zellaufschlusses, entscheidend für die Erhaltung von transienten, schwachen Protein-Protein-Interaktionen. Die Wahl milder Puffer kann den Erhalt dieser Interaktionen ermöglichen, allerdings können hierdurch unspezifische Bindungen zum Antikörper, zur Matrix oder des isolierten *Bait*-Proteins bestehen bleiben. Da die Unterscheidung zwischen spezifischen und

unspezifischen Interaktionen eine große Herausforderung bei der Datenauswertung darstellt, ist die Balance zwischen stringenten und milden Waschbedingungen entscheidend.<sup>[193]</sup> Die Elution der an die Antikörper gebundenen Proteinkomplexe erfolgt häufig unter denaturierenden Bedingungen, beispielsweise Puffer mit Natrium-Dodecylsulfat (SDS) oder Puffer mit niedrigem pH-Wert (z.B. durch TFA Zugabe).<sup>[193]</sup> Die eluierten Komplexe können nachfolgend, z.B. mittels SDS-PAGE, weiter separiert oder direkt für die massenspektrometrische Analyse vorbereitet werden. Die *Bottom-Up* MS-Analyse ist hierbei die am häufigsten verwendete Methodik.<sup>[192,193,200]</sup>

Eine bekannte Protein-Protein-Interaktion von APOE ist die Bindung zu LDL-Rezeptoren, welche entscheidend sind für die Fähigkeit von APOE Lipide zu transportieren. Basierend auf der *Open-access* BioGRID<sup>4.4</sup>-Datenbank<sup>[201]</sup> (*Biological General Repository for Interaction Datasets*, thebiogrid.org), welche manuell kuratierte Interaktionen basierend auf experimentellen Ergebnissen biomedizinischer Publikationen beinhaltet, wurden bislang 154 Interaktionspartner des humanen APOE identifiziert (Abb. 5.2). Das korrespondierende Netzwerk der potentiellen APOE Interaktionen in Abbildung 5.2 stellt alle experimentell beobachteten PPI im menschlichen Organismus dar. Die Stärke der Linien zwischen APOE und den Interaktionspartnern spiegelt die Beweisstärke der PPI wider, dass bedeutet die Anzahl der experimentellen Nachweise dieser spezifischen Interaktion. Der größte Teil dieser Interaktionen wurde in sogenannten Hochdurchsatz- (*High-throughput*) Interaktom Studien beobachtet, welche durch eine Protein-unspezifische (ungezielte) Analyse mehrere tausend Interaktionen innerhalb einer Studien identifizieren können.<sup>[185]</sup> Der Anteil funktioneller, sogenannter „low-throughput“ Studien, welche die biologische Relevanz untersuchen und die beobachteten PPIs unabhängig bestätigen, sind deutlich geringer.<sup>[185]</sup>

Ziel der in diesem Kapitel beschriebenen Experimente war die Identifizierung potentieller Interaktionspartner von Apolipoprotein E sowie die biologische Einordnung dieser PPI. Durch die identifizierten Interaktionspartner sollten Prognosen über bisher unbekannte Funktionen und Stoffwechselbeteiligungen von APOE abseits des Lipidstoffwechsels aufgestellt werden.



**Abbildung 5.2.:** Netzwerk der potentiellen APOE Protein-Protein-Interaktionen der BioGrid<sup>[201]</sup>-Datenbank. Interaktionen mit Proteinen innerhalb des menschlichen Organismus sind mit blauen Kreisen und PPI mit anderen Organismen mit gelben Kreisen dargestellt. Die Größe der Kreise repräsentiert die Stärke der Konnektivität zu APOE, während die Dicke der Linien die zugrunde liegende Beweisstärke darstellt. Download der Darstellung von <https://thebiogrid.org>.

## 5.2 Material und Methoden

### 5.2.1 Chemikalien

**Tabelle 5.1.:** Verwendete Chemikalien.

Chemikalie	Information
Acetonitril (ACN)	≥ 99,9 %, Sigma-Aldrich
Acrylamid/Bis-acrylamid	30 %, Roth
Ameisensäure ( <i>Formic Acid</i> , FA)	≥ 98 %, Sigma-Aldrich
Ammoniumbicarbonat (ABC)	≥ 99,5 %, Fluka Analytical
Ammoniumpersulfat (APS)	≥ 98,0 %, Sigma-Aldrich
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich
β-Mercaptoethanol	≥ 99 %, Sigma-Aldrich
Chloroform	≥ 99,8 %, <i>amylene stabilized</i> , Sigma-Aldrich
Coomassie Brilliant Blau R250	Sigma-Aldrich
Coomassie Brilliant Blau G250	Sigma-Aldrich
Deionisiertes Wasser	18,2 MΩ, Arium611-System, Satorius
Dithiothreitol (DTT)	≥ 99,5 %, Sigma-Aldrich
Essigsäure	≥ 99,7 %, Sigma-Aldrich
Ethanol (EtOH)	≥ 99,6 %, Sigma-Aldrich
Glu-C	<i>Sequencing Grade</i> , Promega
Glycerin	≥ 99,0 %, Sigma-Aldrich
Iodacetamid (IAA)	≥ 99,0 %, Sigma-Aldrich
Isopropanol	≥ 99,5 %, Roth
Methanol (MeOH)	≥ 99,6 %, Sigma-Aldrich
Natriumdodecylsulfat (SDS)	≥ 99,0 %, Roth
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	≥ 99,0 %, Roth
Trifluoressigsäure (TFA)	≥ 99,0 %, Sigma-Aldrich
TRIS	≥ 99,0 %, Roth
TRIS-HCl	≥ 99,0 %, Roth
Trypsin	Pierce™, MS-Qualität; Thermo Fisher Scientific

## 5.2.2 Immunpräzipitation von Huh7-Zelllysaten

Die in diesem Abschnitt beschriebene Arbeit wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. RIMBACH (Lebensmittelwissenschaften, Christian-Albrechts Universität zu Kiel) durchgeführt. Aus Gründen der Vollständigkeit und Nachvollziehbarkeit sind die durchgeführten Arbeiten nachfolgend zusammengefasst wiedergegeben.

Je Immunpräzipitation wurden 650 µg Protein-Lysat eingesetzt und mit Protein G Sepharose™ 4 Fast Flow Resinpartikel (Cytiva) vorgereinigt. Je Probe, mit Ausnahme der negativ Kontrolle, wurden jeweils 2,5 µg der Anti-APOE Antikörper APOE A1.4 (Santa Cruz, sc-13521) und APOE F-9 (Santa Cruz, sc-390925) zugeben und inkubiert (über Nacht, 4 °C). Die negativ Kontrolle wurde stattdessen mit 25 µL Lysepuffer (mit PIC/PMSF) versetzt und analog inkubiert. Die Reinigung erfolgte nach Bindung der Proteine über die Antikörper an die Sepharose-Partikel durch mehrmaliges waschen mit Lysepuffer (mit PIC/PMSF). Die Elution der Proteine von den Partikeln erfolgte durch Zugabe von insgesamt 36 µL Ladepuffer (50 mM Tris, 1 % SDS, 0,2 % Bromphenolblau, 4 %  $\beta$ -Mercaptoethanol, 40 % Glycerin, pH 6,8).

## 5.2.3 In-Lösungs-Verdau

Das gesamte Eluat der Co-IP aller vier Proben (negativ Kontrolle, mock, APOE3, APOE4) wurden mittels Chloroform-Methanol-Wasser-Präzipitation<sup>[75,76]</sup> gereinigt und die Präzipitate in 30 µL 100 mM Ammoniumbicarbonatlösung (ABC) resuspendiert. Die Proben wurden mit 3 µL 100 mM DTT (1h, 56 °C) reduziert und durch Zugabe von 3,3 µL 400 mM IAA (30 min, 20 °C) unter Lichtausschluss alkyliert. Für den Verdau In-Lösung wurden 19 µL je Probe in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 4,5 µL 200 ng/µL Trypsin über Nacht bei 37 °C inkubiert. Durch kühlen der Proben wurde der Verdau gestoppt und die Proben nach Zugabe von 1 µL 10 % TFA über C18-ZipTips gereinigt. Hierfür wurden diese zweimalig mit je 100 µL 50 % ACN konditioniert sowie zweimal mit je 100 µL 0,1 % TFA equilibriert. Die Proben wurden durch 20-maliges auf- und abpipettieren geladen und zweimal mit 10 µL 5 % MeOH mit 0,1 % TFA gewaschen. Eluiert wurde mit jeweils 100 µL 70 % und 100 µL 100 % ACN. Die Proben wurden im Vakuum getrocknet und für die nachfolgende LC-MS/MS Analyse in 15 µL 0,1 % TFA in 3 % ACN resuspendiert.

## 5.2.4 *Middle-Down* Ansatz

### 5.2.4.1 Probenvorbereitung mit PEPPI Fraktionierung

Die in Ladepuffer eluierten Co-IP Proben wurden ohne zusätzliche Reduzierung und Alkylierung für den PEPPI-MS (*Passively Eluting Proteins from Polyacrylamide gels as Intact species for MS*)<sup>[52,202]</sup> Ansatz verwendet. Je Probe wurden 9  $\mu\text{L}$  auf ein selbst präpariertes Gel (4 %/12 %) aufgetragen, wobei die Gelelektrophorese 15 min bei 40 V, gefolgt von 50 min bei 150 V durchgeführt wurde. Das Gel wurde in eine Plastikschiene überführt und für 30 min in einer wässrigen Fixierlösung (30 % MeOH, 10 % Essigsäure) inkubiert. Die Färbung erfolgte durch 15 minütige Inkubation mit einer Coomassie-Lösung (0,2 % (w/v) Coomassie R250, 0,005 % (w/v) Coomassie G250, 10 % EtOH, 40 % MeOH, 2 % Glycerin), die Entfärbung des Gels erfolgte über Nacht in einer 10 % Essigsäure/5 % EtOH Lösung. Die sichtbaren Banden wurden mithilfe eines Skalpells aus dem, mit deionisiertem Wasser gewaschenen, Gel ausgeschnitten und in 1,5 mL Reaktionsgefäße überführt (Abb. A.8). Die Gel-Stücke wurden gleichmässig mit einem Plastikstößel zermahlen und mit je 300  $\mu\text{L}$  0,05 % SDS in 100 mM ABC versetzt. Nach erneutem mahlen mittels Plastikstößel erfolgte eine 10 minütige Inkubation bei 20 °C und 1500 rpm. Nach der Zentrifugation der Proben ( $2000\times g$ , 3 min) wurden diese mittels Corning®-Constar®Spin-X®-Zentrifugenröhrchen-Filter (0,45  $\mu\text{m}$ , Zelluloseacetat-Membran) filtriert ( $2000\times g$ , 3 min). Die Proteine wurden anschließend über Amicon Ultra - Ultracel® 3 kDa Zentrifugalfilter (0,5 mL, Merck) konzentriert ( $13.500\times g$ , 25 min, 20 °C). Das Volumen auf der Membran wurde auf 500  $\mu\text{L}$  zweimalig mit 8 M Urea und anschließend zweimalig mit 100 mM ABC aufgefüllt (je  $13.500\times g$ , 25 min, 20 °C). Die auf den Amicon-Filtern verbliebene PEPPI-Lösungen ( $\sim 40 \mu\text{L}$ ) wurden in neue 1,5-mL Reaktionsgefäße überführt und mit je 2,5  $\mu\text{L}$  1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  Glu-C in 100mM ABC versetzt und inkubiert (37 °C, 1000 rpm, 4 h). Selbstgepackte *Anion Exchange*-StageTips (200  $\mu\text{L}$ ; 3M Empore *Anion-exchange disk*, 47 mm) wurden mit Spin-Adaptern auf 2-mL Reaktionsgefäße angebracht. Je StageTip wurden 40  $\mu\text{L}$  MeOH geladen und drei Minuten bei  $7000\times g$  zentrifugiert. Nach Zugabe von 40  $\mu\text{L}$  100 mM ABC ( $7000\times g$ , 3 min), wurden die Überstände der Amicon-Zentrifugalfilter, welche die Glu-C generierten Peptide enthielten, geladen ( $7000\times g$ , 3 min). Nach erfolgreichem Waschen mit 200  $\mu\text{L}$  100 mM ABC ( $7000\times g$ , 3 min), wurden die StageTips inklusive Spin-Adapter in neue 1,5-mL Reaktionsgefäße überführt. Die Elution der *Middle-Down*-Peptide erfolgte mit 40  $\mu\text{L}$  0,5 % (v/v) Ameisensäure in 50 % EtOH, gefolgt von 40  $\mu\text{L}$  0,5 % (v/v) Ameisensäure in 50 % ACN (jeweils  $7000\times g$ , 3 min).

Die Eluate wurden anschließend im Vakuum getrocknet und für die LC-MS/MS Analyse in 3 % ACN und 0,01 % TFA aufgenommen.

#### 5.2.4.2 Probenvorbereitung ohne PEPPi Fraktionierung

Ergänzend wurde die Probenvorbereitung nach TAKEMORI *et al.*<sup>[52,203]</sup> (*Sample Pretreatment without PEPPi fractionation*) unter Verwendung von je 19  $\mu\text{L}$  der CMW-gereinigten Probe (Kap. 5.2.3) durchgeführt. Die reduzierten und alkylierten Proben wurden jeweils mit 3  $\mu\text{L}$  1,1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  Glu-C in 100 mM ABC versetzt und inkubiert (37 °C, 4 h). Für die Probenreinigung erfolgte die Auftragung der Proben auf die Membran von Amicon Ultra - Ultracel® 3 kDa Zentrifugalfilter (0,5 mL, Merck) (13500 $\times$ g, 10 min, 20 °C) und zweimaligem Waschen durch auffüllen des Volumens auf 500  $\mu\text{L}$  mit 100 mM ABC (13500 $\times$ g, 25 min, 20 °C). Die durch Glu-C Verdau generierten *Middle-Down* Peptide wurden entsprechend Kapitel 5.2.4.1 über *Anionen Exchange-StageTips* gereinigt und eluiert.

### 5.2.5 Bottom-Up LC-MS/MS Analyse

Die Separation der tryptischen Peptide der Co-IP erfolgte über ein UltiMate™ 3000-RSLCnano-System, welches mit einer Acclaim™ PepMap™ 100 C18-HPLC-Säule (3  $\mu\text{m}$ , 100 Å, 150 mm  $\times$  75  $\mu\text{m}$ ) ausgestattet war. Dieses System war *online* an ein Q Exactive™ Plus Orbitrap Massenspektrometer gekoppelt. Jede Probe wurde in drei technischen Replikaten gemessen.

Die LC-basierte Trennung erfolgte über einen 90 minütigen linearen Gradienten bei einer Flussrate von 300  $\text{nL}/\text{min}$  und unter Verwendung der Eluenten A (0,05 % Ameisensäure in deionisiertem Wasser) und B (0,05 % Ameisensäure, 80 % ACN). Nachdem der Gradient 3 min auf 4 % Eluent B gehalten wurde, folgte ein linearer 60 min langer Anstieg auf 50 % B. Der Gradient wurde 10 min isokratisch bei 90 % B gehalten und abschließend die Säule 15 min bei 4 % B gewaschen. Die massenspektrometrische Analyse erfolgte im *positive Ion mode* bei einer Kapillarentemperatur von 250 °C. Die MS1-Spektren wurden mit einer Auflösung von 70.000, bei einem AGC *target* von  $3 \cdot 10^6$  und einer maximalen Injektionszeit (IT) von 100 ms über einen Scanbereich von 300-1500  $m/z$  aufgenommen. Für die HCD-Fragmentierung wurden die 10 intensivsten Vorläuferionen eines MS1 *Full Scans* verwendet. Die hierfür verwendete normalisierte Kollisionsenergie betrug 27 %. Die MS2-Spektren wurden bei einer Auflösung von 17.500, bei einem AGC *target* von  $1 \cdot 10^5$  und einer IT von 50 ms über einen Scanbereich von 200-2000  $m/z$  aufge-



nommen. Für das dynamische Ausschlussverfahren (*Dynamic Exclusion*) betrug das Wiederholungszeitfenster 20 s.

## 5.2.6 *Middle-Down* LC-MS/MS Analyse

Die MD-Peptide des Glu-C Verdaus wurden über ein UltiMate™ 3000-nano-UHPLC System, welches mit einer Accucore C4-Säule (50 cm × 75 µm, 2,6 µm, 150 Å) und einer C4-Vorsäule (PepMap 300, 5 µm, 300 Å) ausgestattet war, separiert. Diese war *online* an ein Fusion Lumos Tribrid Massenspektrometer mit einem FAIMS pro Interface gekoppelt.

Die Fraktionierung der Peptide erfolgte über einen 150 min Gradienten unter Verwendung der Eluenten A (0,05 % Ameisensäure in deionisiertem Wasser) und B (0,04 % Ameisensäure, 80 % ACN), bei einer Flussrate von 300 nL/min. Der Gradient wurde entsprechend TAKEMORI *et al.*<sup>[52]</sup> eingestellt (Tab. A.14). Für die massenspektrometrische Analyse wurden vier verschiedene FAIMS-Einstellungen (CV –65, –55, –45, –35 V; jeweils 3 sek *Cycle Time*) verwendet. MS1-Spektren wurden bei einer Auflösung von 60.000 (120.000 für CV –65 V), einem normalisierten *AGC target* von 200 % (1000 % für CV –65 V) und einer IT von 118 ms (246 ms für CV –65 V) aufgenommen. Hierbei wurden jeweils 4 Microscans, bzw. für CV –65 V 2 Microscans über einen Scanbereich von 400-800 m/z aufgenommen. Die intensivsten Vorläuferionen eines Zykluses wurden bei einem Isolationsfenster von 5 m/z ausgewählt und bei einer CID-Kollisionsenergie von 25 % fragmentiert. Die MS2-Spektren wurden bei einer Auflösung von 50.000 (60.000 für CV –65 V), bei einem normalisierten *AGC target* von 800 % (1000 % für CV –65 V), einer IT von 200 ms (250 ms für CV –65 V) in einem Scanbereich von 150-2000 m/z aufgenommen.

## 5.2.7 Datenverarbeitung

### 5.2.7.1 Analyse *Bottom-Up* Datensätze

Die Datenbanksuche der LC-MS/MS Rohdaten erfolgte mit der Software Proteome Discoverer (V3.0.1.27, Thermo Fisher Scientific). MS/MS Spektren wurden mit dem CHIMERYS™ Suchalgorithmus gegen die Proteindatenbanken des humanen Proteoms (UniProt<sup>[78]</sup>, Juli 2023) unter Ergänzung der Isoformen von APOE sowie bekannter Kontaminanten (cRAP, *list of laboratory and contact dust conta-*

*minations*, <https://www.thegpm.org/crap/>, Mai 2021) durchsucht. Hierbei wurden Peptidlängen zwischen 7 bis 30 Aminosäuren, bei maximal zwei verpassten Spaltstellen des voll-tryptischen Verdaus, erlaubt. Eine Fragmentionen-Massentoleranz von  $\pm 20$  ppm wurde gewählt. Als variable Modifikation wurde die Oxidation von Methioninresten (M, +15,995 Da) und als statische Modifikation die Carboamidomethylierung der Cysteinreste (C, +57,021 Da) gesetzt. Die *Label-free* Quantifizierung wurde mittels *Minora Feature Detector* durchgeführt.

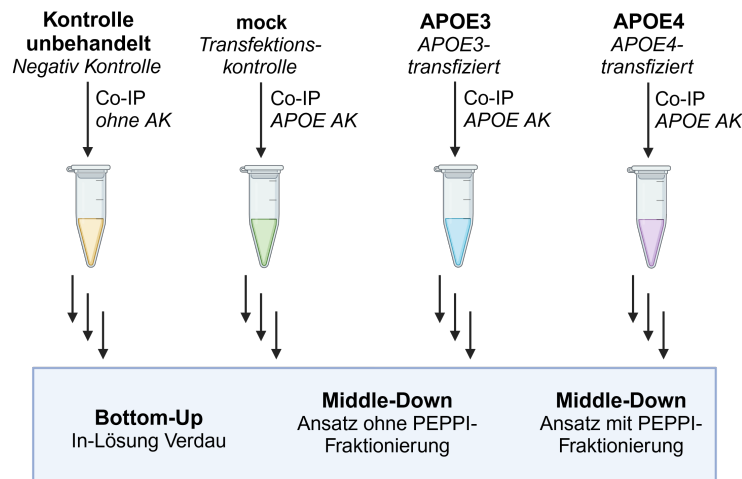
Nur Proteine mit mindestens zwei identifizierten Peptiden wurden für die weitere Analyse verwendet. Die Verhältnisse der Abundanzen der identifizierten Proteine der APOE- sowie mock-Co-IP-Proben zu jenen der negativ Kontrolle wurden berechnet. Lediglich Proteine, welche eine mindestens zweifach erhöhte Anreicherung gegenüber der negativ Kontrolle aufwiesen wurden für die endgültigen Proteinlisten berücksichtigt.

#### 5.2.7.2 Analyse *Middle-Down* Datensätze

Die Datenbanksuche beider *Middle-Down* Ansätze wurde mit ProSightPD (V4.2) innerhalb der Software Proteome Discoverer (V3.0) gegen die humane Proteindatenbank (UniProt<sup>[78]</sup>, Juli 2023), welche durch die APOE-Isoformen 3 und 4 ergänzt wurde, durchgeführt. Die hochaufgelösten MS1- und MS2-Spektren wurden mittels Xtract-Algorithmus über ProSightPD „High/High cRAWler“ unter Verwendung der Standardparameter dekonvuliert und gruppiert. Die *Annotated Search* und *Subsequence Search* wurden mit einer Vorläuferionen- und Fragmentionen-Massentoleranz von 10 ppm und der variablen N-Term Modifikation Acetylierung durchgeführt. Innerhalb des *Consensus*-Schrittes der PD-Suche wurde ein *false discovery* (FDR)-Grenzwert von 1 % gewählt. Peptid- und Proteinlisten mit einer hohen *Characterization Confidence* wurden aus PD exportiert.

## 5.3 Ergebnisse und Diskussion

Für die Identifizierung der Interaktionspartner von Apolipoprotein E innerhalb des Proteoms der Huh7-Zellen wurden *Bottom-Up* und *Middle-Down* MS-Analysen durchgeführt (Abb. 5.3). Hierfür wurden drei modifizierte und eine unmodifizierte Huh7-Zelllinie verwendet. Die modifizierten Zellen waren mit humanem APOE3-beziehungsweise APOE4-transfiziert, während die dritte Zelllinie eine Transfektionskontrolle (mock) darstellte, in welcher ein leerer Plasmidvektor für die Transfektion verwendet wurde. Diese Zellen wurden während der Durchführung der Co-IP mit beiden APOE-Antikörpern inkubiert, während die unbehandelte Kontrolle (K. unbeh.; negativ Kontrolle) mit der gleichen Menge Lysepuffer versetzt und inkubiert wurde.



**Abbildung 5.3.:** Experimentelles Design der Analyse von Protein-Protein Interaktionen mit Apolipoprotein E innerhalb der Huh7-Zellen nach erfolgter Co-Immunopräzipitation mit Anti-APOE Antikörpern. Die transfizierten Huh7-Zellen (mock - Transfektions-Kontrolle, leerer Plasmidvektor; APOE3; APOE4) sowie eine negativ Kontrolle wurden für die *Bottom-Up* und *Middle-Down* Analysen verwendet.

Für den BU-Ansatz wurden die vier Eluate der Co-IP aufgereinigt und tryptisch verdaut. Zusätzlich wurden die Proben über zwei *Middle-Down* Ansätze (mit und ohne PEPPI-Fraktionierung; *Passively Eluting Proteins from Polyacrylamide gels as Intact species* (PEPPI)<sup>[203]</sup>) analysiert (Abb. 5.3). Für die MD-Analyse ohne PEPPI-Fraktionierung wurden die gereinigten Eluate mit Glu-C inkubiert. Die Proben für den zweiten Ansatz (mit PEPPI-Fraktionierung) wurden hingegen vor Verdau mit Glu-C über eine SDS-PAGE separiert und folgend extrahiert.

### 5.3.1 Bottom-Up Ansatz

Für die quantitative Analyse der Protein-Protein-Interaktionen wurden die Rohdaten der APOE3 beziehungsweise der APOE4 transfizierten Zellen gemeinsam mit jenen der negativ Kontrolle in Proteome Discoverer 3.0 gegen die Datenbank des humanen Proteomes durchsucht. Innerhalb der PD-Suche APOE3/K.unbeh. wurden 274 bzw. für APOE4/K.unbeh. 268 Proteine identifiziert. Diese wurden entsprechend Kapitel 5.2.7.1 weiter gefiltert. Hierbei wurden innerhalb des APOE3 Experimentes insgesamt 21 Proteine (Tab. A.15) und innerhalb des APOE4-Experimentes 12 Proteine identifiziert (Tab. A.16). Elf dieser Proteine waren in beiden finalen Proteinlisten vertreten und wurden für die weitere Datenauswertung verwendet (Tab. 5.2).

Interessanterweise sind fünf der elf identifizierten potentiellen APOE Interaktionspartner mitochondriale Proteine. Infolge dieser Beobachtung erfolgt die nachfolgende Diskussion der identifizierten Proteine in den zwei Kategorien „Interaktionen mit mitochondrialen“ und „nicht-mitochondrialen Proteinen“.

#### Interaktionen mit mitochondrialen Proteinen

Das Protein *Mitochondrial import receptor subunit TOM40 homolog* (TOM40, O96008; auch *Translocase Of Outer Mitochondrial Membrane 40* genannt) wurde in beiden Proben mit größt möglichem Unterschied zur negativ Kontrolle identifiziert (Tab. 5.2). Das Gen *TOMM40*, welches dieses Protein kodiert, befindet sich wie *APOE* auf dem Chromosom 19q13.<sup>[204]</sup> TOM40 bildet als essentielles Membranprotein innerhalb des Multiprotein-Komplexes TOM (*Translocase of the Outer Membrane*) einen hydrophilen Porenkanal für die Translokation von Proteinen in das Mitochondrium aus.<sup>[205,206]</sup>

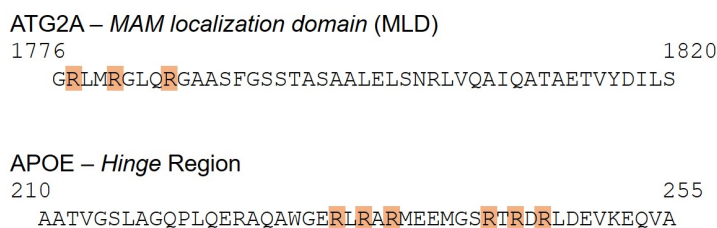
Unabhängig von der Assoziation von APOE und TOM40 weisen zahlreiche Studien auf die Anwesenheit von APOE in Mitochondrien und die Beeinflussung von mitochondrialen Funktionen durch APOE hin.<sup>[74,205,207–209]</sup> Bisher ungeklärt ist jedoch durch welchen Mechanismus APOE in das Mitochondrium gelangt. Der Import kleiner Moleküle wie ATP, NADPH oder reaktiven Sauerstoffspezies in die Mitochondrien findet über die Interaktion mit dem Kanalprotein *Voltage-dependent anion selective channel Protein 1* (VDAC1) statt.<sup>[210]</sup> Proteine hingegen sind zu groß für diese Art des Importes und werden stattdessen über die Interaktion mit dem TOM-Komplex in das Mitochondrium eingeschleust.<sup>[185,206,211]</sup> Für diese Wechselwirkung ist innerhalb des Zielproteins eine mitochondriale Signalsequenz

**Tabelle 5.2.:** Potentielle APOE Interaktionspartner der Co-IP/MS-Analyse, welche in den APOE3 und APOE4 transfizierten Huh7-Zellen identifiziert wurden. Angabe der Abundanz-Verhältnisse APOE3 bzw. APOE4 gegen die unbehandelte Kontrolle (K. unbeh.).

Protein	Protein-Accession	Gen	APOE3/K. unbeh.	APOE4/K. unbeh.
Mitochondrial import receptor subunit TOM40 homolog	O96008	<i>TOMM40</i>	20000,0	20000,0
Surfeit locus protein 4	O15260	<i>SURF4</i>	20000,0	20000,0
Voltage-dependent anion-selective channel protein 1	P21796	<i>VDAC1</i>	399,0	999,0
Transmembrane protein 43	Q9BTV4	<i>TMEM43</i>	199,0	665,7
Isoform 1 of Voltage-dependent anion-selective channel protein 2	P45880-1	<i>VDAC2</i>	199,0	399,0
Voltage-dependent anion-selective channel protein 3	Q9Y277	<i>VDAC3</i>	116,6	332,3
Stomatin	P27105	<i>STOM</i>	32,3	44,5
Lon protease homolog, mitochondrial	P36776	<i>LONP1</i>	30,3	75,9
Cytoskeleton-associated protein 4	Q07065	<i>CKAP4</i>	16,1	4,9
Membrane-associated progesterone receptor component 1	O00264	<i>PGRMC1</i>	11,5	5,2
Calnexin	P27824	<i>CANX</i>	7,0	2,0

(*mitochondrial localization sequence* (MLS)) für die Bindung an die Translokase nötig. Eine solche wurde bislang allerdings nicht in der Proteinsequenz von APOE identifiziert.<sup>[185,211]</sup> Ergänzend hierzu wurde bislang nur in einer kürzlich von BOCHAROVA *et al.*<sup>[212]</sup> durchgeführten Interaktom-Studie die potentielle Interaktion von APOE und TOMM40 gezeigt. Nach aktuellem Kenntnisstand, basierend auf einer manuellen Literaturrecherche und die Nutzung der Datenbanken MINT<sup>[213]</sup> und BioGRID (4.4)<sup>[201]</sup>, wurde bislang kein Nachweis der PPI zwischen APOE und TOM40 in einer funktionellen Studie auf Proteinebene erbracht. Durch die in dieser Arbeit durchgeführten Co-IP/MS-Analysen konnten sowohl in den APOE3 als auch APOE4 transfizierten Huh7-Zellen experimentelle Hinweise auf die potentielle Interaktion zwischen den APOE-Isoformen und TOM40 geliefert werden (Tab. 5.2).

TANG *et al.*<sup>[214]</sup> identifizierten in der Proteinsequenz des *Autophagy-related protein 2 homolog A* (ATG2A) die sogenannte *MAM localization domain* (MLD) über welche TOM40 mit ATG2A interagiert (Abb. 5.4).<sup>[214]</sup> Ein MLD-ähnliches Motiv, bestehend aus drei isolierten hochkonservierten Argininresten mit wenigen Aminosäureresten Abstand zueinander ([Arg-XX-Arg-XXX-Arg]), befindet sich ebenso in der *Hinge*-Region von APOE (Abb. 5.4). Möglicherweise findet die Interaktion von APOE mit TOM40, über die MLD-ähnliche Proteinsequenz statt. Diese Hypothese muss allerdings durch unabhängige Experimente überprüft werden.



**Abbildung 5.4.:** Aminosäuresequenz der *MAM localization domain* (MLD) des *Autophagy-related protein 2 homolog A* (ATG2A), sowie der *Hinge*-Region von Apolipoprotein E. Farblich hervorgehoben sind die konservierten Argininreste.

Neben dem *Outer Mitochondrial Membrane* (OMM, äußere Membran)-Kanalprotein TOM40 wurde auch das *Voltage-dependent anion selective channel Protein 1* (VDAC1; P21796) identifiziert (Tab. 5.2). Das auf der äußeren Membran lokalisierte VDAC1 formt einen Kanal durch die OMM und fungiert als Gatekeeper für den Austausch von Substraten und Produkten.<sup>[210]</sup> Neben der Regulierung der metabolischen und energetischen Funktionen des Mitochondriums ist VDAC1 an einer Vielzahl mitochondrialer Prozesse, beispielsweise dem Transport von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen, beteiligt.<sup>[210,215–217]</sup> Zusätzlich dient VDAC1 beim mitochondrialen Import von Proteinen als Kopplungsfaktor innerhalb des TOM-TIM-Komplexes.<sup>[185,218]</sup> Entgegen der Protein-Protein Interaktion mit TOM40, wurde die Interaktion zwischen APOE und VDAC1 unter anderem basierend auf *Affinity purification* (AP)-Massenspektrometrie Methoden *in vitro* (Huh7- sowie HEK293T-Zellen) als auch *in vivo* (Leber, APOE TR-Mäuse) nachgewiesen.<sup>[74,219–221]</sup>

Neben VDAC1 wurden auch die zwei weiteren in Säugetieren vorkommenden Isoformen, VDAC2 (P45880) und VDAC3 (Q9Y277), der VDAC-Familie (auch: mitochondriale Porine genannt) als potentielle Interaktionspartner innerhalb des Co-IP/MS-Experimentes identifiziert (Tab. 5.2). Für die Datenbanksuchen mittels der Software Proteome Discoverer wurde die Proteindatenbank des humanen Proteoms inklusive der bislang verfügbaren Isoformen verwendet. In Tabelle 5.2 ist zu erkennen, dass PD die identifizierten Peptide des Co-IP/MS-Experimentes der Isoform VDAC2 (P45880-1) zugewiesen hat. Die zugrunde liegenden Peptide lassen jedoch eine Unterscheidung zwischen der Isoform P45880-1 und der kanonischen

Sequenz (VDAC2, P45880) nicht zu (Abb. 5.5). Die Proteinsequenzen von VDAC2 und der Isoform 1 weisen eine Sequenzhomologie von 96,6 % auf, unterscheiden sich hierbei jedoch in der Sequenzlänge sowie der Aminosäurenabfolge am Protein N-Terminus. In Abbildung 5.5 ist zu erkennen, dass die in diesem Experiment identifizierten Peptide diese Bereiche des N-Terminus nicht abdecken. Aufgrund dessen wies die Software PD willkürlich der schwereren Isoform, welche in diesem Fall P45880-1 war, die Peptide zu. Da es für das Vorliegen der Isoform 1 von VDAC2 aus den vorliegenden Daten dieser Studie keine experimentellen Beweise gibt, wird die folgende Diskussion auf VDAC2 (P45880) beschränkt.

P45880	MATHGQTCARPMCIPPSYADLGKAARDIFNKGFGF	35
P45880-1	MSWCNELRLPALKQHSIGRGLESHITMCIPPSYADLGKAARDIFNKGFGF	50
P45880	GLVKLDVKTKSCSGVEFSTSGSSNTDTGKVTGTLETQYKWCCEYGLTFTEK	85
P45880-1	GLVKLDVKTKSCSGVEFSTSGSSNTDTGKVTGTLETQYKWCCEYGLTFTEK	100
P45880	WNTDNTLGTEIAIEDQICQGLKLTFTDFTFSPNTGKSKGKIKSSYKRECIN	135
P45880-1	WNTDNTLGTEIAIEDQICQGLKLTFTDFTFSPNTGKSKGKIKSSYKRECIN	150
P45880	LGCDVDFDFAGPAIHGSAVFGYEGWLAGYQMTFDSAQSKLTRNNFAVGYS	185
P45880-1	LGCDVDFDFAGPAIHGSAVFGYEGWLAGYQMTFDSAQSKLTRNNFAVGYS	200
P45880	TGDFQLHTNVNDGTEFGGSIYQKVCEDLDTSVNLAWTSGTNCTRFGIAAK	235
P45880-1	TGDFQLHTNVNDGTEFGGSIYQKVCEDLDTSVNLAWTSGTNCTRFGIAAK	250
P45880	YQLDPTASISAKVNNSSLIGVGYTQTLRPGVKLTLSALVDGKSSINAGGHK	285
P45880-1	YQLDPTASISAKVNNSSLIGVGYTQTLRPGVKLTLSALVDGKSSINAGGHK	300
P45880	VGLALELEA	294
P45880-1	VGLALELEA	309

**Abbildung 5.5.:** Proteinsequenzen von VDAC2 (P45880, schwarz) und der Isoform 1 von VDAC2 (P45880-1, blau) unter farblicher Hervorhebung der identischen Aminosäuren (hellgrün). Identifizierte Peptide des Co-IP/BU-MS-Experimentes sind rot umrandet.

Alle drei VDAC-Isoformen sind Kanalproteine und zählen zu den häufigsten Proteinen der äußeren Membran (OMM). Während VDAC1 und VDAC2 hauptsächlich auf verschiedenen Domänen lokalisiert sind, ist VDAC3 gleichmässiger auf der Oberfläche der Mitochondrien verteilt.<sup>[222]</sup> Bislang liegen die meisten Forschungsdaten zu VDAC1 vor, während wenig über VDAC3 bekannt ist.<sup>[216,223]</sup> Dies liegt auch in der Tatsache begründet, dass VDAC1 die höchste Abundanz aller drei Isoformen im Organismus aufweist. Während für VDAC1 und VDAC2 die Fähigkeit der Ausbildung von Poren in der OMM experimentell nachgewiesen wurde, konnte diese Eigenschaft bislang für VDAC3 nicht gezeigt werden.<sup>[224]</sup> Ein Grund hierfür könnte sein, dass lediglich Analysen mit rekombinanten VDAC3 durchgeführt wurden, da die Aufreinigung des nativen Proteins nicht erfolgreich war.<sup>[223]</sup>

Die Interaktion von APOE mit VDAC3 (Q9Y277) konnte in Interaktom-Studien von HUTTLIN *et al.*<sup>[219–221]</sup>, unter Verwendung von Hochdurchsatz-Affinity purification-MS Methoden, gezeigt werden. Die PPI mit VDAC2 (P45880) (Tab. 5.2) hingegen wurde auf Proteinebene innerhalb der Co-IP/MS Analyse von RÜTER *et al.*<sup>[74]</sup> beobachtet.

Das fünfte mitochondriale Protein welches als potentieller Interaktionspartner von Apolipoprotein E identifiziert wurde war *Lon protease homolog* (LONP1, P36776; Tab. 5.2). Die ATP-stimulierte Serinprotease LONP1 ist essentiell für das mitochondriale Proteinqualitätskontroll-System (*Protein Quality Control*, PQC) und entsprechend an der Aufrechterhaltung der Proteinhomöostase beteiligt. Ebenso ist LONP1 am Metabolismus des Mitochondriums involviert.<sup>[225–227]</sup> Über Interaktom-Studien wurde bereits die PPI zwischen APOE und LONP1 beobachtet.<sup>[201,228,229]</sup> Zusätzlich konnte diese Interaktion innerhalb der massenspektrometrischen Analyse von Co-Immunpräzipitaten mit APOE als *Bait*-Protein im Lebergewebe von APOE TR Mäusen identifiziert werden.<sup>[74]</sup> Die mechanistische und funktionelle Bedeutung dieser Interaktion im biologischen Kontext ist bislang jedoch noch nicht geklärt.

## Interaktionen mit nicht-mitochondrialen Proteinen

Ein weiterer, sowohl in den APOE3- als auch APOE4-transfizierten Huh7-Zellen, identifizierter APOE-Interaktionspartner ist das integrale Membranprotein des Endoplasmatischen Retikulum (ER) Calnexin (CANX, P27824). Das Lektin Calnexin ist über seine Funktion als Chaperon an der PQC des ER beteiligt und Unterstützung den Faltungsprozess von Proteinen.<sup>[230,231]</sup> Zusätzlich reguliert CANX den Fluss von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen vom ER in die Mitochondrien und kontrolliert somit die mitochondriale Bioenergetik.<sup>[232]</sup> Diese Funktion wird jedoch nur dem luminalen N-Terminus von Calnexin zugeschrieben. Der dem Cytosol zugewandte C-Terminus interagiert hingegen mit verschiedenen Proteinen an der ER-Cytosol-Grenzfläche.<sup>[231,233]</sup> Aktuelle Studien deuten darauf hin, dass die posttranslationale Modifikation des C-Terminus zur Interaktion mit verschiedenen Proteinen und entsprechend zu unterschiedlichen biologischen Funktionen führt.<sup>[231,234]</sup> Die Interaktion von APOE und Calnexin wurde innerhalb der Interaktom-Studie von MOUTAOUIK *et al.* unter Verwendung von MS-basierten Co-Fraktionierungen und Phosphoproteomik beobachtet.<sup>[228]</sup> Neben Calnexin wurde das Protein Stomatin (P27105) innerhalb des Co-IP/BU-MS Experimentes identifiziert (Tab. 5.2). Das integrale Membranprotein Stomatin, welches im Menschen durch das Gen *STOM* codiert wird, wurde zuerst in der Membran von humanen Erythrozyten (roten Blutkörperchen) identifiziert und charakterisiert.<sup>[235,236]</sup> Das ubiquitär synthetisierte Protein ist assoziiert mit



Cholesterin-reichen Membrandomänen (Lipid Rafts) und reguliert die Aktivität von einer Vielzahl verschiedener Membranproteine und möglicherweise auch Ionenkanäle. Zudem wird Stomatin eine wichtige Funktion in der Organisation der Membranfunktion zugeschrieben.<sup>[78,236–239]</sup> Während eine PPI zwischen APOE und Stomatin bislang nicht beschrieben wurde, konnten LUCK *et al.*<sup>[240]</sup> innerhalb der Interaktom-Studie die Interaktion von Stomatin mit APOA-2 zeigen. APOA-2 fördert analog zu APOE und APOA-1, infolge der gleichen strukturellen  $\alpha$ -Helixes, die Assoziation mit der Plasmamembran sowie den Lipidefflux.<sup>[239]</sup> Eine weitere Interaktion wurde zwischen Caveolin-1, einem Protein dessen Topologie ähnlich zu Stomatin ist und ebenfalls mit Lipid Rafts assoziiert ist, und Apolipoprotein A-1 beobachtet.<sup>[239,241]</sup>

Das *Housekeeping*-Protein *Surfeit locus protein 4* (O15260, *SURF4*; Tab. 5.2) fungiert als Cargo-Rezeptor des Endoplasmatischen Retikulum und vermittelt unter anderem den Export von Lipoproteinen, den Transport von Apolipoproteinen und die Sekretion von VLDL.<sup>[242–244]</sup> Analog zum Membranprotein Stomatin wurde auch für den Cargo-Rezeptor *SURF4* bislang keine Interaktion mit APOE beschrieben. In *Surf4* Knockout Mäusen konnte jedoch gezeigt werden, dass der Transport von ApoA1 und ApoB48 behindert wurde sowie vergleichend erheblich reduzierte Plasmalevel von ApoB vorlagen.<sup>[242,244]</sup>

Ein weiteres hoch konserviertes integrales Membranprotein, das *Transmembrane protein 43* (*TMEM43*, Q9BTV4), wurde innerhalb des hier durchgeführten Co-IP/MS-Experimentes identifiziert (Tab. 5.2). Hauptsächlich wird *TMEM43* in der inneren Kernmembran (*inner nuclear membrane*, INM) und dem Endoplasmatischen Retikulum exprimiert und translatiert.<sup>[245,246]</sup> *TMEM43* wird in Assoziation mit der Entwicklung verschiedener Krebserkrankungen, beispielsweise der Bauchspeicheldrüse oder der Leber sowie Kardiovaskulären-Krankheiten gesetzt.<sup>[245–247]</sup> In Zusammenhang mit dem hepatozellulären Karzinom (HCC, primärer Leberkrebs) konnte gezeigt werden, dass *TMEM43* über VDAC1 die Proliferation und Apoptose von HCC reguliert.<sup>[248]</sup> Protein-Protein-Interaktionen zwischen APOE und *TMEM43* wurden bislang nicht beobachtet.

Das Transmembranprotein *Cytoskeleton-associated protein 43* (Q07065, *CKAP4*; auch *Cytoskeleton-linking membrane protein 63* (*CLIMP-63*) oder p63 genannt), welches analog zu *SURF4* hauptsächlich im ER lokalisiert ist, wurde ebenfalls als potentieller APOE-Interaktionspartner identifiziert (Tab. 5.2). *CKAP4* ist ein multifunktionelles Protein, welches beispielsweise durch die clusterbildende luminal Domäne entscheidend an der Struktur-Stabilisierung des ER beteiligt ist.<sup>[249,250]</sup> Gleichzeitig vermittelt *CKAP4* die Bindung zwischen ER und Mikrotubuli, was zu einer Umstrukturierung des ER-Netzwerkes führt.<sup>[251]</sup> Ebenso wurde *CKAP4* als Rezeptor für verschiedene Proteine, z.B. *Tissue Plasminogen Activator* oder

*Antiproliferative factor*, identifiziert.<sup>[252,253]</sup> Folgend zu TMEM43, STOM und SRUF4 wurde die Interaktion zwischen CKAP4 und APOE noch nicht beobachtet. Der letzte potentielle Interaktionspartner, welcher sowohl in APOE3- als auch APOE4-transfizierten Huh7-Zellen identifiziert wurde, ist das Transmembranprotein *Membrane-associated Progesterone receptor component 1* (PGRMC1, O00264; Tab. 5.2). PGRMC1 bindet vermutlich Progesteron, wobei noch nicht geklärt ist welche Rolle PGRMC1 in der Progesteron-Signalübertragung einnimmt.<sup>[254]</sup> Hingegen konnte die Bindung zu verschiedenen Cytochrom P450-Proteinen (CYP) über die dem Cytosol zugewandten C-terminalen Cytochrom b5-Domäne eindeutig gezeigt werden.<sup>[254–257]</sup> Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass PGRMC1 die Aktivität dieser CYPs reguliert, welche am Hormon- und Fettstoffwechsel beteiligt sind.<sup>[258–260]</sup> PGRMC1 ist hauptsächlich im ER lokalisiert, jedoch konnte es auch in der Plasmamembran, dem Nukleus, dem Cytoplasma und durch PIEL *et al.*<sup>[255]</sup> auch in der äußeren mitochondrialen Membran beobachtet werden.<sup>[259,261]</sup> Dies könnte in der Funktion von PGRMC1 innerhalb der Regulierung des intrazellulären Proteintransportes begründet liegen. Beispielsweise konnten FURUHATA *et al.*<sup>[260]</sup> zeigen, dass das Häm-dimerisierte PGRMC1 mit LDL-R bzw. VLDL-R interagiert und die Lokalisierung auf der Plasmamembran reguliert. Eine direkte Interaktion mit Apolipoprotein E konnte bislang jedoch nicht beobachtet werden.

### 5.3.2 *Middle-Down* Ansätze

Die durch die PD-Datenbanksuche erhaltenen Proteinlisten der *Middle-Down*-MS-Messungen der APOE3- und APOE4-transfizierten Huh7-Zellen wurden zur Minimierung der Identifizierung von artifiziellen, unspezifischen Bindungen weitergehend gefiltert. Hierfür wurden alle Proteine entfernt, welche ebenso innerhalb der negativ Kontrolle (K. unbehandelt) identifiziert wurden. Zusätzlich wurden nur jene Proteine berücksichtigt die sowohl in den APOE3-, als auch den APOE4-Proben beobachtet wurden. Insgesamt konnten 32 Proteine als potentielle APOE-Interaktionspartner identifiziert werden (Tab. A.17). Vier dieser Proteine dieser Liste (CANX, TOM40, STOM und VDAC1) wurden dabei ebenfalls in den Co-IP/*Bottom-Up*-MS Analysen (Kap. 5.3.1) beobachtet. Bei der weiteren Analyse dieser vier Proteine zeigte sich, dass mit Ausnahme von VDAC1 die Identifizierung der Proteine lediglich auf einem Peptid beruhte (Tab. 5.3). Da gegensätzlich zu *Bottom-Up*-Analysen die proteolytischen Peptide in *Middle-Down*-Analysen länger sind, ist die Identifizierung von Proteinen auf Grundlage eines Peptides möglich. Die durchschnittliche Sequenzlänge der Peptide der durchgeführten Co-IP/BU-Experimente betrug 13 Aminosäuren. Vergleichend hierzu wurde für die Peptide

der vier identifizierten Proteine (CANX, TOM40, STOM, VDAC1) hingegen eine durchschnittliche Sequenzlänge von 34 Aminosäuren beobachtet.

**Tabelle 5.3.:** Überschneidung der identifizierten Proteine des BU- und MD-Ansatzes und Angabe der in den MD-Analysen der APOE3 und APOE4 transfizierten Huh7-Zellen beobachteten Anzahl von Peptiden und PSMs.

Protein- Accession	Protein	APOE3		APOE4	
		#Peptide	#PSMs	#Peptide	#PSMs
P27824	CANX	1	1	1	1
O96008	TOM40	1	3	1	1
P27105	STOM	1	1	1	1
P21796	VDAC1	5	6	3	6

Neben den identifizierten Peptiden pro Protein ist ebenfalls die Anzahl der *Peptide Spectrum Matches* (PSM, Peptid-Spektrum-Übereinstimmungen) relevant. PSMs sind die erhaltenen Übereinstimmungen zwischen theoretischen und experimentellen Spektren, welche durch Suchalgorithmen wie beispielsweise Sequest zugeordnet werden konnten. Entgegen der Peptid-Anzahl werden hierbei auch redundant identifizierte Peptide berücksichtigt. Zwei der vier diskutierten Proteine, Calnexin und Stomatin, wurden mit nur einem Peptid basierend auf einem PSM identifiziert (Tab. 5.3). Für das identifizierte Peptid von TOM40 wurden innerhalb der APOE3 transfizierten Huh7-Zellen drei PSMs zugeordnet, während die Peptide von VDAC1 in beiden Zuständen mit sechs PSMs erhalten wurden.

Durch die in den MD-Experimenten identifizierten Peptide wurde eine Proteinsequenzabdeckung zwischen 5-17 % erzielt. Trotz der deutlich höheren Sequenzabdeckungen zwischen 10-64 % durch die identifizierten Peptide der Co-IP/BU-Analysen konnten durch die MD-Analysen hierdurch nicht abgedeckte Sequenzbereiche der vier Proteine beobachtet werden (Abb. 5.6). Beispielsweise konnte ein Bereich im N-terminalen Teil des Proteins TOM40 und im C-terminalen Teil von STOM durch die identifizierten MD-Peptide abgedeckt werden, welcher aufgrund der fehlenden Arginin- und Lysinreste der Sequenz nicht innerhalb der BU-Analysen beobachtet werden konnten. Trotz potentieller tryptischer Spaltstellen in der N-terminalen Sequenz von VDAC1 konnte dieser Teil der Sequenz nur durch die identifizierten MD-Peptide abgedeckt werden.

Die bislang publizierten MS-basierten Untersuchungen von Protein-Protein-Interaktionen wurden nach aktuellem Kenntnisstand alleinig mit *Bottom-Up*-Methodiken durchgeführt. Infolge sind beispielsweise für die PPI-Analyse optimierte *Middle-Down*-Protokolle oder Methodik-Vergleiche nach durchgeführter Co-IP

### CANX, P27824

MEGKWLCLMLLVLTGTAIVEAHDGHDDDDVIDIEDDLDDVIEEVEDSKPDTTAPPSSPKVITYK  
APVPTGEVYFADSFDRGTLSGWILSKAKKDDTDDEIAKYDGKWEVEEMKESKLPDGLV  
MSRAKHHAISAKLNKPFLLFDTKPLIVQYEVNFQNGIECGGAYVKLLSKTPELNLDQFHDKT  
PYTIMFGPDKCGEDYKLHFI FRHKNPKTGIYEEKHAKRPDADLKTYFTDKKTHLYTLILNP  
DNSFEILVDQSVVNSGNLLNDMTTPPVNPSREIEDPEDRKPEDWDERPKIPDPEAVKPDDWD  
EDAPAKIPDEEATKPEGWLDDEPEYVPDPDAEKPEDWDEDMDGEWEAPQIANPRCESAPGC  
GVWQRPVIDNPNYKKGWKPPMIDNPSYQGIWKPRKIPNPDFFEDLEPFRMTPFSAIGLELW  
SMTSDIFFDNFIICADRRIVDDWANDGWGLKKAADGAAEPGVVGQMIEAAEERPWLWVYI  
LTVALPVFLVILFCCSGKKQTSMEYKKTDAQPDPVKEEEEEKEEEKDKGDEEEEGEEKLE  
EKQKSDAEEDGGTVSQEEEDRKPKAEDEILNRSRNRKPRRE

### TOM40, O96008

MGNVLAASSPPAGPPPPAPALVGLPPPPSPPGFTLPPLGGSLGAGTSTSRSSERTPGAA  
TASASGAAEDGACGCLPNPGTFEECHRKCKELFPIQMEGVKLTVNKGLSNHFQVNHTVALS  
TIGESNYHFVTVYVGTKQLSPTEAFPVLVGDMNSGSLNAQVIHQLGPLRSKMAIQTTQQS  
KFVNWQVDGEYRGSDFTAAVTLGNPDVLVSGILVAHYLQSITPCLALGGELVYHRRPGEE  
GTVMSLAGKYTLNNWLATVTLGQAGMHATYYHKASDQLQVGVEFEASTRMQDTSVSFGYQL  
DLPKANLLFKGSVDSNWIVGATLEKKLPPLPLTLALGAFLNHRKNKFQCGFGLTIG

### STOM, P27105

MAEKRHTRDSEAQRLPDSFKDSPSKGLGPCGWILVAFSFLFTVITFPISIWMCIKIKEYE  
RAIIFRLGRILQGGAAGPGLFFILPCTDSFIKVD MRTISFDIPPQEILTKDSVTISVDGVV  
YYRVQNATLAVANITNADSATRLLAQTTLRNVLGTKNLSQILSDREEIAHNMQSTLDDATD  
AWGIKVERVEIKDVKLVPVQLQRAMAAEASREARAKVIAAEGEMNASRALKEASMVITES  
PAALQLRYLQTLTTIAAEKNSTIVFPLPIDMLQGIIGAKHSHLG

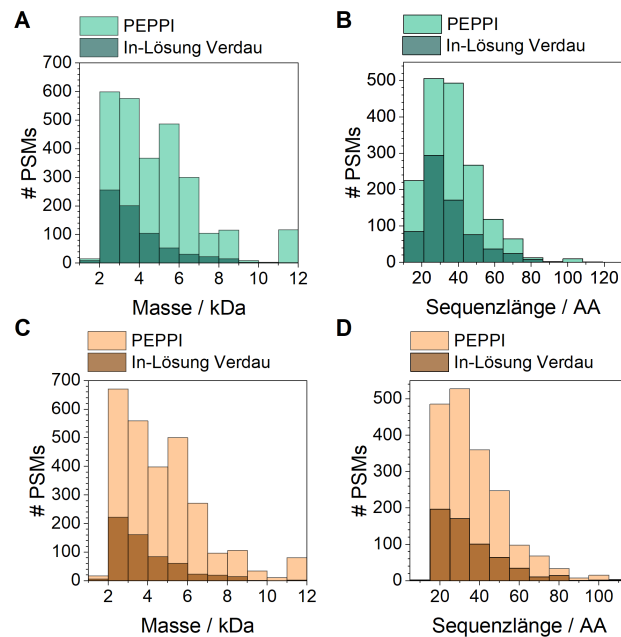
### VDAC1, P21796

MAVPPTYADLGKSARDVFTKGYGFGLIKLDLKTSENGLEFTSSGSANTEETTKVTGSLETK  
YRWTEYGLTFTEKWNTDNTLGTEITVEDQLARGLKLTDFDSSFSPNTGKNAKIKTGYKREH  
INLGCDMDFDIAGPSIRGALVLGYEGWLAGYQMNMFETAKSRVTQSNFAVGKYKTDEFQLHTN  
VNDGTEFGGSIYQKVNKKLETAVNLAWTAGNSNTRFGIAAKYQIDPDACFSKVNNSSLIG  
LGYTQTLKPGIKLTLSALLDGKNVNAGGHKLGLGLEFQA

**Abbildung 5.6.:** Proteinsequenzen der in den BU- und MD-Ansätzen identifizierten Proteine CANX, TOM40, STOM und VDAC1. Identifizierte Peptide des MD-Ansatz sind in gelb markiert, identifizierte Peptide basierend auf den BU-Ansätzen mit grün unterstrichen. Beide Markierungen umfassen die Peptide, welche in den APOE3 und APOE4 Proben identifiziert wurden.

nicht verfügbar. Nachfolgend wurde ein Vergleich des bereits diskutierten MD „In-Lösungs-Verdaus“ (ILV) mit dem von TAKEMORI *et al.*<sup>[52,203]</sup> entwickelten *Passively Eluting Proteins from Polyacrylamide gels as Intact species for MS* (PEPPI-MS) Ansatzes durchgeführt.

Die durch die PD-Datenbanksuche erhaltenen PSMs-Listen der APOE3 und APOE4 transfizierten Huh7-Zellen wurden nach hohen Konfidenzniveaus gefiltert und die Massen sowie Sequenzlängen der identifizierten Peptide ermittelt (Abb. 5.7).



**Abbildung 5.7.:** Vergleich der Co-IP/MD-Ansätze PEPPI und In-Lösungs-Verdau der APOE3 (A, B) und APOE4 (C, D) transfizierten Huh7-Zellen. Darstellung der beobachteten Peptid-Massen (A, C) und Sequenzlängen (B, D) der identifizierten Peptide basierend auf PSMs. Die Säulendiagramme der Ansätze sind hierbei übereinander gelegt dargestellt.

Innerhalb der APOE3- wie auch der APOE4-Experimente konnten in den PEPPI und ILV-Ansätzen ähnliche Trends der Peptidmassen beobachtet werden (Abb. 5.7 A, C). Die Massen der identifizierten Peptide innerhalb der Ansätze des „In-Lösungs-Verdaus“ weisen jeweils einen kontinuierlichen Abfall der PSMs von kleinen zu großen Massen auf. Während dieser Trend tendenziell auch auf die PEPPI-Experimente zutrifft konnte im Verlauf jedoch ein deutlicher Anstieg der 5 bis 6 kDa schweren Peptide beobachtet werden. Zusätzlich wurden deutlich mehr PSMs, welche den Massenbereich von 11 bis 12 kDa abdecken, in den PEPPI-Ansätzen identifiziert. Dies spiegelt sich in der durchschnittlichen Peptid-Masse wider. In den PEPPI-Ansätzen betrug diese 4,1 kDa, innerhalb der ILV-Ansätze hingegen nur 3,8 kDa. Da die Masse und Sequenzlänge korrelieren konnte analog eine um 2 Aminosäuren (*amino acids*, AA) kürzere durchschnittliche Sequenzlänge der ILV-Ansätze erhalten werden (36,5 vs. 34,5 AA). Während in beiden Ansätzen

ebenfalls Peptide über 100 AA Länge beobachtet werden konnten, ist die Anzahl innerhalb der PEPPI-Ansätze deutlich höher. Besonders interessant bei Vergleich beider Ansätze innerhalb eines Experimentes (APOE3 bzw. APOE4) ist die deutlich höhere Anzahl ermittelter PSMs des PEPPI-Ansatzes. Dies ist bemerkenswert, da die eingesetzte Proteinmenge lediglich rund ein Drittel der ILV-Ansätze betrug. Bei direktem Vergleich der Anzahl der identifizierten Proteine, PSMs und Peptide wird ersichtlich, dass in beiden biologischen Zuständen die PEPPI-MS Methode deutlich mehr Identifizierungen erzielte (Tab. 5.4). Durchschnittlich wurden rund 41 % weniger Proteine, 64 % weniger PSMs und 48 % weniger Peptide innerhalb des ILV-Ansatzes vergleichend zur PEPPI-MS Methodik identifiziert.

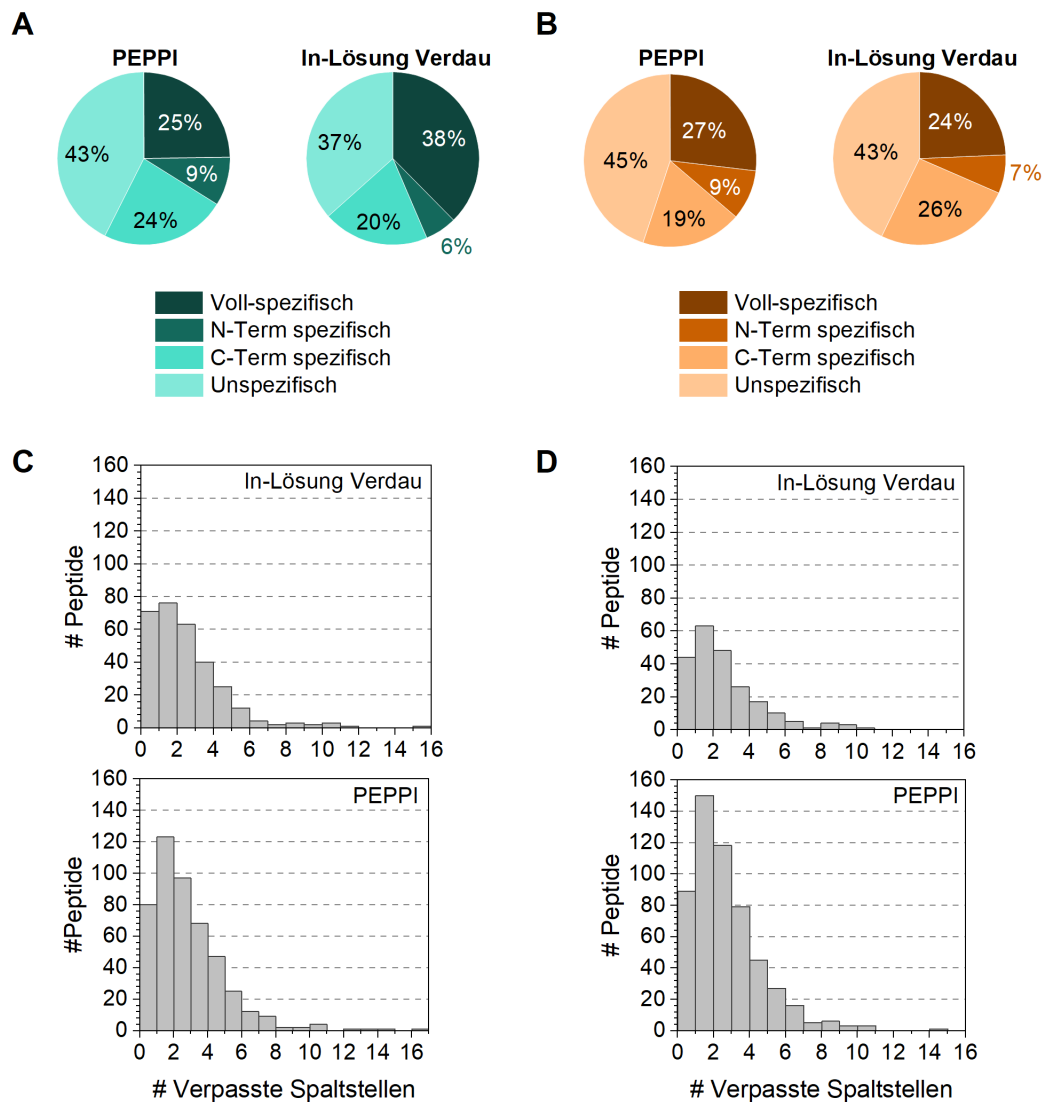
**Tabelle 5.4.:** Identifizierte Proteine, PSMs und Peptide der Co-IP/MD-Experimente der APOE3 und APOE4 transfizierten Huh7-Zellen. Vergleich zwischen den MD-Methodiken "In-Lösungs-Verdau," (ILV) und PEPPI-MS.

	APOE3		APOE4	
	ILV	PEPPI	ILV	PEPPI
# <b>Proteine</b>	217	322	183	351
# <b>PSMs</b>	703	1703	601	1848
# <b>Peptide</b>	303	473	222	543

Zusätzlich wurden die N- sowie C-terminalen Spaltmuster der identifizierten, Glu-C verdauten Peptide bestimmt (Abb. 5.8 A, B). Interessanterweise waren lediglich 24-38 % der identifizierten Peptide voll-spezifisch (d.h. N- und C-Term können durch Glu-C Spaltspezifität erklärt werden) und 26-33 % semi-spezifisch. Der größte Peptid-Anteil mit 37-45 % wiesen unspezifische N- und C-terminale Spaltmuster auf. Die Analysen der C-terminalen Spaltmuster aller durchgeführten Experimente zeigten jedoch keine Anhäufung bestimmter Aminosäuren an den identifizierten Peptid C-Termini (Abb. A.9, A.10). Dies könnte auf das Vorhandensein anderer aktiver Proteasen in der Probe hindeuten, um dies zu verhindern wurden den Zelllysaten allerdings Inhibitoren zugefügt.<sup>[262]</sup>

Hingegen konnte gezeigt werden, dass der Glu-C Verdau für die Generierung von Peptiden der *Middle-Down*-Analyse erfolgreich war (Abb. 5.8 C, D). Mehr als 51 % der identifizierten Peptide wiesen mindestens zwei verpasste Spaltstellen und über 30 % mehr als drei auf.

Mit diesem Methodenvergleich konnten die Ergebnisse von TAKEMORI *et al.*<sup>[52]</sup> bestätigt werden, dass der PEPPI-Ansatz in der Generierung von längeren Peptiden sowie der Anzahl der identifizierten Proteine und PSMs eine bessere Grundlage für Optimierungen im Bereich der MD-MS basierten Analyse unter anderem von Protein-Protein-Interaktionen bietet. Für die weitergehende Analyse des PEPPI-Ansatzes in Zusammenhang mit der Identifizierung von APOE Interaktionspartner



**Abbildung 5.8.:** Spaltspezifität der Glu-C verdauten Peptide der Co-IP/MS-Experimente. Diagramme der Peptid Spaltspezifität der APOE3 (A) bzw. APOE4 (B) Experimente, jeweils dargestellt für den PEPPI und „In-Lösungs-Verdau“ Ansatz. Spaltspezifitäten: Voll-spezifisch - N- und C-Terminus sind durch Glu-C Spaltspezifität erklärbar; N-Term / C-Term spezifisch: lediglich N- bzw. C-Terminus können durch Glu-C erklärt werden; Unspezifisch: weder N- noch C-Terminus können durch Glu-C Spezifität erklärt werden. Anzahl der verpassten Glutamat-Spaltstellen der MD-Peptide der APOE3 (C) bzw. APOE4 (D) Experimente.

wurden analog zum ILV-Ansatz die Proteinlisten der APOE3- und APOE4-Proben gefiltert. Aus diesen Proteinlisten wurden jene Proteine entfernt, welche innerhalb der negativ Kontrollen identifiziert wurden. Für die Minimierung von unspezifischen Bindungen wurden nur Proteine berücksichtigt, welche in den APOE3- sowie APOE4-Proben beobachtet wurden. Die resultierende Proteinliste beinhaltet 77 potentielle APOE Interaktionspartner (Tab. A.18). Entgegen des ILV-Ansatzes konnte jedoch keine Überschneidung mit den identifizierten Proteinen der *Bottom-Up*-Analyse (Kap. 5.3.1) beobachtet werden. Interessanterweise wurde auch keine Überschneidung mit der Proteinliste des MD „In-Lösungs-Verdau“-Ansatzes erhalten. Eine mögliche Begründung könnte die hohe dynamische Natur der Protein-Protein-Interaktionen darstellen. Während die BUP-Experimente und die ILV-Ansätze Analysen basierend auf der gleichen Zellkultur und durchgeführten Co-Immunpräzipitate waren, wurden für die PEPPI-Ansätze neue Huh7-Zellen transfiziert und kultiviert. In weitergehenden Experimenten müsste diese Hypothese überprüft werden.

## 5.4 Ausblick

Die durchgeführten Analysen zur Identifizierung von APOE Interaktionspartnern durch die Co-IP-Methode und nachfolgender *Bottom-Up*- beziehungsweise *Middle-Down*-MS Analysen lieferten neue biologische und methodische Informationen. Fünf bislang vollständig unbekannte potentielle APOE Interaktionspartner (SURF4, VDAC2, STOM, CKAP4, PGRMC1) konnten identifiziert werden. Erstmals konnte zudem die potentielle Interaktion zwischen APOE und TOM40 auf Proteinebene in einer funktionellen Studie nachgewiesen werden, wodurch die bislang ungeklärte Translokation des Sekretionsproteins APOE in das Mitochondrium erklärt werden könnte. Diese Hypothese sowie die Interaktion müssen allerdings durch weitere unabhängige Experimente, beispielsweise Western-Blots oder *Proximity Ligation Assays*, untersucht werden. Die deutlich beobachtete Assoziation von Apolipoprotein E mit mitochondrialen Proteinen wie LONP1 oder der VDAC-Familie könnte weitergehend durch die PPI-Analysen von subzellulär fraktionierten Zellen, insbesondere dem Mitochondrium, untersucht werden. Die Aufklärung des Ausmaßes der Assoziation zwischen APOE und dem Mitochondrium sowie der Einfluss von APOE auf mitochondriale Funktionen könnte entscheidende Informationen zu den Funktionen von APOE abseits des Lipidstoffwechsels liefern. Da APOE beziehungsweise speziell die Isoform APOE4 als ein Risikofaktor der Alzheimer Erkrankung gilt, bezieht sich ein Großteil der aktuellen Studienlage zu mitochondrialen Effek-



ten auf Analysen von Gehirngewebe oder neuronalen Zellen.<sup>[185]</sup> Apolipoprotein E kann die Blut-Hirn-Schranke nicht passieren, daher muss in Kontext zu Abundanzen und PTMs zwischen peripherem und „Gehirn-APOE“ unterschieden werden. Von besonderem Interesse könnte daher auch eine vergleichende *in vivo* APOE-PPI-Analyse zwischen neuronalen Zellen und verschiedenen peripher-vorkommenden Zellen sein.

Die durchgeführten Co-IP-*Middle-Down* Analysen zeigen das Potential der PEPPI-Methodik für die weitere Analyse der identifizierten APOE Interaktionspartner. Gezielte, individuelle Optimierung dieser Protokolle können den Informationsgehalt deutlich steigern und wichtige Informationen über die posttranslationalen Modifikationen der Interaktionspartner und APOE liefern. Hierdurch könnten unter anderem Rückschlüsse auf die Art der PPI (direkte oder indirekte Interaktionen) gezogen werden. Eine Optimierung der Bedingungen der Co-IP und der Lyse müsste überprüft werden, um die Anzahl der unspezifisch gespaltenen Peptide zu minimieren. Verkürzte Inkubationszeiten mit Glu-C der PEPPI-Methode könnten beispielsweise zu größeren Peptiden mit durchschnittlich 5 kDa führen.<sup>[52]</sup> Dies würde die Sequenzabdeckung erhöhen und die Identifizierung von PTMs erleichtern. Die Verwendung anderer Proteasen beispielsweise der *outer membrane protease T* (OmpT), welche nach Wu *et al.*<sup>[263]</sup> durchschnittliche MD-Peptide von 6,3 kDa produziert, könnten ebenso getestet werden.

In dem in dieser Arbeit durchgeführten Methodenvergleich konnte zwischen den identifizierten potentiellen APOE Interaktionspartnern der BU-Analyse und der MD-*In-Lösungs-Verdau*-Analyse nur eine geringe Überschneidung von vier Proteinen beobachtet werden. Bei Vergleich mit der MD-PEPPI-Analyse, bei welcher Proben basierend auf einer neuen Zellkultur und durchgeführten Co-IP genutzt wurden, trat keine Überschneidung der identifizierten Proteine mit dem BU- oder dem MD-ILV-Ansatz auf. In weiterführenden Experimenten könnte untersucht werden in wie weit die hohe Dynamik der Protein-Protein-Interaktionen an diesen Ergebnissen beteiligt ist. Da über die hier durchgeführten Methodiken keine Aussagen über die Stabilität beziehungsweise Lebensdauer der Interaktionen (transient oder permanent) getroffen werden können, könnten beispielsweise Untersuchungen mittels *transient Isotopic Differentiation of Interactions as Random or Targeted* (transient I-DIRT) durchgeführt werden.<sup>[191,264]</sup> In dieser Strategie werden Isotopenmarkierungen sowie *Cross-linking* in Zellkulturen verwendet um durch eine MS-basierte Auswertung stabile, transiente und unspezifische PPI zu identifizieren.<sup>[264]</sup> Die fehlende Überschneidung der identifizierten Proteine des PEPPI-Ansatzes mit jenen des BU- und MD-ILV-Ansatzes könnte auch auf Problematiken bezüglich der Reproduzierbarkeit der durchgeführten Co-IP zurückzuführen sein. Dies könnte

durch weiterführend vergleichende Experimente zwischen separat durchgeführten Co-IPs überprüft werden. Ebenso könnten neue Co-IP Protokolle beispielsweise von BAYTEK *et al.*<sup>[265]</sup>, welche die Reproduzierbarkeit und Robustheit der Co-IP durch Verwendung der SP3-Strategie verbessern konnten, untersucht werden.

# Zusammenfassende Diskussion und Ausblick

# 6

Die in dieser Arbeit durchgeführten Analysen umfassten die quantitative LC-MS/MS Analyse von verschiedenen Geweben von APOE3 bzw. APOE4 produzierenden Mäusen bei unterschiedlicher Ernährungsform, die qualitativen N-Terminomik Untersuchungen von Lebergewebe von APOE TR Mäusen bei unterschiedlicher Ernährungsform und die qualitative Analyse von Co-Immunpräzipitaten von APOE3 bzw. APOE4 transfizierten Huh7-Zellen mittels *Bottom-Up* und *Middle-Down* Methodiken.

In den quantitativen Untersuchungen von Leber, Niere und Cortex der *ad libitum* (AL) und *dietary restricted* (DR) ernährten APOE TR Mäusen wurden die Auswirkungen der Ernährungsformen bei gleicher produzierter APOE-Isoform (z.B. 3AL-3DR) sowie die Auswirkungen der APOE-Isoformen bei gleicher zugrundeliegenden Ernährung (z.B. 3AL-4AL) betrachtet. Deutlich konnte gezeigt werden, dass die Proteom-Unterschiede zwischen den Isoformen durch Ernährungsbeschränkung minimiert wurden. Zusätzlich konnte in Leber und Niere gezeigt werden, dass die Ernährungsform stärker die APOE3 exprimierenden Mäuse moduliert. Dieser bei APOE3 vergleichend zu APOE4 Mäusen stärker ausgeprägte Effekt durch fett- und zuckerreiche Ernährung könnte in der effizienteren Verwertung von Nahrungsenergie und Einlagerung von Lipiden in Gewebe von APOE3 begründet liegen.<sup>[266]</sup> HÜBBE *et al.*<sup>[266]</sup> konnten zusätzlich beobachten, dass APOE3 Mäuse ein höheres Körpergewicht unter AL sowie DR Ernährung aufwiesen und die APOE3 AL Mäuse mehr aßen als ihre APOE4 AL Brutgeschwister.<sup>[266,267]</sup> Neben diesen veränderten äußeren biologischen Merkmalen, konnten auch auf molekularer Ebene ein Einfluss auf die Abundanzen von Proteinen des Phospholipid- sowie Lipidstoffwechsel der AL-Mäuse und des Energiestoffwechsel der DR-Mäuse beobachtet werden.

Interessanterweise konnten keine signifikant abundanten Proteine bzw. Proteinmuster, welche charakteristisch für neurodegenerative Erkrankungen wären, in den Cortexgeweben identifiziert werden. Im Gegensatz zu MOSER *et al.*<sup>[268]</sup> konnte keine Korrelation zwischen dem ernährungsinduzierten Übergewicht (AL Ernährung) von APOE4-Mäusen und einer veränderten Alzheimer Pathologie beobachtet werden. Ähnliche Beobachtungen wurden auf Genom-Ebene auch von CHRISTENSEN *et al.*<sup>[269]</sup> gemacht. Da das Geschlecht, beziehungsweise explizit das weibliche Geschlecht, neben APOE4 ein weiterer entscheidender Risikofaktor der Alzhei-

mer Erkrankung darstellt könnte für zukünftige Untersuchungen spezifisch die Auswirkungen der AL-Ernährung und APOE-Isoformen von weiblichen Mäusen analysiert werden.<sup>[148–150]</sup> Für die Analyse der zugrunde liegenden biologischen Mechanismen könnten ebenfalls Gender-vergleichende Proteomanalysen in Abhängigkeit der Ernährungsform äußerst interessant sein.

In den Untersuchungen der Leber konnten in den APOE3 AL-Mäusen Proteine, welche mit NAFLD/NASH assoziiert sind, identifiziert werden. Diese Beobachtungen wurden durch die weiterführenden Analysen von HÜBBE *et al.*<sup>[24]</sup> bestätigt. Für die Aufklärung der Entstehung der Fettlebererkrankung sowie dem Effekt der APOE-Isoformen hierzu könnten die Analysen unterschiedlich alter APOE TR Mäuse nützlich sein. Hierbei könnten insbesondere die Änderung der Abundanzen der in dieser Thesis identifizierten und in Assoziation zu der Fettlebererkrankung stehenden Cytochrom P450 Proteine, Keratin 8 und 18 sowie Vimentin beobachtet werden.

Für das vollständige Verständnis der molekularen Mechanismen in gesunden sowie pathologischen Zellen bzw. Organismen sind, neben der Identifizierung von differenziell abundanten Proteinen und Proteinmustern in Abhängigkeit der APOE3- und APOE4-Zustände, ebenso die *in vivo* generierten Proteoformen entscheidend.<sup>[155,156]</sup> Für die Identifizierung der nativen und neo-N-Termini dieser Proteoformen wurden etablierte N-Terminomik Strategien für die Analyse von Lebergewebe der AL- und DR-ernährten APOE TR Mäuse verwendet. Insgesamt konnten 3113 N-terminale Peptide im Lebergewebe der AL- und 1609 im Gewebe der DR-ernährten Mäuse identifiziert werden. Aufgrund der beobachteten Assoziation des APOE3 AL Zustandes mit NAFLD/NASH innerhalb der quantitativen Untersuchungen wurde spezifisch nach einer möglichen Caspase-Spaltung des Proteins KRT18, einem potentiellen pathologischen Marker für Fettlebererkrankungen, gesucht. Die Caspase-Spaltstelle von KRT18 befindet sich C-terminal des <sup>387</sup>DALD<sup>390</sup> Motives. Die identifizierten N-Termini von KRT18 der 3AL-Mäuse, welche eine leiterähnliche Degradierung erst ab dem Aminosäurerest 394 aufwiesen, und die Ergebnisse der quantitativen Proteomanalysen, in welcher Peptide identifiziert wurden die die Caspase-Spaltstelle überbrücken, deuten jedoch nicht auf eine Caspase-Spaltung von KRT18 hin.

Im Gegensatz zu den DR-Mäusen konnten im Lebergewebe der AL ernährten Mäuse interne APOE N-Termini zwischen den Resten 212–218 identifiziert werden. Dies könnte auf eine proteolytische Prozessierung von APOE in Abhängigkeit der Ernährungsform hinweisen. Da die aktuelle Forschung primär auf die Untersuchung und Identifizierung von APOE Proteoformen im Gehirngewebe bzw. neuronalen Zellen konzentriert ist, könnte die weiterführende Untersuchung dieser internen, ernährungsabhängigen APOE-Proteoformen neue Informationen insbesondere

in Zusammenhang mit Fettlebererkrankungen liefern. Kann diese proteolytische Prozessierung durch unabhängige Studien bestätigt werden, könnte weitergehend ein zeitlicher Zusammenhang zwischen dem Auftreten der verkürzten APOE-Proteoform und dem Auftritt erster Symptomatiken einer Fettlebererkrankung untersucht werden. Hierdurch könnte überprüft werden ob die APOE-Proteoform ein möglicher präsymptomatischer Marker einer NAFLD/NASH Erkrankung ist. In Zusammenhang mit den quantitativen Analysen könnten größer angelegte Multi-Gewebe Ansätze tiefgehendere Informationen des peripheren APOEs, der auftretenden Proteoformen und posttranslationalen Modifikationen vergleichend zu im Gehirn translatierten APOE liefern.

Da rund 80 % der *in vivo* Proteine nicht alleine sondern in Proteinkomplexen agieren ist die Identifizierung von Protein-Protein-Interaktionen essentiell für das Verständnis von Proteinfunktionen. Aus diesem Grund wurden Co-Immunpräzipitationen mit anti-APOE Antikörpern und anschließender *Bottom-Up*- sowie *Middle-Down*-Analysen von APOE3 und APOE4 transfizierten Huh7-Zellen durchgeführt. Mittels BUP konnten 12 potentielle Interaktionspartner von APOE identifiziert werden, wobei fünf bislang vollständig unbekannte PPI darstellten (SURF4, VDAC2, CKAP4, PGRMC1). Durch die bereits zuvor beschriebene Assoziation von APOE mit Mitochondrien war insbesondere die Identifizierung von fünf mitochondrialen Proteinen als potentielle APOE Interaktionspartner interessant.<sup>[74,205,207]</sup> Die Identifizierung des mitochondrialen Kanalproteins TOM40, dessen potentielle Interaktion mit APOE bislang nicht auf Proteinebene beschrieben wurde, könnte entscheidend für die Aufklärung der Translokation von APOE in die Mitochondrien sein. Interessant ist, dass TOM40 auch innerhalb der quantitativen Proteomanalysen der Mausgewebe dieser Arbeit identifiziert wurde und hierbei, analog zu den Untersuchungen in Huh7-Zellen, keine isoformspezifische Abhängigkeit der Abundanz aufwies. Zukünftige Analysen, beispielsweise mit Western-Blots oder *Proximity Ligation Assays*, könnten die Hypothese bezüglich der Translokation von APOE durch TOM40 bekräftigen.

Da die MS-Analytik von Protein-Protein-Interaktionen bislang hauptsächlich auf *Bottom-Up*-Methodiken beruht, wurde ein *Middle-Down*-Methodenvergleich („In-Lösungs-Verdau“ vs. PEPPI) durchgeführt. Hierdurch konnte gezeigt werden, dass der PEPPI-Ansatz, unter anderem in Bezug zu generierten Peptidlängen und Anzahl der Identifizierungen, eine bessere Grundlage für die Optimierung der MD-MS basierten PPI Analysen darstellt. Die Anzahl der identifizierten Peptide mit unspezifischen Spaltmustern könnten durch eine Veränderung der Inkubationszeiten mit Glu-C oder durch Verwendung alternativer Proteasen wie beispielsweise OmpT reduziert werden. Die weiterführende Analyse der zugrundeliegenden Interaktionstypen der PPI durch alternative Methoden (z.B. transient I-DIRT<sup>[264]</sup>) könnte

Rückschlüsse über die tatsächliche Dynamik der identifizierten APOE Interaktionen liefern. Dies würde zudem eine Überprüfung ermöglichen, ob diese Dynamik ein Grund für die geringe Überschneidung der identifizierten Proteine zwischen den BU- und MD-Analysen sein könnte. Durch eine optimierte *Middle-Down*-Analyse könnten wichtige Informationen beispielsweise über posttranslationale Modifikationen, welche unter Umständen relevant für eine Interaktion sein könnten, erhalten werden.

# Literaturverzeichnis

- [1] J. E. Eichner, S. T. Dunn, G. Perveen, D. M. Thompson, K. E. Stewart, B. C. Stroehla, „Apolipoprotein E Polymorphism and Cardiovascular Disease: A HuGE Review“, *American Journal of Epidemiology* **2002**, 155, 487–495.
- [2] R. W. Mahley, „Apolipoprotein E: Cholesterol Transport Protein with Expanding Role in Cell Biology“, *Science* **1988**, 240, 622–630.
- [3] K. H. Weisgraber in *Bd.* 45, **1994**, S. 249–302.
- [4] H. K. Das, J. McPherson, G. A. Bruns, S. K. Karathanasis, J. L. Breslow, „Isolation, characterization, and mapping to chromosome 19 of the human apolipoprotein E gene“, *Journal of Biological Chemistry* **1985**, 260, 6240–6247.
- [5] S. Rall, K. Weisgraber, R. Mahley, „Human Apolipoprotein E - The Complete Amino Acid Sequence“, *The Journal of Biological Chemistry* **1982**, 257, 4171–4178.
- [6] M. Uhlén, E. Björling, C. Agaton et al., „A human protein atlas for normal and cancer tissues based on antibody proteomics“, *Molecular and Cellular Proteomics* **2005**, 4, 1920–1932.
- [7] M. Uhlén, L. Fagerberg, B. M. Hallström et al., „Tissue-based map of the human proteome“, *Science* **2015**, 347, 394–407.
- [8] W. Müller-Esterl, *Biochemie*, Springer Berlin Heidelberg, **2018**.
- [9] J. Chen, Q. Li, J. Wang, C. Frieden, „Topology of human apolipoprotein E3 uniquely regulates its diverse biological functions“, *PNAS* **2011**, 108, 14813–14818.
- [10] K. Garai, B. Baban, C. Frieden, „Dissociation of apolipoprotein e oligomers to monomer is required for high-affinity binding to phospholipid vesicles“, *Biochemistry* **2011**, 50, 2550–2558.
- [11] D. M. Hatters, C. A. Peters-Libeu, K. H. Weisgraber, „Apolipoprotein E structure: insights into function“, *Trends in Biochemical Sciences* **2006**, 31, 445–454.
- [12] C. P. Libeu, S. Lund-Katz, M. C. Phillips et al., „New Insights into the Heparan Sulfate Proteoglycan-binding Activity of Apolipoprotein E“, *Journal of Biological Chemistry* **2001**, 276, 39138–39144.
- [13] R. W. Mahley, S. C. J. Rall, „APOLIPOPROTEIN E: Far More Than a Lipid Transport Protein“, *Annual Review of Genomics and Human Genetics* **2000**, 1, 507–537.
- [14] K. H. Weisgraber, S. C. Rall, R. W. Mahley, „Human E Apoprotein Heterogeneity - Cysteine-Arginine interchanges in the amino acid sequence of the Apo-E isoforms“, *The Journal of Biological Chemistry* **1981**, 256, 9077–9083.

- [15] K. H. Weisgraber, T. L. Innerarity, R. W. Mahley, „Abnormal Lipoprotein Receptor-binding Activity of the Human E Apoprotein due to Cysteine-Arginine Interchange at a Single Site“, *The Journal of Biological Chemistry* **1982**, 257, 2518–2521.
- [16] L.-M. Dong, S. Parkin, S. D. Trakhanov, B. Rupp, T. Simmons, K. S. Arnold, Y. M. Newhouse, T. L. Innerarity, K. H. Weisgraber, „Novel mechanism for defective receptor binding of apolipoprotein E2 in type III hyperlipoproteinemia“, *Nature Structural Biology* **1996**, 3, 718–722.
- [17] L. M. Dong, C. Wilson, M. R. Wardell, T. Simmons, R. W. Mahley, K. H. Weisgraber, D. A. Agard, „Human apolipoprotein E. Role of arginine 61 in mediating the lipoprotein preferences of the E3 and E4 isoforms“, *Journal of Biological Chemistry* **1994**, 269, 22358–22365.
- [18] L. M. Dong, K. H. Weisgraber, „Human apolipoprotein E4 domain interaction. Arginine 61 and glutamic acid 255 interact to direct the preference for very low density lipoproteins“, *Journal of Biological Chemistry* **1996**, 271, 19053–19057.
- [19] D. M. Hatters, M. S. Budamagunta, J. C. Voss, K. H. Weisgraber, „Modulation of apolipoprotein E structure by domain interaction: Differences in lipid-bound and lipid-free forms“, *Journal of Biological Chemistry* **2005**, 280, 34288–34295.
- [20] E. H. Corder, A. M. Saunders, W. J. Strittmatter, D. E. Schmechel, P. C. Gaskell, G. W. Small, A. D. Roses, J. L. Haines, M. A. Pericak-Vance, „Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer’s disease in late onset families“, *Science* **1993**, 261, 921–923.
- [21] M.-S. Tsai, E. G. Tangalos, R. C. Petersen, G. E. Smith, D. J. Schaid, E. Kokmen, R. J. Lvnik, S. N. Thibodeau, „Apolipoprotein E: Risk Factor for Alzheimer Disease“, *Am. J. Hum. Genet* **1994**, 54, 643–649.
- [22] R. Pechlaner, S. Tsimikas, X. Yin et al., „Very-Low-Density Lipoprotein-Associated Apolipoproteins Predict Cardiovascular Events and Are Lowered by Inhibition of APOC-III“, *Journal of the American College of Cardiology* **2017**, 69, 789–800.
- [23] L. Rosvall, D. Rizzuto, H. X. Wang, B. Winblad, C. Graff, L. Fratiglioni, „APOE-related mortality: Effect of dementia, cardiovascular disease and gender“, *Neurobiology of Aging* **2009**, 30, 1545–1551.
- [24] G. Rimbach, P. Huebbe, S. Bilke, J. Rueter, A. Schloesser, G. Campbell, C.-C. Glüer, R. Lucius, C. Röcken, A. Tholey, „Human APOE4 Protects High-Fat and High-Sucrose Diet Fed Targeted Replacement Mice against Fatty Liver Disease Compared to APOE3“, *Aging and Disease* **2024**, 15, 259–281.
- [25] A. Sazci, G. Akpınar, C. Aygun, E. Ergul, O. Senturk, S. Hulagu, „Association of apolipoprotein E polymorphisms in patients with non-alcoholic steatohepatitis“, *Digestive Diseases and Sciences* **2008**, 53, 3218–3224.
- [26] V. C. Wasinger, S. J. Cordwell, A. Cerpa-Poljak, J. X. Yan, A. A. Gooley, M. R. Wilkins, K. L. Williams, I. Humphery-Smith, „Progress with gene-product mapping of the Mollicutes : Mycoplasma genitalium“, *Electrophoresis* **1995**, 16, 1090–1094.



- [27] B. Domon, R. Aebersold, „Mass Spectrometry and Protein Analysis“, *Science* **2006**, 312, 212–217.
- [28] R. J. Beynon, „The dynamics of the proteome: Strategies for measuring protein turnover on a proteome-wide scale“, *Briefings in functional Genomics and Proteomics* **2005**, 3, 382–390.
- [29] T. Kislinger, A. O. Gramolini, „Proteome analysis of mouse model systems: A tool to model human disease and for the investigation of tissue-specific biology“, *Journal of Proteomics* **2010**, 73, 2205–2218.
- [30] A. Tholey, C. Treitz, M. Kussmann, E. Bendixen, S. P. Schrimpf, M. O. Hengartner, „Model organisms proteomics—from holobionts to human nutrition.“, *Proteomics* **2013**, 13, 2537–2541.
- [31] L. Cassidy, A. Tholey, „Model organism proteomics as a tool for the study of host–microbiome interactions“, *Proteomics – Clinical Applications* **2014**, 8, 665–676.
- [32] N. Rosenthal, S. Brown, „The mouse ascending: perspectives for human-disease models“, *Focus on Development and Disease* **2007**, 9, 993–999.
- [33] S. Han, A. Yang, S. Lee, H.-W. Lee, C. B. Park, H.-S. Park, „Expanding the genetic code of *Mus musculus*“, *Nature Communications* **2017**, 8, 14568.
- [34] E. J. Dupree, M. Jayathirtha, H. Yorkey, M. Mihasan, B. A. Petre, C. C. Darie, „A Critical Review of Bottom-Up Proteomics: The Good, the Bad, and the Future of This Field“, *Proteomes* **2020**, 8, 14.
- [35] J. B. Fenn, M. Mann, C. K. Meng, S. F. Wong, C. M. Whitehouse, „Electrospray Ionization for Mass Spectrometry of Large Biomolecules“, *Science* **1989**, 246, 64–71.
- [36] M. Karas, F. Hillenkamp, „Laser Desorption Ionization of Proteins with Molecular Masses Exceeding 10 000 Daltons“, *Analytical Chemistry* **1988**, 60, 2299–2301.
- [37] A. Makarov, „Electrostatic axially harmonic orbital trapping: A high-performance technique of mass analysis“, *Analytical Chemistry* **2000**, 72, 1156–1162.
- [38] A. Makarov, E. Denisov, A. Kholomeev, W. Balschun, O. Lange, K. Strupat, S. Horning, „Performance evaluation of a hybrid linear ion trap/orbitrap mass spectrometer“, *Analytical Chemistry* **2006**, 78, 2113–2120.
- [39] Q. Hu, R. J. Noll, H. Li, A. Makarov, M. Hardman, R. G. Cooks, „The Orbitrap: A new mass spectrometer“, *Journal of Mass Spectrometry* **2005**, 40, 430–443.
- [40] J. H. Gross, *Massenspektrometrie*, Springer Berlin Heidelberg, **2013**.
- [41] A. Michalski, E. Damoc, J.-P. Hauschild, O. Lange, A. Wieghaus, A. Makarov, N. Nagaraj, J. Cox, M. Mann, S. Horning, „Mass Spectrometry-based Proteomics Using Q Exactive, a High-performance Benchtop Quadrupole Orbitrap Mass Spectrometer“, *Molecular and Cellular Proteomics* **2011**, 10, M111.011015.
- [42] S. Eliuk, A. Makarov, „Evolution of Orbitrap Mass Spectrometry Instrumentation“, *Annual Review of Analytical Chemistry* **2015**, 8, 61–80.
- [43] R. M. Miller, L. M. Smith, „Overview and considerations in bottom-up proteomics“, *Analyst* **2022**, 148, 475–486.

- [44] A. D. Catherman, O. S. Skinner, N. L. Kelleher, „Top Down proteomics: Facts and perspectives“, *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2014**, 445, 683–693.
- [45] J. C. Rogers, R. D. Bomgardner in *Bd. 919*, Springer New York LLC, **2016**, S. 43–62.
- [46] J. Z. Kiser, M. Post, B. Wang, M. Miyagi, „Streptomyces erythraeus trypsin for proteomics applications“, *Journal of Proteome Research* **2009**, 8, 1810–1817.
- [47] A. Cristobal, F. Marino, H. Post, H. W. V. D. Toorn, S. Mohammed, A. J. Heck, „Toward an Optimized Workflow for Middle-Down Proteomics“, *Analytical Chemistry* **2017**, 89, 3318–3325.
- [48] L. Tsiatsiani, A. J. Heck, „Proteomics beyond trypsin“, *FEBS Journal* **2015**, 282, 2612–2626.
- [49] T. Huang, J. Wang, W. Yu, Z. He, „Protein inference: a review“, *Briefings in Bioinformatics* **2012**, 13, 586–614.
- [50] N. Siuti, N. L. Kelleher, „Decoding protein modifications using top-down mass spectrometry“, *Nature Methods* **2007**, 4, 817–821.
- [51] J. C. Tran, L. Zamdborg, D. R. Ahlf et al., „Mapping intact protein isoforms in discovery mode using top-down proteomics“, *Nature* **2011**, 480, 254–258.
- [52] A. Takemori, P. T. Kaulich, R. Konno, Y. Kawashima, Y. Hamazaki, A. Hoshino, A. Tholey, N. Takemori, „GeLC-FAIMS-MS workflow for in-depth middle-down proteomics“, *Proteomics* **2024**, 24, 1–11.
- [53] A. J. Forbes, M. T. Mazur, H. M. Patel, C. T. Walsh, N. L. Kelleher, „Toward efficient analysis of >70 kDa proteins with 100 percent sequence coverage“, *Proteomics* **2001**, 1, 927–933.
- [54] S. L. Wu, J. Kim, W. S. Hancock, B. Karger, „Extended Range Proteomic Analysis (ERPA): A new and sensitive LC-MS platform for high sequence coverage of complex proteins with extensive post-translational modifications-comprehensive analysis of beta-casein and Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR)“, *Journal of Proteome Research* **2005**, 4, 1155–1170.
- [55] K. Marcus, M. Eisenacher, B. Sitek, *Quantitative Methods in Proteomics*, Bd. 893, Second, (Hrsg.: K. Marcus, M. Eisenacher, B. Sitek), Springer, **2012**.
- [56] M. Bantscheff, M. Schirle, G. Sweetman, J. Rick, B. Kuster, „Quantitative mass spectrometry in proteomics: A critical review“, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2007**, 389, 1017–1031.
- [57] W. Zhu, J. W. Smith, C.-M. Huang, „Mass Spectrometry-Based Label-Free Quantitative Proteomics“, *Journal of Biomedicine and Biotechnology* **2010**, 2010, 1–6.
- [58] N. Rauniyar, J. R. Yates, „Isobaric Labeling-Based Relative Quantification in Shotgun Proteomics“, *Journal of Proteome Research* **2014**, 13, 5293–5309.
- [59] J. L. Hsu, S. Y. Huang, N. H. Chow, S. H. Chen, „Stable-Isotope Dimethyl Labeling for Quantitative Proteomics“, *Analytical Chemistry* **2003**, 75, 6843–6852.

- [60] S. E. Ong, B. Blagoev, I. Kratchmarova, D. B. Kristensen, H. Steen, A. Pandey, M. Mann, „Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics“, *Molecular and cellular proteomics : MCP* **2002**, 1, 376–386.
- [61] A. Thompson, J. Schaefer, K. Kuhn, S. Kienle, J. Schwarz, G. Schmidt, T. Neumann, C. Hamon, „Tandem mass tags - A novel quantification strategy for comparative analysis of complex protein mixtures by MSMS“, *Analytical Chemistry* **2003**, 75, 1895–1904.
- [62] X. Chen, Y. Sun, T. Zhang, L. Shu, P. Roepstorff, F. Yang, „Quantitative Proteomics Using Isobaric Labeling: A Practical Guide“, *Genomics Proteomics and Bioinformatics* **2021**, 19, 689–706.
- [63] J. Zecha, S. Satpathy, T. Kanashova, S. C. Avanesian, M. H. Kane, K. R. Clauser, P. Mertins, S. A. Carr, B. Kuster, „TMT labeling for the masses: A robust and cost-efficient, in-solution labeling approach“, *Molecular and Cellular Proteomics* **2019**, 18, 1468–1478.
- [64] L. Dayon, A. Hainard, V. Licker, N. Turck, K. Kuhn, D. F. Hochstrasser, P. R. Burkhard, J. C. Sanchez, „Relative quantification of proteins in human cerebrospinal fluids by MS/MS using 6-plex isobaric tags“, *Analytical Chemistry* **2008**, 80, 2921–2931.
- [65] P. L. Ross, Y. N. Huang, J. N. Marchese et al., „Multiplexed protein quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagents“, *Molecular and Cellular Proteomics* **2004**, 3, 1154–1169.
- [66] T. Werner, I. Becher, G. Sweetman, C. Doce, M. M. Savitski, M. Bantscheff, „High-resolution enabled TMT 8-plexing“, *Analytical Chemistry* **2012**, 84, 7188–7194.
- [67] P. Mertins, N. D. Udeshi, K. R. Clauser, D. Mani, J. Patel, S. en Ong, J. D. Jaffe, S. A. Carr, „iTRAQ Labeling is Superior to mTRAQ for Quantitative Global Proteomics and Phosphoproteomics“, *Molecular and Cellular Proteomics* **2012**, 11, M111.014423.
- [68] G. T. Hermanson in *Bd.* 3, Elsevier, **2013**, S. 229–258.
- [69] P. Cuatrecasas, I. Parikh, „Adsorbents for affinity chromatography. Use of N-Hydroxy-succinimide Esters of Agarose“, *Biochemistry* **1972**, 11, 2291–2299.
- [70] P. Anjaneyulu, J. V. Staros, „Reactions of N-hydroxysulfosuccinimide active esters“, *International Journal of Peptide and Protein Research* **1987**, 30, 117–124.
- [71] S. Maedler, C. Bich, D. Touboul, R. Zenobi, „Chemical cross-linking with NHS esters: A systematic study on amino acid reactivities“, *Journal of Mass Spectrometry* **2009**, 44, 694–706.
- [72] B. T. Miller, A. Kurosky, „Elevated intrinsic reactivity of seryl hydroxyl groups within the linear peptide triads His-Xaa-Ser or Ser-Xaa-His“, *Biochemical and Biophysical research communications* **1993**, 196, 461–467.
- [73] A. Schloesser, G. Campbell, C. C. Glüer, G. Rimbach, P. Huebbe, „Restriction on an energy-dense diet improves markers of metabolic health and cellular aging in mice through decreasing hepatic mTOR activity“, *Rejuvenation Research* **2015**, 18, 30–39.

- [74] J. Rueter, G. Rimbach, C. Treitz, A. Schloesser, K. Lüersen, A. Tholey, P. Huebbe, „The mitochondrial BCKD complex interacts with hepatic apolipoprotein E in cultured cells in vitro and mouse livers in vivo“, *Cellular and Molecular Life Sciences* **2023**, *80*, 1–13.
- [75] D. Wessel, U. I. Flügge, „A Method for the Quantitative Recovery of Protein in Dilute Solution in the Presence of Detergents and Lipids“, *Analytical Biochemistry* **1984**, *138*, 141–143.
- [76] D. Botelho, M. J. Wall, D. B. Vieira, S. Fitzsimmons, F. Liu, A. Doucette, „Top-down and bottom-up proteomics of sds-containing solutions following mass-based separation“, *Journal of Proteome Research* **2010**, *9*, 2863–2870.
- [77] N. Delmotte, M. Lasaosa, A. Tholey, E. Heinzle, A. van Dorsselaer, C. G. Huber, „Repeatability of peptide identifications in shotgun proteome analysis employing off-line two-dimensional chromatographic separations and ion-trap MS“, *Journal of Separation Science* **2009**, *32*, 1156–1164.
- [78] A. Bateman, M. J. Martin, S. Orchard et al., „UniProt: the Universal Protein Knowledgebase in 2023“, *Nucleic Acids Research* **2023**, *51*, D523–D531.
- [79] L. Käll, J. D. Canterbury, J. Weston, W. S. Noble, M. J. MacCoss, „Semi-supervised learning for peptide identification from shotgun proteomics datasets“, *Nature Methods* **2007**, *4*, 923–925.
- [80] S. Tyanova, T. Temu, P. Sinitcyn, A. Carlson, M. Y. Hein, T. Geiger, M. Mann, J. Cox, „The Perseus computational platform for comprehensive analysis of (prote)omics data“, *Nature Methods* **2016**, *13*, 731–740.
- [81] J. Cox, M. Mann, „1D and 2D annotation enrichment: a statistical method integrating quantitative proteomics with complementary high-throughput data.“, *BMC bioinformatics* **2012**, *13*, 1–12.
- [82] V. G. Tusher, R. Tibshirani, G. Chu, „Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response“, *PNAS* **2001**, *98*, 5116–5121.
- [83] M. Ashburner, C. A. Ball, J. A. Blake et al., „Gene Ontology: tool for the unification of biology“, *Nature Genetics* **2000**, *25*, 25–29.
- [84] S. Carbon, E. Douglass, B. M. Good et al., „The Gene Ontology resource: Enriching a Gold mine“, *Nucleic Acids Research* **2021**, *49*, D325–D334.
- [85] S. A. Aleksander, J. Balhoff, S. Carbon et al., „The Gene Ontology knowledgebase in 2023“, *GENETICS* **2023**, *224*, (Hrsg.: A Baryshnikova), 1–14.
- [86] M. Kanehisa, Y. Sato, M. Kawashima, M. Furumichi, M. Tanabe, „KEGG as a reference resource for gene and protein annotation“, *Nucleic Acids Research* **2016**, *44*, D457–D462.
- [87] H. Erdjument-Bromage, F. K. Huang, T. A. Neubert in *Bd. 1741*, Humana Press Inc., **2018**, S. 135–149.

- [88] C. Hutchinson-Bunch, J. A. Sanford, J. R. Hansen, M. A. Gritsenko, K. D. Rodland, P. D. Piehowski, W. J. Qian, J. N. Adkins, „Assessment of TMT Labeling Efficiency in Large-Scale Quantitative Proteomics: The Critical Effect of Sample pH“, *ACS Omega* **2021**, 6, 12660–12666.
- [89] M. Creskey, L. Li, Z. Ning, E. E. Fekete, J. Mayne, K. Walker, A. Ampaw, R. Ben, X. Zhang, D. Figey, „An economic and robust TMT labeling approach for high throughput proteomic and metaproteomic analysis“, *Proteomics* **2023**, 23, 1–6.
- [90] A. Hogrebe, L. V. Stechow, D. B. Bekker-Jensen, B. T. Weinert, C. D. Kelstrup, J. V. Olsen, „Benchmarking common quantification strategies for large-scale phosphoproteomics“, *Nature Communications* **2018**, 9, 1045.
- [91] G. Rosenberger, Y. Liu, H. L. Röst et al., „Inference and quantification of peptidoforms in large sample cohorts by SWATH-MS“, *Nature Biotechnology* **2017**, 35, 781–788.
- [92] Y. Liu, „A peptidoform based proteomic strategy for studying functions of post-translational modifications“, *Proteomics* **2022**, 22, 1–7.
- [93] Y. Mao, A. Kleinberg, N. Li, „Isobaric Tandem Mass Tag Multiplexed Post-Translational Modification Quantitation of Biopharmaceuticals by Targeted High-Resolution Mass Spectrometry“, *Analytical Chemistry* **2020**, 92, 9682–9690.
- [94] D. C. Zeldin, „Epoxygenase Pathways of Arachidonic Acid Metabolism“, *Journal of Biological Chemistry* **2001**, 276, 36059–36062.
- [95] Y. Deng, K. N. Theken, C. R. Lee, „Cytochrome P450 epoxygenases, soluble epoxide hydrolase, and the regulation of cardiovascular inflammation“, *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* **2010**, 48, 331–341.
- [96] A. A. Spector, „Arachidonic acid cytochrome P450 epoxygenase pathway“, *Journal of Lipid Research* **2009**, 50, 52–56.
- [97] A. A. Spector, H. Y. Kim, „Cytochrome P450 epoxygenase pathway of polyunsaturated fatty acid metabolism“, *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids* **2015**, 1851, 356–365.
- [98] R. N. Schuck, W. Zha, M. L. Edin et al., „The Cytochrome P450 Epoxygenase Pathway Regulates the Hepatic Inflammatory Response in Fatty Liver Disease“, *PLoS ONE* **2014**, 9, (Hrsg.: H. Guillou), e110162.
- [99] J. E. Park, H. T. Kim, S. Lee, Y. S. Lee, U. K. Choi, J. H. Kang, S. Y. Choi, T. C. Kang, M. S. Choi, O. S. Kwon, „Differential expression of intermediate filaments in the process of developing hepatic steatosis“, *Proteomics* **2011**, 11, 2777–2789.
- [100] S. A. Cheetham, A. L. Smith, S. D. Armstrong, R. J. Beynon, J. L. Hurst, „Limited variation in the major urinary proteins of laboratory mice“, *Physiology and Behavior* **2009**, 96, 253–261.
- [101] K. Giller, P. Huebbe, F. Doering, K. Pallauf, G. Rimbach, „Major urinary protein 5, a scent communication protein, is regulated by dietary restriction and subsequent re-feeding in mice“, *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **2013**, 280, 20130101.

- [102] K. Minta, G. Brinkmalm, S. Janelidze, S. Sjödin, E. Portelius, E. Stomrud, H. Zetterberg, K. Blennow, O. Hansson, U. Andreasson, „Quantification of total apolipoprotein E and its isoforms in cerebrospinal fluid from patients with neurodegenerative diseases“, *Alzheimer's Research and Therapy* **2020**, 12, 19.
- [103] M. Rezeli, H. Zetterberg, K. Blennow, A. Brinkmalm, T. Laurell, O. Hansson, G. Marko-Varga, „Quantification of total apolipoprotein E and its specific isoforms in cerebrospinal fluid and blood in Alzheimer's disease and other neurodegenerative diseases“, *EuPA Open Proteomics* **2015**, 8, 137–143.
- [104] S. Steensels, J. Qiao, Y. Zhang, K. M. Maner-Smith, N. Kika, C. D. Holman, K. E. Corey, W. C. Bracken, E. A. Ortlund, B. A. Ersoy, „Acyl-Coenzyme A Thioesterase 9 Traffics Mitochondrial Short-Chain Fatty Acids Toward De Novo Lipogenesis and Glucose Production in the Liver“, *Hepatology* **2020**, 72, 857–872.
- [105] K. Krause, J. Weiner, S. Hoenes et al., „The Effects of Thyroid Hormones on Gene Expression of Acyl-Coenzyme A Thioesterases in Adipose Tissue and Liver of Mice“, *European Thyroid Journal* **2015**, 4, 59–66.
- [106] V. Tillander, S. E. Alexson, D. E. Cohen, „Deactivating Fatty Acids: Acyl-CoA Thioesterase-Mediated Control of Lipid Metabolism“, *Trends in Endocrinology and Metabolism* **2017**, 28, 473–484.
- [107] Y. Xie, W. Xie, „The role of sulfotransferases in liver diseases“, *Drug Metabolism and Disposition* **2020**, 48, 742–749.
- [108] E. B. Yalcin, V. More, K. L. Neira, Z. J. Lu, N. J. Cherrington, A. L. Slitt, R. S. King, „Downregulation of sulfotransferase expression and activity in diseased human livers“, *Drug Metabolism and Disposition* **2013**, 41, 1642–1650.
- [109] R. N. Hardwick, D. W. Ferreira, V. R. More, A. D. Lake, Z. Lu, J. E. Manautou, A. L. Slitt, N. J. Cherrington, „Altered UDP-glucuronosyltransferase and sulfotransferase expression and function during progressive stages of human nonalcoholic fatty liver diseases“, *Drug Metabolism and Disposition* **2013**, 41, 554–561.
- [110] J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer, *Stryer Biochemie*, **2013**.
- [111] X. Pan, „The Roles of Fatty Acids and Apolipoproteins in the Kidneys“, *Metabolites* **2022**, 12, 462.
- [112] E. Boes, D. Fliser, E. Ritz et al., „Apolipoprotein A-IV predicts progression of chronic kidney disease: The mild to moderate kidney disease study“, *Journal of the American Society of Nephrology* **2006**, 17, 528–536.
- [113] J. Rysz, A. Gluba-Brzózka, M. Rysz-Górzyńska, B. Franczyk, „The Role and Function of HDL in Patients with Chronic Kidney Disease and the Risk of Cardiovascular Disease“, *International Journal of Molecular Sciences* **2020**, 21, 601.
- [114] T. Prokaeva, H. Akar, B. Spencer et al., „Hereditary Renal Amyloidosis Associated With a Novel Apolipoprotein A-II Variant“, *Kidney International Reports* **2017**, 2, 1223–1232.

- [115] Y. Cui, C. Miao, C. Hou, Z. Wang, B. Liu, „Apolipoprotein C1 (APOC1): A Novel Diagnostic and Prognostic Biomarker for Clear Cell Renal Cell Carcinoma“, *Frontiers in Oncology* **2020**, *10*, 1436.
- [116] H. N. Ginsberg, „Lipoprotein Physiology“, *Lipid Disorders* **1998**, *27*, 503–519.
- [117] A. Benigni, M. Morigi, G. Remuzzi, „Kidney regeneration“, *The Lancet* **2010**, *375*, 1310–1317.
- [118] T. Endo, J. Nakamura, Y. Sato et al., „Exploring the origin and limitations of kidney regeneration“, *Journal of Pathology* **2015**, *236*, 251–263.
- [119] M. T. van Ampting, L. M. Loonen, A. J. Schonewille et al., „Intestinally secreted c-type lectin Reg3b attenuates salmonellosis but not listeriosis in mice“, *Infection and Immunity* **2012**, *80*, 1115–1120.
- [120] T. Miki, O. Holsts, W. D. Hardt, „The bactericidal activity of the C-type lectin regIIIbeta against gram-negative bacteria involves binding to lipid A“, *Journal of Biological Chemistry* **2012**, *287*, 34844–34855.
- [121] P. I. Mackenzie, P. A. Gregory, D. A. Gardner-Stephen, R. H. Lewinsky, B. R. Jorgensen, T. Nishiyama, W. Xie, A Radominska-Pandya, „Regulation of UDP Glucuronosyltransferase Genes“, *Current Drug Metabolism* **2003**, *4*, 249–257.
- [122] H. Shiratani, M. Katoh, M. Nakajima, T. Yokoi, „Species differences in UDP-glucuronosyltransferase activities in mice and rats“, *Drug Metabolism and Disposition* **2008**, *36*, 1745–1752.
- [123] B. S. Francisco, E. C. Bretsnyder, R. G. Kranz, „Human mitochondrial holocytochrome c synthase’s heme binding, maturation determinants, and complex formation with cytochrome c“, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2013**, *110*, E788–E797.
- [124] Y. Hu, Y. Zhang, L. Jiang, S. Wang, C. Lei, M. Sun, H. Shu, Y. Liu, „WDFY 1 mediates TLR 3/4 signaling by recruiting TRIF“, *EMBO reports* **2015**, *16*, 447–455.
- [125] R. Nandakumar, S. R. Paludan, „Catching the adaptor— WDFY 1, a new player in the TLR – TRIF pathway“, *EMBO reports* **2015**, *16*, 397–398.
- [126] N. Zhao, Y. Ren, Y. Yamazaki et al., „Alzheimer’s Risk Factors Age, APOE Genotype, and Sex Drive Distinct Molecular Pathways“, *Neuron* **2020**, *106*, 727–742.e6.
- [127] O. Yagensky, M. Kohansal-Nodehi, S. Gunaseelan, T. Rabe, S. Zafar, I. Zerr, W. Härtig, H. Urlaub, J. J. Chua, „Increased expression of heme-binding protein 1 early in Alzheimer’s disease is linked to neurotoxicity“, *eLife* **2019**, *8*, e47498.
- [128] M. Zhuo, „Ionotropic glutamate receptors contribute to pain transmission and chronic pain“, *Neuropharmacology* **2017**, *112*, 228–234.
- [129] J. Lewerenz, P. Maher, „Chronic Glutamate Toxicity in Neurodegenerative Diseases—What is the Evidence?“, *Frontiers in Neuroscience* **2015**, *9*, DOI 10.3389/fnins.2015.00469.

- [130] R. A. Sweet, M. L. MacDonald, C. M. Kirkwood et al., „Apolipoprotein E4 (APOE4) genotype is associated with altered levels of glutamate signaling proteins and synaptic coexpression networks in the prefrontal cortex in mild to moderate Alzheimer disease“, *Molecular and Cellular Proteomics* **2016**, 15, 2252–2262.
- [131] R. Hesse, M. L. Hurtado, R. J. Jackson et al., „Comparative profiling of the synaptic proteome from Alzheimer’s disease patients with focus on the APOE genotype“, *Acta Neuropathologica Communications* **2019**, 7, DOI 10.1186/s40478-019-0847-7.
- [132] A. Aykac, A. Özer Şehirli, „The Role of the SLC Transporters Protein in the Neurodegenerative Disorders“, *Clinical Psychopharmacology and Neuroscience* **2020**, 18, 174–187.
- [133] J. V. Olsen, P. A. Nielsen, J. R. Andersen, M. Mann, J. R. Wiśniewski, „Quantitative proteomic profiling of membrane proteins from the mouse brain cortex, hippocampus, and cerebellum using the HysTag reagent: Mapping of neurotransmitter receptors and ion channels“, *Brain Research* **2007**, 1134, 95–106.
- [134] Y. Zhou, N. C. Danbolt, „GABA and Glutamate Transporters in Brain“, *Frontiers in Endocrinology* **2013**, 4, DOI 10.3389/fendo.2013.00165.
- [135] E. A. Nigg, T. Stearns, „The centrosome cycle: Centriole biogenesis, duplication and inherent asymmetries“, *Nature Cell Biology* **2011**, 13, 1154–1160.
- [136] P. Meraldi, E. A. Nigg, „The centrosome cycle“, *FEBS Letters* **2002**, 521, 9–13.
- [137] G. Werner-Felmayer, G. Golderer, E. R. Werner, „Tetrahydrobiopterin Biosynthesis, Utilization and Pharmacological Effects This review aims to summarize recent developments concerning regulation of H 4-biopterin biosynthetic and regulatory enzymes and pharmacological effects of H 4-biopterin in various conditions“, *Current Drug Metabolism* **2002**, 3, 159–173.
- [138] S. Lund-Katz, M. C. Phillips, „High Density Lipoprotein Structure-Function and Role in Reverse Cholesterol Transport“, *Sub-Cellular Biochemistry* **2010**, 51, 183–227.
- [139] C. R. Clapier, B. R. Cairns, „The biology of chromatin remodeling complexes“, *Annual Review of Biochemistry* **2009**, 78, 273–304.
- [140] J. Cox, M. Mann, „1D and 2D annotation enrichment: a statistical method integrating quantitative proteomics with complementary high-throughput data“, *BMC bioinformatics* **2012**, 13, 1–12.
- [141] C. Dessimoz, N. Skunca, *The Gene Ontology Handbook*, Bd. 1446, (Hrsg.: C. Dessimoz, N. Škunca), Springer New York, **2017**.
- [142] A. Schmidt, I. Forne, A. Imhof, „Bioinformatic analysis of proteomics data“, *BMC systems biology* **2014**, 8, S3.
- [143] A. Tomczak, J. M. Mortensen, R. Winnenburger et al., „Interpretation of biological experiments changes with evolution of the Gene Ontology and its annotations“, *Scientific Reports* **2018**, 8, 5115.



- [144] C. Lahoz, E. J. Schaefer, L. A. Cupples, P. W. F. Wilson, D. Levy, D. Osgood, S. Parpos, J. Pedro-Botet, J. A. Daly, J. M. Ordovas, „Apolipoprotein E genotype and cardiovascular disease in the Framingham Heart Study“, *Atherosclerosis* **2001**, *154*, 529–537.
- [145] J. A. Roberts, V. R. Varma, Y. An et al., „A brain proteomic signature of incipient Alzheimer’s disease in young APOE4 carriers identifies novel drug targets“, *Sci. Adv* **2021**, *7*, 8178.
- [146] E. A. Karavia, D. J. Papachristou, I. Kotsikogianni, I. Giopanou, K. E. Kypreos, „Deficiency in apolipoprotein e has a protective effect on diet-induced nonalcoholic fatty liver disease in mice“, *FEBS Journal* **2011**, *278*, 3119–3129.
- [147] T. Geiger, A. Velic, B. MacEk, E. Lundberg, C. Kampf, N. Nagaraj, M. Uhlen, J. Cox, M. Mann, „Initial quantitative proteomic map of 28 mouse tissues using the SILAC mouse“, *Molecular and Cellular Proteomics* **2013**, *12*, 1709–1722.
- [148] L. A. Farrer, „Effects of age, sex, and ethnicity on the association between apolipoprotein E genotype and Alzheimer disease. A meta-analysis. APOE and Alzheimer Disease Meta Analysis Consortium“, *JAMA: The Journal of the American Medical Association* **1997**, *278*, 1349–1356.
- [149] L. Ungar, A. Altmann, M. D. Greicius, „Apolipoprotein E, gender, and Alzheimer’s disease: An overlooked, but potent and promising interaction“, *Brain Imaging and Behavior* **2014**, *8*, 262–273.
- [150] J. Dai, E. C. Johnson, E. B. Dammer, D. M. Duong, M. Gearing, J. J. Lah, A. I. Levey, T. S. Wingo, N. T. Seyfried, „Effects of APOE genotype on brain proteomic network and cell type changes in alzheimer’s disease“, *Frontiers in Molecular Neuroscience* **2018**, *11*, DOI 10.3389/fnmol.2018.00454.
- [151] R. Aebersold, J. N. Agar, I. J. Amster et al., „How many human proteoforms are there?“, *Nature Chemical Biology* **2018**, *14*, 206–214.
- [152] D. Gawron, K. Gevaert, P. V. Damme, „The proteome under translational control“, *Proteomics* **2014**, *14*, 2647–2662.
- [153] A. Varshavsky, „The N-end rule pathway and regulation by proteolysis“, *Protein Science* **2011**, *20*, 1298–1345.
- [154] R. Wang, Z. Wang, H. Lu, „Separation methods for system-wide profiling of protein terminome“, *Proteomics* **2023**, *23*, DOI 10.1002/pmic.202100374.
- [155] T. Klein, U. Eckhard, A. Dufour, N. Solis, C. M. Overall, „Proteolytic Cleavage—Mechanisms, Function, and “Omic” Approaches for a Near-Ubiquitous Posttranslational Modification“, *Chemical Reviews* **2018**, *118*, 1137–1168.
- [156] H. Wesseling, W. Mair, M. Kumar et al., „Tau PTM Profiles Identify Patient Heterogeneity and Stages of Alzheimer’s Disease“, *Cell* **2020**, *183*, 1699–1713.e13.
- [157] M. Drag, G. S. Salvesen, „Emerging principles in protease-based drug discovery“, *Nature Reviews Drug Discovery* **2010**, *9*, 690–701.

- [158] P. F. Huesgen, P. F. Lange, C. M. Overall, „Ensembles of protein termini and specific proteolytic signatures as candidate biomarkers of disease“, *Proteomics - Clinical Applications* **2014**, 8, 338–350.
- [159] P. Kaushal, C. Lee, „N-terminomics – its past and recent advancements“, *Journal of Proteomics* **2021**, 233, 104089.
- [160] S. Niedermaier, P. F. Huesgen, „Positional proteomics for identification of secreted proteoforms released by site-specific processing of membrane proteins“, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* **2019**, 1867, 140138.
- [161] J. S. Kim, Z. Dai, U. K. Aryal, R. J. Moore, D. G. Camp, S. E. Baker, R. D. Smith, W. J. Qian, „Resin-assisted enrichment of N-terminal peptides for characterizing proteolytic processing“, *Analytical Chemistry* **2013**, 85, 6826–6832.
- [162] A. R. Griswold, P. Cifani, S. D. Rao, A. J. Axelrod, M. M. Miele, R. C. Hendrickson, A. Kentsis, D. A. Bachovchin, „A Chemical Strategy for Protease Substrate Profiling“, *Cell Chemical Biology* **2019**, 26, 901–907.e6.
- [163] S. Gallien, E. Perrodou, C. Carapito, C. Deshayes, J. M. Reytrat, A. V. Dorsselaer, O. Poch, C. Schaeffer, O. Lecompte, „Ortho-proteogenomics: Multiple proteomes investigation through orthology and a new MS-based protocol“, *Genome Research* **2009**, 19, 128–135.
- [164] S. Mahrus, J. C. Trinidad, D. T. Barkan, A. Sali, A. L. Burlingame, J. A. Wells, „Global sequencing of proteolytic cleavage sites in apoptosis by specific labeling of protein N termini“, *Cell* **2008**, 134, 866–876.
- [165] O. Kleifeld, A. Doucet, U. A. D. Keller, A. Prudova, O. Schilling, R. K. Kainthan, A. E. Starr, L. J. Foster, J. N. Kizhakkedathu, C. M. Overall, „Isotopic labeling of terminal amines in complex samples identifies protein N-termini and protease cleavage products“, *Nature Biotechnology* **2010**, 28, 281–288.
- [166] A. Staes, P. V. Damme, K. Helsens, H. Demol, J. Vandekerckhove, K. Gevaert, „Improved recovery of proteome-informative, protein N-terminal peptides by combined fractional diagonal chromatography (COFRADIC)“, *Proteomics* **2008**, 8, 1362–1370.
- [167] Z. W. Lai, A. Gomez-Auli, E. J. Keller, B. Mayer, M. L. Biniossek, O. Schilling, „Enrichment of protein N-termini by charge reversal of internal peptides“, *Proteomics* **2015**, 15, 2470–2478.
- [168] L. Chen, Y. Shan, Y. Weng, Z. Sui, X. Zhang, Z. Liang, L. Zhang, Y. Zhang, „Hydrophobic Tagging-Assisted N-Termini Enrichment for In-Depth N-Terminome Analysis“, *Analytical Chemistry* **2016**, 88, 8390–8395.
- [169] S. S. Weng, F. Demir, E. K. Ergin, S. Dirnberger, A. Uzozie, D. Tuscher, L. Nierves, J. Tsui, P. F. Huesgen, P. F. Lange, „Sensitive determination of proteolytic proteoforms in limited microscale proteome samples“, *Molecular and Cellular Proteomics* **2019**, 18, 2335–2347.
- [170] B. Meyer, J. Chiaravalli, S. Gellenoncourt et al., „Characterising proteolysis during SARS-CoV-2 infection identifies viral cleavage sites and cellular targets with therapeutic potential“, *Nature Communications* **2021**, 12, 5553.

- [171] B. Meyer, J. Chiaravalli, P. Brownridge, D. P. Bryne, L. A. Daly, F. A. Id, C. E. Eyers, P. A. Eyers, M. Vignuzzi, E. Emmott, „Characterisation of protease activity during SARS-CoV-2 infection identifies novel viral cleavage sites and cellular targets for drug repurposing“, *bioRxiv* **2021**, DOI 10.1101/2020.09.16.297945.
- [172] C. S. Hughes, S. Moggridge, T. Müller, P. H. Sorensen, G. B. Morin, J. Krijgsveld, „Single-pot, solid-phase-enhanced sample preparation for proteomics experiments“, *Nature Protocols* **2019**, 14, 68–85.
- [173] D. Yu, Z. Wang, K. A. Cupp-Sutton, Y. Guo, Q. Kou, K. Smith, X. Liu, S. Wu, „Quantitative Top-Down Proteomics in Complex Samples Using Protein-Level Tandem Mass Tag Labeling“, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2021**, DOI 10.1021/jasms.0c00464.
- [174] Y. Guo, D. Yu, K. A. Cupp-Sutton, X. Liu, S. Wu, „Optimization of protein-level tandem mass tag (TMT) labeling conditions in complex samples with top-down proteomics“, *Analytica Chimica Acta* **2022**, 1221, 340037.
- [175] N. Colaert, K. Helsens, L. Martens, J. Vandekerckhove, K. Gevaert, „Improved visualization of protein consensus sequences by iceLogo“, *Nature Methods* **2009**, 6, 786–787.
- [176] F. M. Harris, W. J. Brecht, Q. Xu et al., „Carboxyl-terminal-truncated apolipoprotein E4 causes Alzheimer’s disease-like neurodegeneration and behavioral deficits in transgenic mice“, *PNAS* **2003**, 100, 10966–10971.
- [177] W. J. Brecht, F. M. Harris, S. Chang et al., „Neuron-Specific Apolipoprotein E4 Proteolysis Is Associated with Increased Tau Phosphorylation in Brains of Transgenic Mice“, *Journal of Neuroscience* **2004**, 24, 2527–2534.
- [178] T. Nakamura, A. Watanabe, T. Fujino, T. Hosono, M. Michikawa, „Apolipoprotein E4 (1–272) fragment is associated with mitochondrial proteins and affects mitochondrial function in neuronal cells“, *Molecular Neurodegeneration* **2009**, 4, 35.
- [179] M. H. Farkas, K. H. Weisgraber, V. L. Shepherd, M. F. Linton, S. Fazio, L. L. Swift, „The recycling of apolipoprotein E and its amino-terminal 22 kDa fragment: Evidence for multiple redundant pathways“, *Journal of Lipid Research* **2004**, 45, 1546–1554.
- [180] N. D. Rawlings, A. J. Barrett, P. D. Thomas, X. Huang, A. Bateman, R. D. Finn, „The MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors in 2017 and a comparison with peptidases in the PANTHER database“, *Nucleic Acids Research* **2018**, 46, D624–D632.
- [181] T. Schmidt, P. Samaras, M. Frejno et al., „ProteomicsDB“, *Nucleic Acids Research* **2018**, 46, D1271–D1281.
- [182] K. E. Kypreos, K. W. V. Dijk, A. V. D. Zee, L. M. Havekes, V. I. Zannis, „Domains of apolipoprotein E contributing to triglyceride and cholesterol homeostasis in vivo. Carboxyl-terminal region 203–299 promotes hepatic very low density lipoprotein-triglyceride secretion“, *Journal of Biological Chemistry* **2001**, 276, 19778–19786.

- [183] A. Wieckowska, N. N. Zein, L. M. Yerian, A. R. Lopez, A. J. McCullough, A. E. Feldstein, „In vivo assessment of liver cell apoptosis as a novel biomarker of disease severity in nonalcoholic fatty liver disease“, *Hepatology* **2006**, 44, 27–33.
- [184] S. Mueller, P. Nahon, V. Rausch et al., „Caspase-Cleaved Keratin-18 Fragments Increase During Alcohol Withdrawal and Predict Liver-Related Death in Patients With Alcoholic Liver Disease“, *Hepatology* **2017**, 66, 96–107.
- [185] J. Rueter, G. Rimbach, P. Huebbe, „Functional diversity of apolipoprotein E: from subcellular localization to mitochondrial function“, *Cellular and Molecular Life Sciences* **2022**, 79, 499.
- [186] K. Winkels, T. Koudelka, P. T. Kaulich, M. Leippe, A. Tholey, „Validation of Top-Down Proteomics Data by Bottom-Up-Based N-Terminomics Reveals Pitfalls in Top-Down-Based Terminomics Workflows“, *Journal of Proteome Research* **2022**, 21, 2185–2196.
- [187] M. Yanagida, „Functional proteomics; current achievements“, *Journal of Chromatography B* **2002**, 89–106.
- [188] T. Berggård, S. Linse, P. James, „Methods for the detection and analysis of protein-protein interactions“, *Proteomics* **2007**, 7, 2833–2842.
- [189] O. Keskin, A. Gursoy, B. Ma, R. Nussinov, „Principles of Protein-Protein Interactions: What are the Preferred Ways For Proteins To Interact?“, *Chemical Reviews* **2008**, 108, 1225–1244.
- [190] M. P. H. Stumpf, T. Thorne, E. de Silva, R. Stewart, H. J. An, M. Lappe, C. Wiuf, „Estimating the size of the human interactome“, *PNAS* **2008**, 105, 6959–6964.
- [191] S. E. A. Ozbabacan, H. B. Engin, A. Gursoy, O. Keskin, „Transient proteinprotein interactions“, *Protein Engineering Design and Selection* **2011**, 24, 635–648.
- [192] T. Y. Low, S. E. Syafruddin, M. A. Mohtar, A. Vellaichamy, N. S. A. Rahman, Y. F. Pung, C. S. H. Tan, „Recent progress in mass spectrometry-based strategies for elucidating protein–protein interactions“, *Cellular and Molecular Life Sciences* **2021**, 78, 5325–5339.
- [193] Y. V. Miteva, H. G. Budayeva, I. M. Cristea, „Proteomics-based methods for discovery, quantification, and validation of protein-protein interactions“, *Analytical Chemistry* **2013**, 85, 749–768.
- [194] G. Maccarrone, J. J. Bonfiglio, S. Silberstein, C. W. Turck, D. M. de Souza in (Hrsg.: P. C. Guest), Humana Press, **2017**.
- [195] B. Coulombe, „Mapping the disease protein interactome: Toward a molecular medicine gps to accelerate drug and biomarker discovery“, *Journal of Proteome Research* **2011**, 10, 120–125.
- [196] S. Fields, O.-K. Song, „A novel genetic system to detect protein-protein interactions“, *Nature* **1989**, 340, 245–246.
- [197] G. C. Koh, P. Porras, B. Aranda, H. Hermjakob, S. E. Orchard, „Analyzing protein-protein interaction networks“, *Journal of Proteome Research* **2012**, 11, 2014–2031.

- [198] K. D. Pfleger, K. A. Eidne, „Illuminating insights into protein-protein interactions using bioluminescence resonance energy transfer (BRET).“, *Nature methods* **2006**, 3, 165–174.
- [199] K. Markham, Y. Bai, G. Schmitt-Ulms, „Co-immunoprecipitations revisited: An update on experimental concepts and their implementation for sensitive interactome investigations of endogenous proteins“, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2007**, 389, 461–473.
- [200] D. Figeys, L. D. McBroom, M. F. Moran, „Mass spectrometry for the study of protein-protein interactions“, *Methods* **2001**, 24, 230–239.
- [201] R. Oughtred, J. Rust, C. Chang et al., „The BioGRID database: A comprehensive biomedical resource of curated protein, genetic, and chemical interactions“, *Protein Science* **2021**, 30, 187–200.
- [202] A. Takemori, D. S. Butcher, V. M. Harman et al., „PEPPI-MS: Polyacrylamide-Gel-Based Prefractionation for Analysis of Intact Proteoforms and Protein Complexes by Mass Spectrometry“, *Journal of Proteome Research* **2020**, 19, 3779–3791.
- [203] A. Takemori, P. T. Kaulich, L. Cassidy, N. Takemori, A. Tholey, „Size-Based Proteome Fractionation through Polyacrylamide Gel Electrophoresis Combined with LC-FAIMS-MS for In-Depth Top-Down Proteomics“, *Analytical Chemistry* **2022**, 94, 12815–12821.
- [204] M. N. Sabbagh, E. Pope, L. Cordes, J. Shi, B. DeCourt, „Therapeutic considerations for APOE and TOMM40 in Alzheimers disease: A tribute to Allen Roses MD“, *Expert Opinion on Investigational Drugs* **2021**, 30, 39–44.
- [205] E.-G. Lee, L. Leong, S. Chen, J. Tulloch, C.-E. Yu, „Mitochondrial Function-Associated APOE Locus and Its Implication in Alzheimer’s Disease and Aging“, *preprints* **2023**, DOI 10.20944/preprints202304.1128.v1.
- [206] P. Rehling, C. Meisinger, „Proteintransport in Mitochondrien: TOM- und TIM-Komplexe“, *BIOspektrum* **2003**, 9, 460–462.
- [207] R. Hamilton, J. Wong, L. Guo, S. Krisans, R. Havel, „Apolipoprotein E localization in rat hepatocytes by immunogold labeling of cryothin sections“, *Journal of Lipid Research* **1990**, 31, 1589–1603.
- [208] J. E. Vance, „Phospholipid Synthesis in a Membrane Fraction Associated with Mitochondria“, *The Journal of Biological Chemistry* **1990**, 265, 7248–7256.
- [209] E. Schmukler, S. Solomon, S. Simonovitch, Y. Goldshmit, E. Wolfson, D. M. Michaelson, R. Pinkas-Kramarski, „Altered mitochondrial dynamics and function in APOE4-expressing astrocytes“, *Cell Death and Disease* **2020**, 11, 578.
- [210] V. Shoshan-Barmatz, E. N. Maldonado, Y. Krelin, „VDAC1 at the crossroads of cell metabolism, apoptosis and cell stress“, *Cell Stress* **2017**, 1, 11–36.
- [211] N. Wiedemann, N. Pfanner, „Mitochondrial Machineries for Protein Import and Assembly“, *The Annual Review of Biochemistry* **2017**, 86, 685–714.

- [212] A. Bocharova, K. Vagaitseva, A. Marusin, N. Zhukova, I. Zhukova, L. Minaycheva, O. Makeeva, V. Stepanov, „Association and Gene–Gene Interactions Study of Late-Onset Alzheimer’s Disease in the Russian Population“, *Genes* **2021**, 12, 1647.
- [213] L. Licata, L. Briganti, D. Peluso et al., „MINT, the molecular interaction database: 2012 update“, *Nucleic Acids Research* **2012**, 40, D857–D861.
- [214] Z. Tang, Y. Takahashi, H. He, T. Hattori, C. Chen, X. Liang, H. Chen, M. M. Young, H. G. Wang, „TOM40 Targets Atg2 to Mitochondria-Associated ER Membranes for Phagophore Expansion“, *Cell Reports* **2019**, 28, 1744–1757.e5.
- [215] I. Szabb, M. Zoratti, „The mitochondrial permeability transition pore may comprise VDAC molecules I. Binary structure and voltage dependence of the pore“, *FEBS* **1993**, 330, 201–205.
- [216] V. Shoshan-Barmatz, A. Shteinfe-Kuzmine, A. Verma, „VDAC1 at the intersection of cell metabolism, apoptosis, and diseases“, *Biomolecules* **2020**, 10, 1–40.
- [217] W. M. Rosencrans, M. Rajendran, S. M. Bezrukov, T. K. Rostovtseva, „VDAC regulation of mitochondrial calcium flux: From channel biophysics to disease“, *Cell Calcium* **2021**, 94, 102356.
- [218] L. Ellenrieder, M. P. Dieterle, K. N. Doan, C. U. Mårtensson, A. Floerchinger, M. L. Campo, N. Pfanner, T. Becker, „Dual Role of Mitochondrial Porin in Metabolite Transport across the Outer Membrane and Protein Transfer to the Inner Membrane“, *Molecular Cell* **2019**, 73, 1056–1065.e7.
- [219] E. L. Huttlin, L. Ting, R. J. Bruckner et al., „The BioPlex Network: A Systematic Exploration of the Human Interactome“, *Cell* **2015**, 162, 425–440.
- [220] E. L. Huttlin, R. J. Bruckner, J. A. Paulo et al., „Architecture of the human interactome defines protein communities and disease networks“, *Nature* **2017**, 545, 505–509.
- [221] E. L. Huttlin, R. J. Bruckner, J. Navarrete-Perea et al., „Dual proteome-scale networks reveal cell-specific remodeling of the human interactome“, *Cell* **2021**, 184, 3022–3040.e28.
- [222] D. Neumann, J. Bückers, L. Kastrup, S. W. Hell, S. Jakobs, „Two-color STED microscopy reveals different degrees of colocalization between hexokinase-I and the three human VDAC isoforms“, *PMC Biophysics* **2010**, 3.
- [223] A. Messina, S. Reina, F. Guarino, V. D. Pinto, „VDAC isoforms in mammals“, *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* **2012**, 1818, 1466–1476.
- [224] X Xu, W Decker, M. J. Sampson, W. J. Craigen, M Colombini, „Mouse VDAC Isoforms Expressed in Yeast: Channel Properties and Their Roles in Mitochondrial Outer Membrane Permeability“, *Membrane Biology* **1999**, 170, 89–102.
- [225] A. Bezawork-Geleta, E. J. Brodie, D. A. Dougan, K. N. Truscott, „LON is the master protease that protects against protein aggregation in human mitochondria through direct degradation of misfolded proteins.“, *Scientific reports* **2015**, 5, 17397.
- [226] W. Voos, K. Pollecker, „The Mitochondrial Lon Protease: Novel Functions off the Beaten Track?“, *Biomolecules* **2020**, 10, 253.

- [227] D. A. Bota, K. J. Davies, „Mitochondrial Lon protease in human disease and aging: Including an etiologic classification of Lon-related diseases and disorders“, *Free Radical Biology and Medicine* **2016**, *100*, 188–198.
- [228] M. T. Moutaoufik, R. Maly, S. Amin et al., „Rewiring of the Human Mitochondrial Interactome during Neuronal Reprogramming Reveals Regulators of the Respirasome and Neurogenesis“, *iScience* **2019**, *19*, 1114–1132.
- [229] M. Soler-López, A. Zanzoni, R. Lluís, U. Stelzl, P. Aloy, „Interactome mapping suggests new mechanistic details underlying Alzheimer’s disease“, *Genome Research* **2011**, *21*, 364–376.
- [230] L. Ellgaard, N. McCaul, A. Chatsisvili, I. Braakman, „Co- and Post-Translational Protein Folding in the ER“, *Traffic* **2016**, *17*, 615–638.
- [231] T. Paskevicius, R. A. Farraj, M. Michalak, L. B. Agellon, „Calnexin, More Than Just a Molecular Chaperone“, *Cells* **2023**, *12*, 403.
- [232] T. Gutiérrez, H. Qi, M. C. Yap et al., „The ER chaperone calnexin controls mitochondrial positioning and respiration“, *Sci. Signal* **2020**, *13*, 6660.
- [233] C. Myrum, J. Soulé, M. Bittins et al., „Arc interacts with the integral endoplasmic reticulum protein, calnexin“, *Frontiers in Cellular Neuroscience* **2017**, *11*, DOI 10.3389/fncel.2017.00294.
- [234] E. M. Lynes, A. Raturi, M. Shenkman et al., „Palmitoylation is the Switch that Assigns Calnexin to Quality Control or ER Calcium Signaling“, *Journal of Cell Science* **2013**, *126*, 3893–3903.
- [235] B. W. Stewart, B. E. Hepworth-Jones, J. N. Keen, B. C. J. Dash, A. C. Argent, C. M. Casimir, „Isolation of cDNA Coding for an Ubiquitous Membrane Protein Deficient in High Na<sup>+</sup>, Low K<sup>+</sup> Stomatocytic Erythrocytes“, *Blood* **1992**, *79*, 1593–1601.
- [236] L. Lapatsina, J. Brand, K. Poole, O. Daumke, G. R. Lewin, „Stomatin-domain proteins“, *European Journal of Cell Biology* **2012**, *91*, 240–245.
- [237] S. Rungaldier, E. Umlauf, M. Mairhofer, U. Salzer, C. Thiele, R. Prohaska, „Structure-function analysis of human stomatin: A mutation study“, *PLOS ONE* **2017**, *12*, (Hrsg.: I. R. Nabi), e0178646.
- [238] G. W. Stewart, „Stomatin“, *Int. J. Biochem. Cell Biol* **1997**, *29*, 271–274.
- [239] U. Salzer, M. Mairhofer, R. Prohaska, „Stomatin: A New Paradigm of Membrane Organization Emerges“, *Dynamic Cell Biology* **2007**, *1*, 20–33.
- [240] K. Luck, D.-K. Kim, L. Lambourne et al., „A reference map of the human binary protein interactome“, *Nature* **2020**, *580*, 402–408.
- [241] K. Gaus, L. Kritharides, G. Schmitz, A. Boettcher, W. Drobnik, T. Langmann, C. M. Quinn, A. Death, R. T. Dean, W. Jessup, „Apolipoprotein A-1 interaction with plasma membrane lipid rafts controls cholesterol export from macrophages“, *The FASEB journal* **2004**, *18*, 574–576.
- [242] C.-G. Guo, R. Sun, X. Wang et al., „Intestinal SURF4 is essential for apolipoprotein transport and lipoprotein secretion“, *Molecular Metabolism* **2024**, *79*, 101847.

- [243] Y. Shen, H. mei Gu, L. Zhai, B. Wang, S. Qin, D. wei Zhang, „The role of hepatic Surf4 in lipoprotein metabolism and the development of atherosclerosis in apoE-/- mice“, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* **2022**, 1867, 159196.
- [244] B. Wang, Y. Shen, L. Zhai et al., „Atherosclerosis-associated hepatic secretion of VLDL but not PCSK9 is dependent on cargo receptor protein Surf4“, *Journal of Lipid Research* **2021**, 62, 100091.
- [245] Q. Gu, F. Xu, B. O. Orgil et al., „Systemsgeneticsanalysisdefines importance of TMEM43/LUMA for cardiac-and metabolic-related pathways“, *Physiological Genomics* **2022**, 54, 22–35.
- [246] N. Zhang, F. Wang, X. Yang, Q. Wang, R. Chang, L. Zhu, M. A. Feitelson, Z. Chen, „TMEM43 promotes the development of hepatocellular carcinoma by activating VDAC1 through USP7 deubiquitination“, *Translational Gastroenterology and Hepatology* **2024**, 9, 9–9.
- [247] Z. Chen, Z. Cao, F. Gui, M. Zhang, X. Wu, H. Peng, B. Yu, W. Li, F. Ai, J. Zhang, „TMEM43 Protects against Sepsis-Induced Cardiac Injury via Inhibiting Ferroptosis in Mice“, *Cells* **2022**, 11, 2992.
- [248] J. Zhang, X. Dong, T. A. Hacker, Y. Ge, „Deciphering modifications in swine cardiac troponin i by top-down high-resolution tandem mass spectrometry“, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2010**, 21, 940–948.
- [249] C. Barlowe, „ER Sheets Get Roughed Up“, *Cell* **2010**, 143, 665–666.
- [250] S.-X. Li, J. Li, L.-W. Dong, Z.-Y. Guo, „Cytoskeleton-Associated Protein 4, a Promising Biomarker for Tumor Diagnosis and Therapy“, *Frontiers in Molecular Biosciences* **2021**, 7, DOI 10.3389/fmolb.2020.552056.
- [251] D. R. Klopfenstein, F. Kappeler, H.-P. Hauri, „A novel direct interaction of endoplasmic reticulum with microtubules“, *The EMBO Journal* **1998**, 17, 6168–6177.
- [252] T. P. Conrads, G. M. Tocci, B. L. Hood, C.-O. Zhang, L. Guo, K. R. Koch, C. J. Michejda, T. D. Veenstra, S. K. Keay, „CKAP4/p63 Is a Receptor for the Frizzled-8 Protein-related Antiproliferative Factor from Interstitial Cystitis Patients“, *Journal of Biological Chemistry* **2006**, 281, 37836–37843.
- [253] T. M. Razzaq, R. Bass, D. J. Vines, F. Werner, S. A. Whawell, V. Ellis, „Functional Regulation of Tissue Plasminogen Activator on the Surface of Vascular Smooth Muscle Cells by the Type-II Transmembrane Protein p63 (CKAP4)“, *Journal of Biological Chemistry* **2003**, 278, 42679–42685.
- [254] D. Kaluka, D. Batabyal, B.-Y. Chiang, T. L. Poulos, S.-R. Yeh, „Spectroscopic and Mutagenesis Studies of Human PGRMC1“, *Biochemistry* **2015**, 54, 1638–1647.
- [255] R. B. Piel, M. T. Shiferaw, A. A. Vashisht, J. R. Marcero, J. L. Praissman, J. D. Phillips, J. A. Wohlschlegel, A. E. Medlock, „A Novel Role for Progesterone Receptor Membrane Component 1 (PGRMC1): A Partner and Regulator of Ferrochelatase“, *Biochemistry* **2016**, 55, 5204–5217.



- [256] A. L. Hughes, D. W. Powell, M. Bard, J. Eckstein, R. Barbuch, A. J. Link, P. J. Espenshade, „Dap1/PGRMC1 Binds and Regulates Cytochrome P450 Enzymes“, *Cell Metabolism* **2007**, 5, 143–149.
- [257] W. Mifsud, A. Bateman, „Membrane-bound progesterone receptors contain a cytochrome b 5-like ligand-binding domain“, *Genome Biology* **2002**, 3.
- [258] R. A. DeBose-Boyd, „A Helping Hand for Cytochrome P450 Enzymes“, *Cell Metabolism* **2007**, 5, 81–83.
- [259] S. Oda, M. Nakajima, Y. Toyoda, T. Fukami, T. Yokoi, „Progesterone receptor membrane component 1 modulates human cytochrome P450 activities in an isoform-dependent manner“, *Drug Metabolism and Disposition* **2011**, 39, 2057–2065.
- [260] R. Furuhata, Y. Kabe, A. Kanai et al., „Progesterone receptor membrane associated component 1 enhances obesity progression in mice by facilitating lipid accumulation in adipocytes“, *Communications Biology* **2020**, 3, 479.
- [261] C. S. Ryu, K. Klein, U. M. Zanger, Membrane associated progesterone receptors: Promiscuous proteins with pleiotropic functions - Focus on interactions with cytochromes P450, **2017**.
- [262] S. Kö, M. Zeller, J. Peter-Katalinic, J. Roth, C. Sorg, T. Vogl, „Use of Nonspecific Cleavage Products for Protein Sequence Analysis as Shown on Calcyclin Isolated from Human Granulocytes“, **2001**.
- [263] C. Wu, J. C. Tran, L. Zamdborg, K. R. Durbin, M. Li, D. R. Ahlf, B. P. Early, P. M. Thomas, J. V. Sweedler, N. L. Kelleher, „A protease for 'middle-down' proteomics“, *Nature Methods* **2012**, 9, 822–824.
- [264] S. Byrum, S. K. Smart, S. Larson, A. J. Tackett, „Analysis of Stable and Transient Protein–Protein Interactions“, *Methods in Molecular Biology* **2012**, 833, 143–152.
- [265] G. Baytek, O. Popp, P. Mertins, B. Tursun, „Robust co-immunoprecipitation with mass spectrometry for *Caenorhabditis elegans* using solid-phase enhanced sample preparation“, *BioTechniques* **2022**, 72, 175–184.
- [266] P. Huebbe, J. Dose, A. Schloesser et al., „Apolipoprotein E (APOE) genotype regulates body weight and fatty acid utilization—Studies in gene-targeted replacement mice“, *Molecular Nutrition and Food Research* **2015**, 59, 334–343.
- [267] J. M. Arbones-Mainar, L. A. Johnson, M. K. Altenburg, N. Maeda, „Differential modulation of diet-induced obesity and adipocyte functionality by human apolipoprotein E3 and E4 in mice“, *International Journal of Obesity* **2008**, 32, 1595–1605.
- [268] V. A. Moser, C. J. Pike, „Obesity Accelerates Alzheimer-Related Pathology in APOE4 but not APOE3 Mice“, *eneuro* **2017**, 4, ENEURO.0077–17.2017.
- [269] A. Christensen, C. J. Pike, „Effects of APOE Genotype and Western Diet on Metabolic Phenotypes in Female Mice“, *Metabolites* **2023**, 13, 287.



# Abbildungsverzeichnis

1.1	Strukturmodelle des Lipid-freien APOEs. . . . .	2
1.2	MS-basierte Proteomik-Strategien: <i>Bottom-Up</i> , <i>Middle-Down</i> und <i>Top-Down</i> Proteomik. . . . .	7
3.1	Schematischer Ablauf der isobaren Massenmarkierung. . . . .	12
3.2	Chemische Struktur des TMT 6-plex-Reagenz mit den möglichen Positionen der schweren Isotope <sup>13</sup> C und <sup>15</sup> N (blaue Asterisks). . . .	13
3.3	Übersicht der TMT-6plex Experimente. . . . .	16
3.4	LC-Gradient der online <i>low</i> pH HPLC-Fraktionierung. . . . .	18
3.5	Experimentelles Design, TMT-Labeling und Massenspektrometrie Schema der quantitativen Analysen. <i>Erstellt mit Biorender.com</i> . . . .	21
3.6	Qualitätsanalyse TMT-6plex Labeling aller Gewebeexperimente. . .	22
3.7	Darstellung der Experimente mit der <b>A)</b> niedrigsten und <b>B)</b> höchsten Anzahl an Peptidoformen als direkte Folge von Überlabeling. <b>A)</b> Leber 3AL-4AL, <b>B)</b> Cortex 3AL-4AL. . . . .	23
3.8	Volcano-Plots der quantitativen Analyse der Experimente des Lebergewebes. . . . .	24
3.9	GO-Annotationen des Leberexperimentes 3AL-4AL basierend auf dem <i>Fisher's exact test</i> . . . . .	26
3.10	GO-Annotationen der 1D <i>Annotation enrichment</i> -Analyse des 3DR-4DR Leberexperimentes. . . . .	31
3.11	GO-Annotationen der 1D <i>Annotation Enrichment</i> -Analyse des Leberexperimentes 3AL-3DR. . . . .	33
3.12	GO-Annotationen der 1D <i>Annotation Enrichment</i> -Analyse des Leberexperimentes 4AL-4DR. . . . .	35
3.13	Volcano-Plots der quantitativen Analyse der Experimente des Nierengewebes. . . . .	37
3.14	Vergleich der Experimente 3AL-4AL von Nieren- und Lebergeweben und Annotationen des <i>Fisher exact tests</i> des Nierenexperimentes 3AL-4AL. . . . .	39
3.15	Annotationen des Nierenexperiments 3DR-4DR der 1D <i>Annotation Enrichment</i> -Analyse. . . . .	42

3.16	Graphische Darstellung der statistischen Analysen mittels <i>Fisher exact test</i> und 1D <i>Annotation Enrichment</i> des Nierenexperimentes 3AL-3DR. . . . .	45
3.17	GO-Annotationen der 1D <i>Annotation Enrichment</i> -Analyse des Nierenexperimentes 4AL-4DR. . . . .	47
3.18	Volcano-Plots aller quantitativen Cortexexperimente. . . . .	50
3.19	Vergleich der quantifizierten und differenziell abundanten Proteine aller Gewebe. . . . .	51
3.20	GO-Annotationen der 1D <i>Annotation Enrichment</i> -Analyse des Cortexexperimentes 3AL-4AL. . . . .	53
3.21	GO-Annotationen der 1D <i>Annotation Enrichment</i> -Analyse des Cortexexperimentes 3DR-4DR. . . . .	56
3.22	GO-Annotationen der 1D <i>Annotation Enrichment</i> -Analyse des Cortexexperimentes 3AL-3DR. . . . .	57
3.23	GO-Annotationen der 1D <i>Annotation Enrichment</i> -Analyse des Experimentes 4AL-4DR des Cortexgewebes. . . . .	59
3.24	Überschneidung der identifizierten signifikant abundanten Proteine zwischen den analysierten Geweben (Leber, Niere und Cortex). Korrespondierende Venn-Diagramme der Experimente <b>A)</b> 3AL-4AL, <b>B)</b> 3DR-4DR, <b>C)</b> 3AL-3DR und <b>D)</b> 4AL-4DR. . . . .	62
4.1	Schematische Darstellung der positiven und negativen Anreicherungsverfahren für N-terminale Peptide. . . . .	66
4.2	Schematische Darstellung des Ablaufes der TMT-HUNTER-Strategie. . . . .	67
4.3	Experimentelles Design der N-Terminomik Ansätze. . . . .	69
4.4	Qualitätsanalyse der TMT-HUNTER-Ansätze . . . . .	74
4.5	Betrachtung der gelabelten tryptischen und N-terminalen Peptide der TMT-HUNTER Ansätze. . . . .	75
4.6	IceLogo der Spaltstelle zwischen P <sub>1</sub> und P <sub>1</sub> ' der identifizierten N-terminal gelabelten Peptide der TMT-HUNTER Ansätze 3AL-4AL und 3DR-4D. . . . .	76
4.7	N-terminale Peptide von Apolipoprotein E der Analyse des Lebergewebes der AL-Mäuse (3AL-4AL). . . . .	78
4.8	Gemittelte PD-skalierte Intensitäten ( <i>scaled abundances</i> , [w.E.]) der identifizierten APOE-Peptide von 3AL und 4AL Mäusen. . . . .	79
4.9	Identifizierte N-terminale Peptide von Keratin 18 innerhalb der TMT-HUNTER Analyse des Lebergewebes der AL-Mäuse (3AL-4AL). . . . .	81
4.10	Identifizierte N-terminale Peptide von APOE innerhalb der TMT-HUNTER Analyse des Lebergewebes der DR-Mäuse (3DR-4DR). . . . .	82

4.11	Identifizierte N-terminale Peptide von KRT18 innerhalb der TMT-HUNTER Analyse des Lebergewebes der DR-Mäuse (3DR-4DR). . . . .	83
4.12	Qualitätsanalyse des HUNTER-Ansatzes der Lebern von DR-Mäusen. . . . .	84
5.1	Schematische Darstellung des experimentellen Verlaufes einer Co-Immunpräzipitation und massenspektrometrischen Analyse. . . . .	88
5.2	Netzwerk der potentiellen APOE Protein-Protein-Interaktionen. . . . .	90
5.3	Experimentelles Design der Analyse von Protein-Protein Interaktionen mit Apolipoprotein E innerhalb der Huh7-Zellen nach erfolgter Co-Immunopräzipitation mit Anti-APOE Antikörpern. . . . .	97
5.4	Aminosäuresequenz der <i>MAM localization domain</i> (MLD) des <i>Autophagy-related protein 2 homolog A</i> (ATG2A), sowie der <i>Hinge</i> -Region von Apolipoprotein E. Farblich hervorgehoben sind die konservierten Argininreste. . . . .	100
5.5	Proteinsequenzen von VDAC2 (P45880, schwarz) und der Isoform 1 von VDAC2 (P45880-1, blau) unter farblicher Hervorhebung der identischen Aminosäuren (hellgrün). Identifizierte Peptide des Co-IP/BU-MS-Experimentes sind rot umrandet. . . . .	101
5.6	Proteinsequenzen der in den BU- und MD-Ansätzen identifizierten Proteine CANX, TOM40, STOM und VDAC1. . . . .	106
5.7	Vergleich der Co-IP/MD-Ansätze PEPPI und „In-Lösungs-Verdau“, der APOE3 und APOE4 transfizierten Huh7-Zellen. . . . .	107
5.8	Spaltspezifität der Glu-C verdauten Peptide der Co-IP/MS-Experimente. Diagramme der Peptid Spaltspezifität der APOE3 ( <b>A</b> ) bzw. APOE4 ( <b>B</b> ) Experimente, jeweils dargestellt für den PEPPI und „In-Lösungs-Verdau“ Ansatz. Spaltspezifitäten: Voll-spezifisch - N- und C-Terminus sind durch Glu-C Spaltspezifität erklärbar; N-Term / C-Term spezifisch: lediglich N- bzw. C-Terminus können durch Glu-C erklärt werden; Unspezifisch: weder N- noch C-Terminus können durch Glu-C Spezifität erklärt werden. Anzahl der verpassten Glutamat-Spaltstellen der MD-Peptide der APOE3 ( <b>C</b> ) bzw. APOE4 ( <b>D</b> ) Experimente. . . . .	109
A.1	Vergleich der Anzahl der quantifizierten und signifikant abundanten Proteine aller durchgeführten Leberexperimente. . . . .	150
A.2	Gemittelttes Lebergewicht der in dieser Studie verwendeten <i>APOE3</i> - bzw. <i>APOE4</i> - exprimierenden Mäuse unter Angabe des Standardfehlers ( <i>standard error of the mean</i> , SEM). . . . .	150
A.3	Annotationen der 1D <i>Annotation Enrichment</i> -Analyse mit den höchsten Differenzen zum Experiment-Mittelwert. . . . .	157

A.4	Vergleich der Anzahl der quantifizierten gegen die der signifikant abundanter Proteine der Nieren-Experimente. . . . .	161
A.5	Volcano-Plot des TMT-HUNTER Experimentes 3AL-4AL. . . . .	166
A.6	Ausschnitt aus der Proteinsequenz von Keratin 18 (KRT18, P05784). . . . .	166
A.7	Identifizierte Peptide von APOE und KRT18 des HUNTER-Ansatzes der DR-Mäuse. . . . .	170
A.8	Coomassie-gefärbtes SDS-PAGE Gel des Co-IP/PEPPI-MD Experi- mentes. . . . .	171
A.9	IceLogo <sup>[175]</sup> der C-terminalen Spaltspezifität der APOE3 Co-IP/MD- Experimente. . . . .	175
A.10	IceLogo <sup>[175]</sup> der C-terminalen Spaltspezifität der APOE4 Co-IP/MD- Experimente. . . . .	179

# Tabellenverzeichnis

1.1	Tabellarische Auflistung der voneinander abweichenden Aminosäurereste der APOE-Isoformen. . . . .	3
3.1	Verwendete Chemikalien. . . . .	14
3.2	Poolingschema für die offline 1D C18- <i>reverse phase high</i> pH HPLC-Fraktionierung. . . . .	17
3.3	Gewählte MS-Parameter zur Analyse der Maus-Gewebe. . . . .	18
3.4	Identifizierte Peptidoformen des Peptids [R].LHFFMPGFAPLTSR.[G] der LC-MS-Analyse des Experimentes 4AL-4DR Cortexgewebe (Tubulin beta-2A chain, Q7TMM9). . . . .	23
3.5	Der GOBP-Annotationen der APOE4 AL Mäuse zugrunde liegenden signifikant abundante Cytochrome. . . . .	26
3.6	In der GOCC-Annotation <i>intermediate filament</i> (GO:0005882) des Experiments 3AL-4AL involvierte Proteine. . . . .	28
3.7	Differenziell abundante Proteine des Leberexperimentes 3DR-4DR. .	30
3.8	In dem GOCC-Term <i>external side of plasma membrane</i> des <i>Fisher exact tests</i> involvierte signifikant abundante Proteine der 3AL-Mäuse des Leberexperimentes 3AL-3DR. . . . .	32
3.9	Differenziell abundante Proteine des Leberexperimentes 4AL-4DR. .	34
3.10	Der GOCC-Annotation <i>blood microparticle</i> des <i>Fisher exact tests</i> zugrunde liegenden signifikant abundanten 3AL-Proteine des Nierenexperimentes 3AL-4AL. . . . .	40
3.11	Differenziell abundante Proteine des Nierenexperimentes 3DR-4DR.	41
3.12	Differenziell abundante Proteine des Nierenexperimentes 3AL-3DR.	44
3.13	Differenziell abundante Proteine des Nierenexperimentes 4AL-4DR.	46
3.14	Differenziell abundante Proteine des Cortexexperimentes 3AL-4AL.	52
3.15	In die Glutamat-bezogenen Annotationen des Zustandes 3AL involvierte Proteine. . . . .	54
3.16	Die in der GOMF-Annotation <i>organic acid:sodium symporter activity</i> der 1D <i>Annotation Enrichment</i> -Analyse involvierten Proteine des Cortexexperimentes 3AL-3DR. . . . .	58
4.1	Verwendete Chemikalien. . . . .	68

4.2	Vergleich der identifizierten Proteine und Peptide der TMT-HUNTER Ansätze 3AL-4AL und 3DR-4DR. . . . .	82
4.3	Anzahl der identifizierten gelabelten N-terminalen und aller tryptischer Peptide der semi-tryptischen PD-Datenbanksuche. . . . .	85
5.1	Verwendete Chemikalien. . . . .	91
5.2	Potentielle APOE Interaktionspartner der Co-IP/MS-Analyse, welche in den APOE3 und APOE4 transfizierten Huh7-Zellen identifiziert wurden. Angabe der Abundanz-Verhältnisse APOE3 bzw. APOE4 gegen die unbehandelte Kontrolle (K. unbeh.). . . . .	99
5.3	Überschneidung der identifizierten Proteine des BU- und MD-Ansatzes und Angabe der in den MD-Analysen der APOE3 und APOE4 transfizierten Huh7-Zellen beobachteten Anzahl von Peptiden und PSMs. . . . .	105
5.4	Identifizierte Proteine, PSMs und Peptide der Co-IP/MD-Experimente der APOE3 und APOE4 transfizierten Huh7-Zellen. Vergleich zwischen den MD-Methodiken "In-Lösungs-Verdau,, (ILV) und PEPPI-MS. . . . .	108
A.1	Verwendete Geräte. . . . .	149
A.2	Verwendete Software. . . . .	149
A.3	59 Proteine mit höherer Abundanz für APOE4 des Experiments 3AL-4AL. . . . .	151
A.3	Fortsetzung Tabelle: 59 Proteine mit höherer Abundanz für APOE4 des Experiments 3AL-4AL. . . . .	152
A.3	Fortsetzung Tabelle: 59 Proteine mit höherer Abundanz für APOE4 des Experiments 3AL-4AL. . . . .	153
A.4	105 Proteine mit höherer Abundanz für APOE3 des Experiments 3AL-4AL. . . . .	153
A.4	Fortsetzung Tabelle: 105 Proteine mit höherer Abundanz für APOE3 des Experiments 3AL-4AL. . . . .	154
A.4	Fortsetzung Tabelle: 105 Proteine mit höherer Abundanz für APOE3 des Experiments 3AL-4AL. . . . .	155
A.4	Fortsetzung Tabelle: 105 Proteine mit höherer Abundanz für APOE3 des Experiments 3AL-4AL. . . . .	156
A.4	Fortsetzung Tabelle: 105 Proteine mit höherer Abundanz für APOE3 des Experiments 3AL-4AL. . . . .	157
A.5	43 Proteine mit höherer Abundanz für APOE3 AL des Leberexperiments 3AL-3DR. . . . .	158
A.5	Fortsetzung Tabelle: 43 Proteine mit höherer Abundanz für APOE3 AL des Leberexperiments 3AL-3DR. . . . .	159



A.6	17 Proteine mit höherer Abundanz für APOE3 DR des Leberexperiments 3AL-3DR. . . . .	160
A.7	40 Proteine mit höherer Abundanz für ApoE3 AL des Nierenexperiments 3AL-4AL. . . . .	161
A.7	Fortsetzung Tabelle: 40 Proteine mit höherer Abundanz für APOE3 AL des Nierenexperiments 3AL-4AL. Überschneidung mit differenziell abundanten Proteinen des Leberexperimentes 3AL-4AL in blau hervorgehoben . . . . .	162
A.7	Fortsetzung Tabelle: 40 Proteine mit höherer Abundanz für APOE3 AL des Nierenexperiments 3AL-4AL. Überschneidung mit differenziell abundanten Proteinen des Leberexperimentes 3AL-4AL in blau hervorgehoben . . . . .	163
A.8	30 Proteine mit höherer Abundanz für APOE4 AL des Nierenexperiments 3AL-4AL. Überschneidung mit differenziell abundanten Proteinen des Leberexperimentes 3AL-4AL in blau hervorgehoben. .	163
A.8	Fortsetzung Tabelle: 30 Proteine mit höherer Abundanz für APOE4 AL des Nierenexperiments 3AL-4AL. Überschneidung mit differenziell abundanten Proteinen des Leberexperimentes 3AL-4AL in blau hervorgehoben. . . . .	164
A.9	Signifikant abundante Proteine die in mindestens zwei der drei Gewebe identifiziert wurden (L = Leber, N = Niere, C = Cortex). . . . .	165
A.10	Identifizierte, APOE zugeordnete N-terminale Peptide des TMT-HUNTER Experimentes 3AL-4AL. . . . .	167
A.11	Identifizierte, KRT18 zugeordnete N-terminale Peptide des TMT-HUNTER Experimentes 3AL-4AL. . . . .	168
A.12	Identifizierte, APOE zugeordnete N-terminale Peptide des TMT-HUNTER Experimentes 3DR-4DR. . . . .	169
A.13	Identifizierte, KRT18 zugeordnete N-terminale Peptide des TMT-HUNTER Experimentes 3DR-4DR. . . . .	169
A.14	Angewandter LC-Gradient für die MS-Analyse der MD-Peptide. <sup>[52]</sup> .	171
A.15	Identifizierte potentielle APOE3 Interaktionspartner der Co-IP/BU-MS-Analyse der APOE3 transfizierten Huh7-Zellen. Abundanz-Verhältnisse APOE3 gegen jene der unbehandelten Kontrolle (K. unbeh.). . . . .	171
A.15	Fortsetzung Tabelle: Identifizierte potentielle APOE3 Interaktionspartner der Co-IP/BU-MS-Analyse der APOE3 transfizierten Huh7-Zellen. Abundanz-Verhältnisse APOE3 gegen jene der unbehandelten Kontrolle (K. unbeh.). . . . .	172

A.16	Identifizierte potentielle APOE4 Interaktionspartner der Co-IP/BU-MS-Analyse der APOE4 transfizierten Huh7-Zellen. Abundanz-Verhältnisse APOE4 gegen jene der unbehandelten Kontrolle (K. unbeh.). . . . .	173
A.17	Identifizierte potentielle Protein-Protein-Interaktionspartner von APOE der Co-IP/ <i>Middle-Down</i> -MS-Analyse. . . . .	174
A.18	Potentielle APOE Interaktionspartner identifiziert in den Co-IP/PEPPI-Experimenten. Überschneidung der Proteinlisten der APOE3- und APOE4-Proben. . . . .	175
A.18	Fortsetzung Tabelle: Potentielle APOE Interaktionspartner identifiziert in den Co-IP/PEPPI-Experimenten. Überschneidung der Proteinlisten der APOE3- und APOE4-Proben. . . . .	176
A.18	Fortsetzung Tabelle: Potentielle APOE Interaktionspartner identifiziert in den Co-IP/PEPPI-Experimenten. Überschneidung der Proteinlisten der APOE3- und APOE4-Proben. . . . .	177
A.18	Fortsetzung Tabelle: Potentielle APOE Interaktionspartner identifiziert in den Co-IP/PEPPI-Experimenten. Überschneidung der Proteinlisten der APOE3- und APOE4-Proben. . . . .	178

# Abkürzungsverzeichnis

<b>ABC</b>	Ammoniumbicarbonat
<b>ACN</b>	Acetonitril
<b>APO</b>	Apolipoprotein
<b>APS</b>	Ammoniumpersulfat
<b>AL</b>	<i>ad libitum</i>
<b>BCA</b>	Bicinchoninsäure
<b>CID</b>	<i>Collision-induced Dissociation</i> , Kollisions-induzierte Fragmentierung
<b>CMW</b>	Chloroform-Methanol-Wasser
<b>DR</b>	<i>dietary restriction</i>
<b>DTT</b>	Dithiothreitol
<b>ESI</b>	<i>Electrospray Ionization</i> , Elektronenspray-Ionisierung
<b>ETD</b>	<i>Electron Transfer Dissociation</i> , Elektronentransferdissoziation
<b>EtOH</b>	Ethanol
<b>ETHcD</b>	<i>Electron Transfer High Energy Dissociation</i>
<b>FA</b>	<i>Formic Acid</i> , Ameisensäure
<b>FDR</b>	<i>False Discovery Rate</i> , Falsch-positiv Rate
<b>HCD</b>	<i>Higher Energy Collisional Dissociation</i> , Kollisionsinduzierte Dissoziation
<b>HCl</b>	Salzsäure
<b>HEPES</b>	2-(4-(Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
<b>HDL</b>	<i>high density lipoprotein</i>
<b>HPLC</b>	<i>High Pressure Liquid Chromatography</i> , Hochdruckflüssigchromatographie
<b>HUNTER</b>	<i>High-efficiency undecanal based N-termini enrichment</i>
<b>IAA</b>	Iodacetamid
<b>IDL</b>	<i>intermediate density lipoprotein</i>
<b>LC</b>	<i>Liquid Chromatography</i> , Flüssigchromatographie
<b>LDL</b>	<i>low density lipoprotein</i>
<b>LDLR</b>	<i>low density lipoprotein receptor</i>

<b>MeOH</b>	Methanol
<b>MS</b>	Massenspektrometrie
<b>MS1</b>	MS-Ebene
<b>MS2</b>	MS/MS-Ebene
<b>m/z</b>	Masse-zu-Ladungs-Verhältnis
<b>NaOH</b>	Natronlauge, Natriumhydroxid
<b>NCE</b>	<i>Normalized Collision Energy</i> , Normalisierte Kollisionsenergie
<b>NHS</b>	N-Hydroxysuccinimid
<b>PEPPI</b>	<i>Passively Eluting Proteins from Polyacrylamide gels as Intact species for MS</i>
<b>PPI</b>	Protein-Protein-Interaktionen
<b>ppm</b>	<i>Parts Per Million</i>
<b>PSM</b>	<i>Peptide Spectrum Match</i>
<b>PTM</b>	Posttranslationale Modifikation
<b>SDS</b>	<i>Sodium Dodecyl Suflate</i> , Natriumdodecylsulfat
<b>SDS-PAGE</b>	<i>Sodium Dodecyl Suflate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i> , Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
<b>SP3</b>	<i>single-pot solid-phase-enhanced sample preparation</i>
<b>StageTips</b>	<i>Stop-And-Go-Extraction Tips</i>
<b>TAILS</b>	<i>Terminal Amine Isotopic Labeling of Substrates</i>
<b>TCEP</b>	Tris(2-carboxyethyl)phosphin
<b>TEA</b>	Triethylamin
<b>TEAB</b>	Triethylammoniumbicarbonat
<b>TEMED</b>	Tetramethylethylendiamin
<b>TFA</b>	Trifluoressigsäure
<b>TIC</b>	<i>Total Ion Current</i> , Totalionenstrom
<b>TMT</b>	<i>Tandem Mass Tag</i>
<b>TR</b>	<i>Targeted Replacement</i>
<b>TRIS</b>	2-Amino-2-hydroxymethyl-propan-1,3-diol
<b>v/v</b>	Volumen/Volumen
<b>VLDL</b>	<i>very-low density lipoprotein</i>
<b>w/v</b>	<i>Weight/Volume</i> , Masse/Volumen
<b>w/w</b>	<i>Weight/Weight</i> , Masse/Masse

# Abkürzungsverzeichnis Aminosäuren

Einbuchstaben- Code	Dreibuchstaben- Code	Aminosäure
A	Ala	Alanin
C	Cys	Cystein
D	Asp	Asparaginsäure, Aspartat
E	Glu	Glutaminsäure, Glutamat
F	Phe	Phenylalanin
G	Gly	Glycin
H	His	Histidin
I	Ile	Isoleucin
K	Lys	Lysin
L	Leu	Leucin
M	Met	Methionin
N	Asn	Asparagin
P	Pro	Prolin
Q	Gln	Glutamin
R	Arg	Arginin
S	Ser	Serin
T	Thr	Threonin
V	Val	Valin
W	Trp	Tryptophan
Y	Tyr	Tyrosin



## A.1 Software und Geräte

**Tabelle A.1.:** Verwendete Geräte.

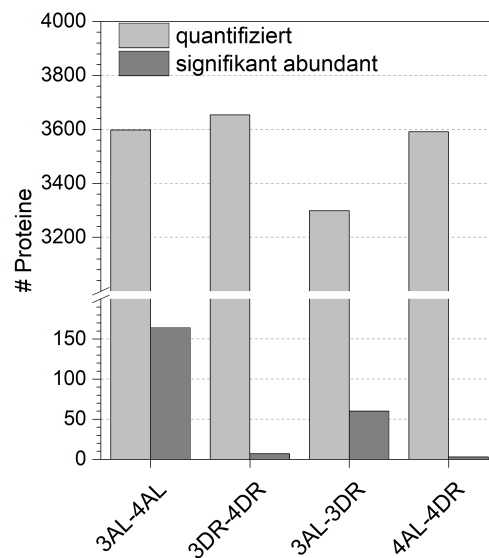
Geräte	Beschreibung	Hersteller
areium611-System	MilliQ-Wasser-System	Sartorium (Göttingen, Deutschland)
Concentrator Plus	<i>SpeedVac</i> , Vakuumkonzentrator	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Heraeus™ Fresco™ 21 Microzentrifuge	Zentrifuge	Thermo Scientific
Q-Exactive™ HF	Orbitrap Massenspektrometer	Thermo Scientific (Bremen, Deutschland)
Q-Exactive™ Plus	Orbitrap Massenspektrometer	Thermo Scientific
S20 SevenEasy™ pH Meter	pH-Meter	Mettler-Toledo (Greifensee, Schweiz)
Thermomixer comfort Ultimate 3000	Thermomixer analytical HPLC	Eppendorf Dionex (Idstein, Deutschland)

**Tabelle A.2.:** Verwendete Software.

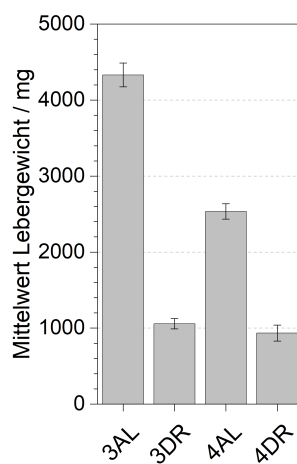
Software	Entwickler / Vertreiber
Chromeleon (V6.80)	Thermo Fisher Scientific
FreeStyle (V1.6)	Thermo Fisher Scientific
Perseus (V1.6.15.0)	Max-Planck-Institute of Biochemistry
Proteome Discoverer (V2.2.0.388)	Thermo Fisher Scientific
Proteome Discoverer (V2.4)	Thermo Fisher Scientific
Origin 2021b (V9.8.5.212)	OriginLab Corporation
Origin 2022 (V9.9.0.220)	OriginLab Corporation
Thermo Xcalibur (V3.0.63)	Thermo Fisher Scientific

## A.2 Kapitel 3

### Quantitative Analyse von Lebergeweben



**Abbildung A.1.:** Vergleich der Anzahl der quantifizierten und signifikant abundanten Proteine aller durchgeführten Leberexperimente.



**Abbildung A.2.:** Gemittelttes Lebergewicht der in dieser Studie verwendeten *APOE3*- bzw. *APOE4*- exprimierenden Mäuse unter Angabe des Standardfehlers (*standard error of the mean*, SEM).



**Tabelle A.3.:** 59 Proteine mit höherer Abundanz für APOE4 des Experiments 3AL-4AL.

<b>Protein</b>	<b>Protein- Accession</b>	<b>#Peptide (#seq.spez.* Peptide)</b>	<b>Sequenzab- deckung / %</b>
2-hydroxyacyl-CoA lyase 1	Q9QXE0	22 (22)	53
3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase, mitochondrial	Q99L13	13 (13)	40
3-oxo-5-alpha-steroid 4-dehydrogenase	A0A0R4J136	3 (3)	10
60S ribosomal protein L39	P62892	1 (1)	20
Acyl-coenzyme A synthetase ACSM1, mitochondrial	Q91VA0	30 (30)	70
Asparagine synthetase [glutamine-hydrolyzing]	Q61024	6 (6)	13
Carbamoyl-phosphate synthase [ammonia], mitochondrial	Q8C196	125 (121)	80
Carbonic anhydrase 5A, mitochondrial	P23589	11 (11)	48
Carboxylesterase 3B	Q8VCU1	18 (9)	49
Claudin-3	Q9Z0G9	1 (1)	6
Complement component C8 alpha chain	Q8K182	11 (11)	26
Cystathionine gamma-lyase	Q8VCN5	18 (18)	62
Cytochrome P450 2C29	Q64458	26 (17)	64
Cytochrome P450 2C37	P56654	19 (6)	53
Cytochrome P450 2C44	E9Q5K4	21 (19)	46
Cytochrome P450 2C50	Q91X77	21 (3)	52
Cytochrome P450 2C54	Q6XVG2	19 (9)	38
D-dopachrome decarboxylase	O35215	8 (8)	90
Ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 5	Q3TQC7	15 (15)	46
Glutathione transferase	E9QJW0	10 (10)	49
Glycine N-acyltransferase-like protein Kegl	Q9DCY0	16 (16)	65
Heme-binding protein 1	A0A140T8J4	13 (13)	85
Ig gamma-2A chain C region, membrane-bound form	P01865	5 (4)	21
Interferon-gamma-inducible GTPase Ifgga2 protein	Q3UED7	17 (12)	42
Keratin 78	E9Q0F0	2 (1)	2
Keratin, type I cytoskeletal 10	P02535	11 (7)	18

**Tabelle A.3.:** Fortsetzung Tabelle: 59 Proteine mit höherer Abundanz für APOE4 des Experiments 3AL-4AL.

<b>Protein</b>	<b>Protein- Accession</b>	<b>#Peptide (#seq.spez.* Peptide)</b>	<b>Sequenzab- deckung / %</b>
Keratin, type I cytoskeletal 16	Q9Z2K1	6 (1)	10
Keratin, type I cytoskeletal 42	Q6IFX2	8 (2)	14
Keratin, type II cytoskeletal 1	P04104	6 (2)	6
Keratin, type II cytoskeletal 1b	Q6IFZ6	7 (1)	8
Keratin, type II cytoskeletal 2 epi- dermal	Q3TTY5	9 (4)	8
Keratin, type II cytoskeletal 2 oral	Q3UV17	8 (1)	9
Keratin, type II cytoskeletal 5	Q922U2	15 (4)	16
Keratin, type II cytoskeletal 7	Q9DCV7	8 (2)	13
Keratin, type II cytoskeletal 72	Q6IME9	3 (1)	4
Keratin, type II cytoskeletal 79	Q8VED5	8 (2)	9
Lithostathine-1	P43137	3 (3)	25
Major urinary protein 1	A2CEL1	18 (2)	79
Major urinary protein 1	Q4FZE8	18 (1)	79
Major urinary protein 25	Q3KQQ2	13 (9)	76
Major urinary protein 5	A2AKN8	18 (3)	81
N-acetyltransferase 8 (GCN5- related) family member 1	E9PUL7	8 (6)	25
NADPH-dependent 3-keto-steroid reductase Hsd3b5	Q61694	13 (9)	45
Ornithine aminotransferase, mit- ochondrial	P29758	21 (21)	69
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase NIMA-interacting 4	Q9CWW6	2 (2)	19
Peroxisomal coenzyme A diphos- phatase NUDT7	Q99P30	11 (11)	64
Predicted pseudogene 5478	A0A2R8VHP3	6 (3)	9
Regucalcin	Q64374	27 (27)	85
Serine protease inhibitor A3K	P07759	18 (6)	43
Serine-tRNA ligase, mitochondrial	Q9JJL8	2 (2)	7
Sodium/bile acid cotransporter	O08705	3 (3)	7
Sodium-coupled neutral amino acid transporter 3	Q9DCP2	7 (7)	15
Solute carrier organic anion trans- porter family member 1A1	Q9QXZ6	13 (11)	18
Sulfotransferase	Q8BGL3	19 (19)	66

**Tabelle A.3.:** Fortsetzung Tabelle: 59 Proteine mit höherer Abundanz für APOE4 des Experiments 3AL-4AL.

<b>Protein</b>	<b>Protein- Accession</b>	<b>#Peptide (#seq.spez.* Peptide)</b>	<b>Sequenzab- deckung / %</b>
Thioredoxin domain-containing protein 15	Q6P6J9	1 (1)	6
Ubiquitinyl hydrolase 1	A0A0A0MQF5	4 (4)	13
UDP-glucuronosyltransferase	Q8R084	18 (16)	44
UDP-glucuronosyltransferase 2A3	Q8BWQ1	16 (13)	33
Zymogen granule membrane protein 16	Q8K0C5	1 (1)	7

\*seq.spez. = sequenzspezifisch

**Tabelle A.4.:** 105 Proteine mit höherer Abundanz für APOE3 des Experiments 3AL-4AL.

<b>Protein</b>	<b>Protein- Accession</b>	<b>#Peptide (#seq.spez.* Peptide)</b>	<b>Sequenzab- deckung / %</b>
14-3-3 protein eta	P68510	14 (9)	61
6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating	Q9DCD0	23 (23)	49
Adenine phosphoribosyltransferase	P08030	10 (10)	68
Alpha-enolase	P17182	33 (28)	82
Annexin A2	P07356	23 (23)	72
Annexin A3	O35639	14 (13)	51
Annexin A5	P48036	32 (31)	81
Apolipoprotein A-IV	P06728	26 (26)	76
Apolipoprotein E3, human	P02649	23 (1)	66
Ataxin-2-like protein	A0A0U1RPL0	11 (1)	11
BET1-like protein	O35153	1 (1)	14
Biglycan	P28653	8 (7)	24
Bone marrow proteoglycan	Q61878	1 (1)	5
Brain acid soluble protein 1	Q91XV3	8 (8)	51
BTB/POZ domain-containing protein KCTD12	A0A0R4J2B2	8 (8)	29
Carbonyl reductase [NADPH] 1	P48758	18 (17)	72

**Tabelle A.4.:** Fortsetzung Tabelle: 105 Proteine mit höherer Abundanz für APOE3 des Experiments 3AL-4AL.

<b>Protein</b>	<b>Protein- Accession</b>	<b>#Peptide (#seq.spez.* Peptide)</b>	<b>Sequenzab- deckung / %</b>
Carbonyl reductase [NADPH] 3	Q8K354	13 (12)	55
Cathepsin D	P18242	14 (14)	43
CD5 antigen-like	Q9QWK4	13 (13)	40
Chemerin	A0A0N4SVV4	3 (3)	18
CKLF-like MARVEL transmembrane domain-containing protein 4	Q8CJ61	2 (2)	9
Coactosin-like protein	Q9CQI6	11 (11)	75
Collagen alpha-1(XIV) chain	K3W4R4	39 (39)	30
Cornifin-A	Q62266	2 (2)	22
CTP synthase 1	P70698	2 (2)	4
Cystatin-B	Q62426	5 (5)	58
Cytochrome b-245 heavy chain	Q61093	2 (2)	6
Cytoglobin	Q9CX80	4 (4)	17
Diphosphoinositol polyphosphate phosphohydrolase 2	Q8R2U6	2 (2)	11
Dystroglycan	Q62165	7 (7)	10
Ena/VASP-like protein (Fragment)	A0A1Y7VJA2	5 (5)	16
Fatty acid-binding protein, adipocyte	P04117	6 (6)	43
Fatty acid-binding protein, brain	E9Q0H6	3 (3)	18
F-box only protein 6	Q9QZN4	6 (6)	25
Fructosamine-3-kinase	Q9ER35	3 (3)	13
Fructose-bisphosphate aldolase	A6ZI44	26 (7)	65
Galectin-1	P16045	9 (9)	78
Galectin-3	P16110	7 (7)	25
Glucose-6-phosphate isomerase	P06745	25 (25)	47
Glutathione synthetase	P51855	19 (19)	46
H-2 class II histocompatibility antigen gamma chain	P04441	2 (2)	10
Haptoglobin	Q61646	17 (17)	47
Heat shock protein beta-1	P14602	9 (9)	57
Hematopoietic lineage cell-specific protein	P49710	9 (9)	21
High affinity immunoglobulin epsilon receptor subunit gamma	P20491	1 (1)	10

**Tabelle A.4.:** Fortsetzung Tabelle: 105 Proteine mit höherer Abundanz für APOE3 des Experiments 3AL-4AL.

<b>Protein</b>	<b>Protein- Accession</b>	<b>#Peptide (#seq.spez.* Peptide)</b>	<b>Sequenzab- deckung / %</b>
High mobility group AT-hook pro- tein 1	A0A338P6E8	2 (2)	24
Histone H1.1	P43275	7 (4)	21
Histone H1.5	P43276	12 (6)	35
Histone H2A type 1-K	Q8CGP7	5 (1)	38
Hmgn2 protein	Q5XK38	3 (3)	25
Ig heavy chain V region 6.96	P18528	1 (1)	19
Ig heavy chain V region AC38 205.12	P06330	3 (3)	34
Immunoglobulin heavy constant al- pha (Fragment)	A0A0A6YXW6	5 (1)	25
Immunoglobulin heavy constant gamma 2B (Fragment)	A0A0A6YVP0	5 (4)	22
Immunoglobulin heavy constant gamma 2C (Fragment)	F6TQW2	5 (4)	21
Integrin beta-2	P11835	5 (5)	9
Interferon alpha-inducible protein 27-like protein 2B	Q8VC49	1 (1)	5
Interferon-activable protein 205-B	P0DOV1	7 (3)	21
Keratin, type I cytoskeletal 18	P05784	34 (31)	79
Keratin, type II cytoskeletal 8	P11679	42 (32)	81
Lumican	P51885	11 (11)	40
Lymphatic vessel endothelial hyalu- ronic acid receptor 1	Q8BHC0	2 (2)	6
Lysosomal acid phosphatase	A0A5F8MPS7	4 (4)	9
Lysozyme C-2	P08905	3 (3)	32
Macrosialin	A0A0R4J1C8	2 (2)	5
Major vault protein	E9Q3X0	35 (35)	52
MARCKS-related protein	P28667	3 (3)	15
Mitofusin-1	Q811U4	4 (3)	7
Mixed lineage kinase domain-like protein	Q9D2Y4	3 (3)	7
Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate	P26645	6 (6)	30
NAD(P)H dehydrogenase 1	Q64669	9 (9)	32
Neudesin	Q9CQ45	2 (2)	12

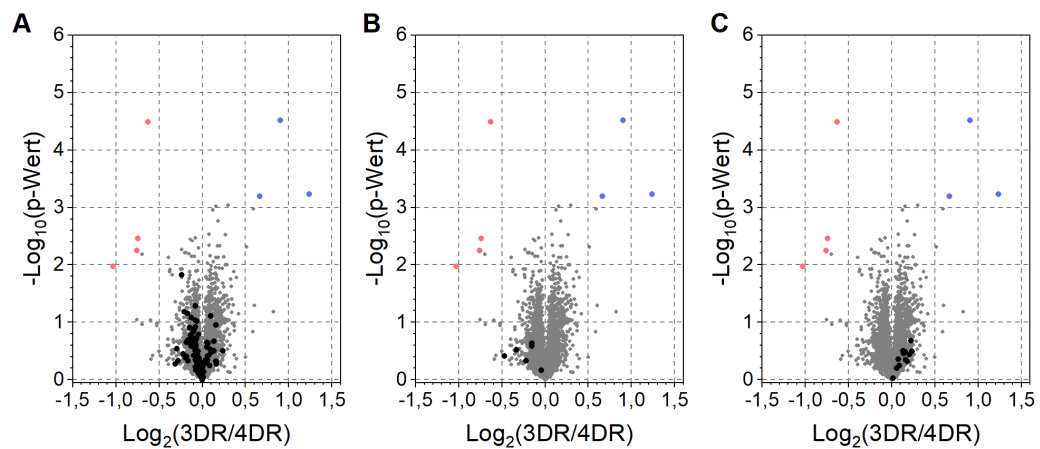
**Tabelle A.4.:** Fortsetzung Tabelle: 105 Proteine mit höherer Abundanz für APOE3 des Experiments 3AL-4AL.

<b>Protein</b>	<b>Protein- Accession</b>	<b>#Peptide (#seq.spez.* Peptide)</b>	<b>Sequenzab- deckung / %</b>
Non-specific serine/threonine pro- tein kinase (Fragment)	F6Q8A4	4 (1)	6
Perilipin-3	Q9DBG5	17 (17)	56
Perilipin-4	A0A571BEC9	14 (14)	41
Plastin-1	Q3V0K9	7 (3)	15
Progranulin	Q3U9N4	7 (7)	17
Prolargin	Q9JK53	11 (11)	33
Protein S100-A1	P56565	4 (4)	40
Protein S100-A10	P08207	2 (2)	28
Protein S100-A11	P50543	4 (4)	44
Protein-glutamine gamma-gluta- myltransferase 2	P21981	30 (30)	54
Pyruvate kinase PKM	P52480	26 (25)	60
Ras GTPase-activating-like protein IQGAP1	Q9JKF1	26 (22)	21
Retinol-binding protein 1	Q00915	7 (7)	50
Rho GDP-dissociation inhibitor 1	Q99PT1	10 (10)	52
RNA-binding protein with multiple splicing	Q9WVB0	5 (4)	30
Serine (or cysteine) peptidase inhi- bitor, clade B, member 6a	F8WIV2	11 (11)	38
Serine protease inhibitor A3K	A0A0R4J0I1	17 (5)	41
Serine protease inhibitor A3M	Q03734	8 (1)	22
Serpin H1	P19324	12 (12)	34
Signal transducing adapter molecu- le 1	P70297	3 (2)	6
THUMP domain-containing protein 3	P97770	1 (1)	3
Thymidine phosphorylase	Q99N42	14 (14)	44
Thymosin beta-4	P20065	3 (3)	28
Transgelin-2	Q9WVA4	15 (15)	83
Transmembrane protein 176B	Q9R1Q6	1 (1)	5
Tubulin beta-6 chain	Q922F4	12 (4)	31
UDP-glucuronosyltransferase 1A9	Q62452	17 (9)	37

**Tabelle A.4.:** Fortsetzung Tabelle: 105 Proteine mit höherer Abundanz für APOE3 des Experiments 3AL-4AL.

Protein	Protein- Accession	#Peptide (#seq.spez.* Peptide)	Sequenzab- deckung / %
UDP-N-acetylhexosamine pyrophosphorylase-like prote- in 1	Q3TW96	18 (18)	39
UMP-CMP kinase	A0A0R4J093	9 (9)	48
UPF0688 protein C1orf174 homolog	Q80WR5	4 (4)	20
Vimentin	P20152	28 (22)	62
WD repeat and FYVE domain- containing protein 1	E9Q4P1	2 (2)	6
Zinc transporter ZIP4	Q78IQ7	2 (2)	3

\*seq.spez. = sequenzspezifisch



**Abbildung A.3.:** Annotationen der 1D *Annotation Enrichment*-Analyse mit den höchsten Differenzen zum Experiment-Mittelwert: **A)** GOBP (*actin cytoskeleton organization*), **B)** GOMF (*acyl-CoA hydrolase activity*) und **C)** GOCC (*keratin filament*) des Leberexperimentes 3DR-4DR.

**Tabelle A.5.:** 43 Proteine mit höherer Abundanz für APOE3 AL des Leberexperiments 3AL-3DR.

Protein	Protein- Accession	#Peptide (#seq.spez.* Peptide)	Sequenzab- deckung / %
3-ketoacyl-CoA thiolase B, peroxiso- mal	Q8VCH0	26 (11)	82
6-phosphogluconate dehydrogen- ase, decarboxylating	Q9DCD0	23 (23)	49
Acyl-CoA desaturase 1	P13516	8 (8)	23
Acyl-Coenzyme A dehydrogenase family, member 12	D3Z7X0	13 (2)	23
Aldehyde dehydrogenase	B1ATI0	23 (19)	41
<a href="#">Annexin A2</a>	P07356	23 (23)	72
<a href="#">Annexin A5</a>	P48036	32 (31)	81
Apolipoprotein A-IV	P06728	26 (26)	76
BTB/POZ domain-containing prote- in KCTD12	A0A0R4J2B2	8 (8)	29
Carbonyl reductase [NADPH] 3	Q8K354	13 (12)	55
Ceruloplasmin	G3X8Q5	35 (1)	39
Coactosin-like protein	Q9CQI6	11 (11)	75
<a href="#">Collagen alpha-1(XIV) chain</a>	K3W4R4	39 (39)	30
Cornifin-A	Q62266	2 (2)	22
Coronin-1A	O89053	11 (11)	29
Elongation of very long chain fatty acids protein 5	Q8BHI7	1 (1)	3
Ena/VASP-like protein (Fragment)	A0A1Y7VJA2	5 (5)	16
Farnesyl pyrophosphate synthase	Q920E5	14 (14)	44
Fatty acid synthase	P19096	125 (125)	66
Fatty acid-binding protein, adipocy- te	P04117	6 (6)	43
<a href="#">Galectin-1</a>	P16045	9 (9)	78
<a href="#">Galectin-3</a>	P16110	7 (7)	25
Gamma-glutamylcyclotransferase	Q9D7X8	3 (3)	17
Glutathione S-transferase A1	P13745	10 (1)	35
Glutathione S-transferase Mu 3	P19639	21 (9)	81
H-2 class II histocompatibility anti- gen, A beta chain	P14483	5 (5)	25
Heat shock protein beta-1	P14602	9 (9)	57
<a href="#">High affinity immunoglobulin epsi- lon receptor subunit gamma</a>	P20491	1 (1)	10



**Tabelle A.5.:** Fortsetzung Tabelle: 43 Proteine mit höherer Abundanz für APOE3 AL des Leberexperiments 3AL-3DR.

Protein	Protein- Accession	#Peptide (#seq.spez.* Peptide)	Sequenzab- deckung / %
Histone H1.1	P43275	7 (4)	21
Histone H1.5	P43276	12 (6)	35
Holocytochrome c-type synthase	P53702	5 (5)	27
Immunoglobulin heavy constant mu (Fragment)	A0A075B5P6	20 (20)	48
Lymphatic vessel endothelial hyalu- ronic acid receptor 1	Q8BHC0	2 (2)	6
Macrophage-capping protein	Q99LB4	6 (6)	22
NADP-dependent malic enzyme	P06801	34 (34)	75
<a href="#">Perilipin-4</a>	A0A571BEC9	14 (14)	41
Peroxisomal membrane protein PEX16	Q91XC9	6 (6)	23
Platelet glycoprotein 4	Q08857	10 (10)	25
Protein S100-A10	P08207	2 (2)	28
Protein S100-A11	P50543	4 (4)	44
Testis-expressed protein 264 homo- log	E9Q137	2 (2)	7
Thyroid hormone-inducible hepatic protein	Q62264	7 (7)	67
UDP-N-acetylhexosamine pyrophosphorylase-like prote- in 1	Q3TW96	18 (18)	39

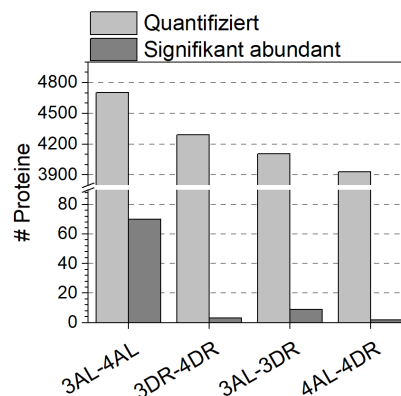
\*seq.spez. = sequenzspezifisch

**Tabelle A.6.:** 17 Proteine mit höherer Abundanz für APOE3 DR des Leberexperiments 3AL-3DR.

<b>Protein</b>	<b>Protein- Accession</b>	<b>#Peptide (#seq.spez.* Peptide)</b>	<b>Sequenzab- deckung / %</b>
3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase, mitochondrial	Q99L13	13 (13)	40
Acyl-coenzyme A synthetase ACSM1, mitochondrial	Q91VA0	30 (30)	70
Asialoglycoprotein receptor 2	P24721	7 (7)	43
Carbamoyl-phosphate synthase [ammonia], mitochondrial	Q8C196	125 (121)	80
Cytochrome P450 2C29	Q64458	26 (17)	64
Cytochrome P450 2C37	P56654	19 (6)	53
Cytochrome P450 2C54	Q6XVG2	19 (9)	38
Glycine N-acyltransferase	Q91XE0	20 (18)	78
Glycine N-acyltransferase-like protein Keg1	Q9DCY0	16 (16)	65
Glycogen [starch] synthase, liver	Q8VCB3	25 (25)	46
NADPH-dependent 3-keto-steroid reductase Hsd3b5	Q61694	13 (9)	45
Nicotinamide N-methyltransferase	O55239	4 (4)	17
Persulfide dioxygenase ETHE1, mitochondrial	Q9DCM0	9 (9)	55
Sodium/bile acid cotransporter	O08705	3 (3)	7
Solute carrier organic anion transporter family member 1A1	Q9QXZ6	13 (11)	18
Sulfotransferase	Q8BGL3	19 (19)	66
Uridine phosphorylase	Q8R093	6 (6)	28

\*seq.spez. = sequenzspezifisch

## Quantitative Analyse von Nierengeweben



**Abbildung A.4.:** Vergleich der Anzahl der quantifizierten gegen die der signifikant abundanter Proteine der vier Nieren-Experimente.

**Tabelle A.7.:** 40 Proteine mit höherer Abundanz für APOE3 AL des Nierenexperiments 3AL-4AL. Überschneidung mit differenziell abundanten Proteinen des Leberexperimentes 3AL-4AL in blau hervorgehoben.

Protein	Protein-Accession	#Peptide (#seq.spez.* Peptide)	Sequenzabdeckung / %
Acyl carrier protein, mitochondrial	Q9CR21	4 (4)	21
Apolipoprotein A-II	P09813	2 (2)	19
<b>Apolipoprotein A-IV</b>	P06728	22 (22)	50
Apolipoprotein C-I	P34928	5 (5)	39
ARF GTPase-activating protein	E9PVA6	2 (1)	3
GIT2			
ATPase inhibitor, mitochondrial	O35143	6 (6)	40
Beta-2-microglobulin	P01887	2 (2)	14
Ceruloplasmin	G3X8Q5	31 (31)	33
Cysteine and glycine-rich protein 2	A0A1W2P845	6 (6)	34
Distal membrane-arm assembly complex protein 1	Q9CQ00	2 (2)	13
Dr1-associated corepressor	D3YY09	2 (2)	9
Elongation factor 1-alpha 2	P62631	9 (1)	22
Ephrin-B1	P52795	1 (1)	6
Four and a half LIM domains protein 3	Q9R059	8 (8)	39
Glutathione transferase	E9Q6L7	7 (7)	27

**Tabelle A.7.:** Fortsetzung Tabelle: 40 Proteine mit höherer Abundanz für APOE3 AL des Nierenexperiments 3AL-4AL. Überschneidung mit differenziell abundanten Proteinen des Leberexperimentes 3AL-4AL in blau hervorgehoben

Protein	Protein- Accession	#Peptide (#seq.spez.* Peptide)	Sequenzab- deckung / %
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	S4R1W1	14 (1)	52
H-2 class II histocompatibility antigen, I-A beta chain	O78196	1 (1)	3
<b>Haptoglobin</b>	Q61646	15 (15)	44
Ig alpha chain C region	P01878	4 (4)	17
<b>Ig heavy chain V region 6.96</b>	P18528	1 (1)	19
<b>Ig heavy chain V region AC38 205.12</b>	P06330	3 (3)	34
<b>Immunoglobulin heavy constant gamma 2B (Fragment)</b>	A0A0A6YVP0	8 (8)	31
<b>Immunoglobulin heavy constant gamma 2C (Fragment)</b>	F6TQW2	6 (6)	25
Immunoglobulin heavy variable 5-9-1 (Fragment)	A0A0A6YVS4	1 (1)	13
Immunoglobulin kappa variable 5-39	A0A075B5M7	2 (2)	32
Intraflagellar transport protein 172 homolog	Q6VH22	1 (1)	1
Ladinin-1	P57016	12 (12)	24
Leucine rich adaptor protein 1	Q9D6I9	1 (1)	7
Lipoma-preferred partner homolog	Q8BFW7	5 (5)	11
<b>Lysozyme C-2</b>	P08905	4 (4)	36
Organic solute transporter subunit alpha	Q8R000	2 (2)	7
Protein phosphatase 1 regulatory subunit 1A	Q9ERT9	3 (3)	22
<b>Serine protease inhibitor A3K</b>	A0A0R4J0I1	14 (3)	41
Serotransferrin	Q921I1	45 (43)	66
Sterile alpha motif domain-containing protein 9-like	E9PX59	38 (38)	27
Synaptobrevin-2	B0QZN5	3 (1)	25
Transmembrane emp24 domain-containing protein 9	Q99KF1	3 (2)	16
Transthyretin	P07309	5 (5)	31

**Tabelle A.7.:** Fortsetzung Tabelle: 40 Proteine mit höherer Abundanz für APOE3 AL des Nierenexperiments 3AL-4AL. Überschneidung mit differenziell abundanten Proteinen des Leberexperimentes 3AL-4AL in blau hervorgehoben

Protein	Protein- Accession	#Peptide (#seq.spez.* Peptide)	Sequenzab- deckung / %
Vitamin D-binding protein	P21614	17 (17)	37
WD repeat and FYVE domain- containing protein 1	E9Q4P1	5 (5)	14

\*seq.spez. = sequenzspezifisch

**Tabelle A.8.:** 30 Proteine mit höherer Abundanz für APOE4 AL des Nierenexperiments 3AL-4AL. Überschneidung mit differenziell abundanten Proteinen des Leberexperimentes 3AL-4AL in blau hervorgehoben.

Protein	Protein- Accession	#Peptide (#seq.spez.* Peptide)	Sequenzab- deckung / %
3-alpha-hydroxysteroid dehydro- genase type 1	Q91WT7	14 (12)	42
Acyl-coenzyme A synthetase ACSM3, mitochondrial	Q3UNX5	25 (24)	46
Alpha-1-antitrypsin 1-5	Q00898	12 (4)	30
Arf-GAP with SH3 domain, ANK re- peat and PH domain-containing pro- tein 1	E9QN63	2 (1)	2
Cleavage stimulation factor subunit 2	Q8BIQ5	5 (5)	10
E3 ubiquitin-protein ligase RNF31	Q924T7	1 (1)	1
Ectonucleoside triphosphate diphos- phohydrolase 5	Q3TQC7	10 (10)	30
Estradiol 17-beta-dehydrogenase 11	Q9EQ06	11 (11)	41
Heme-binding protein 1	A0A140T8J4	7 (7)	54
Ig gamma-2A chain C region, membrane-bound form	P01865	5 (5)	20
Low density lipoprotein receptor ad- apter protein 1	Q8C142	2 (2)	6
Mpv17-like protein	Q99MS3	2 (2)	8

**Tabelle A.8.:** Fortsetzung Tabelle: 30 Proteine mit höherer Abundanz für APOE4 AL des Nierenexperiments 3AL-4AL. Überschneidung mit differenziell abundanten Proteinen des Leberexperimentes 3AL-4AL in blau hervorgehoben.

Protein	Protein- Accession	#Peptide (#seq.spez.* Peptide)	Sequenzab- deckung / %
Myeloid-associated differentiation marker	O35682	2 (2)	8
N-acetylated-alpha-linked acidic dipeptidase 2	G3UWC2	4 (2)	5
N-acetyltransferase family 8 member 7	E0CYR6	4 (4)	16
NudC domain-containing protein 1	Q6PIP5	2 (2)	5
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase NIMA-interacting 4	Q9CWW6	1 (1)	9
Peroxisomal acyl-coenzyme A oxidase 1	Q9R0H0	32 (32)	60
PHD finger protein 21B	Q8C966	1 (1)	2
Predicted gene 4450	E9Q007	10 (8)	28
Proteasome assembly chaperone 4	P0C7N9	1 (1)	20
Receptor expression-enhancing protein	G3X8R0	7 (7)	25
RNA-binding protein 47 (Fragment)	D3Z113	7 (1)	56
Serine protease inhibitor A3K	P07759	15 (4)	43
Synaptogyrin-2	O55101	1 (1)	4
TESP4	Q9QUK9	1 (1)	8
Trypsin 10	Q792Z1	1 (1)	4
UDP-glucuronosyltransferase	Q8VCN3	6 (2)	14
Vacuolar fusion protein CCZ1 homolog	Q8C1Y8	5 (5)	10
Zinc finger protein 609	Q8BZ47	2 (1)	1

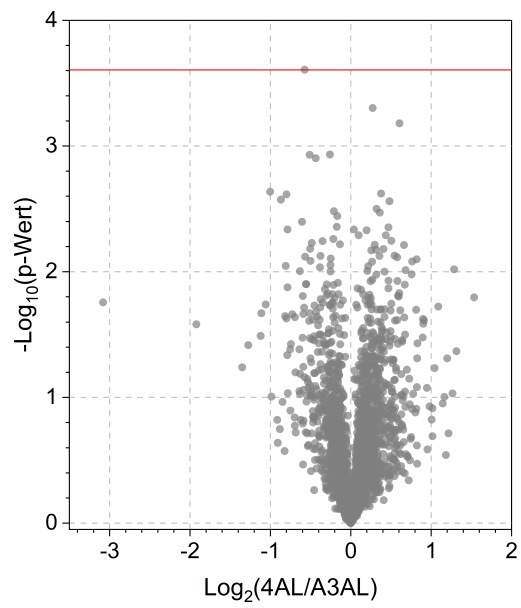
\*seq.spez. = sequenzspezifisch

## Vergleich der differenziell abundanten Proteine

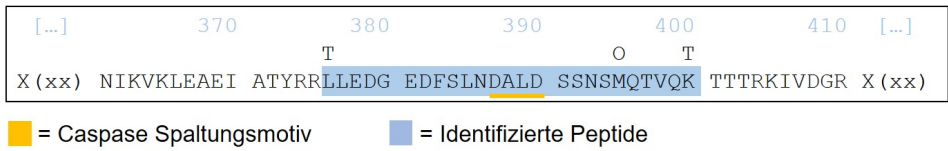
**Tabelle A.9.:** Signifikant abundante Proteine die in mindestens zwei der drei Gewebe identifiziert wurden (L = Leber, N = Niere, C = Cortex).

Experiment	L	N	C	Protein	Protein-Accession
3AL-4AL	x	x	x	Heme-binding protein 1	A0A140T8J4
	x	x	x	WD repeat and FYVE domain-containing protein 1	E9Q4P1
	x	x	x	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase NIMA-interacting 4	Q9CWW6
	x	x		Lysozyme C-2	P08905
	x	x		Ig heavy chain V region 6.96	P18528
	x	x		Ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 5	Q3TQC7
	x	x		Immunoglobulin heavy constant gamma 2B (Fragment)	A0A0A6YVP0
	x	x		Ig heavy chain V region AC38 205.12	P06330
	x	x		Immunoglobulin heavy constant gamma 2C (Fragment)	F6TQW2
	x	x		Apolipoprotein A-IV	P06728
	x	x		Serine protease inhibitor A3K	P07759
	x	x		Haptoglobin	Q61646
	x	x		Ig gamma-2A chain C region, membrane-bound form	P01865
	x	x		Serine protease inhibitor A3K	A0A0R4J0I1
3DR-4DR	x	x		Serine protease inhibitor A3K	A0A0R4J0I1
	x	x		Immunoglobulin heavy constant gamma 2C (Fragment)	F6TQW2
	x	x		Heme-binding protein 1	A0A140T8J4
3AL-3DR	x	x		Ceruloplasmin	G3X8Q5

# A.3 Kapitel 4



**Abbildung A.5.:** Volcano-Plot des TMT-HUNTER Experimentes 3AL-4AL. Statistische Signifikanzen und p-Werte wurden über einen zweiseitigen Student's t-Test (permutationsbasierter FDR-Ansatz; FDR = 0,05) berechnet.



**Abbildung A.6.:** Ausschnitt aus der Proteinsequenz von Keratin 18 (KRT18, P05784). Hervorhebung des in den quantitativen Analysen (Kap. 3) quantifizierten Peptides (blau), welches die Caspase-Spaltstelle <sup>387</sup>DALD<sup>390</sup> überspannt (gelb) und KRT18 zugeordnet werden kann.



**Tabelle A.10.:** Identifizierte, APOE zugeordnete N-terminale Peptide des TMT-HUNTER Experimentes 3AL-4AL.

Annotierte Sequenz	Position in Prot.seq.	Sequenzlänge / AA	Modifikation	# PSMs
[A].KVEQAVETEPEPELR.[Q]	19-33	15	1xTMT [K1] 1xTMT [N-Term]	26
[E].QAVETEPEPELR.[Q]	22-33	12	1xTMT [N-Term]	8
[Q].AVETEPEPELR.[Q]	23-33	11	1xTMT [N-Term]	1
[V].ETEPEPELR.[Q]	25-33	9	1xTMT [N-Term]	7
[E].TEPEPELR.[Q]	26-33	8	1xTMT [N-Term]	6
[T].EPEPELR.[Q]	27-33	7	1xTMT [N-Term]	3
[R].QQTEWQSGQR.[W]	34-43	10	1xTMT [N-Term]	2
[Q].TEWQSGQR.[W]	36-43	8	1xTMT [N-Term]	2
[R].AATVGSLAGQPLQER.[A]	210-224	15	1xTMT [N-Term]	2
[A].TVGSLAGQPLQER.[A]	212-224	13	1xTMT [N-Term]	4
[T].VGSLAGQPLQER.[A]	213-224	12	1xTMT [N-Term]	6
[G].SLAGQPLQER.[A]	215-224	10	1xTMT [N-Term]	6
[L].AGQPLQER.[A]	217-224	8	1xTMT [N-Term]	3
[A].GQPLQER.[A]	218-224	7	1xTMT [N-Term]	4

**Tabelle A.11.:** Identifizierte, KRT18 zugeordnete N-terminale Peptide des TMT-HUNTER Experimentes 3AL-4AL.

Annotierte Sequenz	Position in Prot.seq.	Sequenzlänge / AA	Modifikation	# PSMs
[R].STTFSTNYR.[S]	7-15	9	1xTMT [N-Term]	3
[S].TTFSTNYR.[S]	8-15	8	1xTMT [N-Term]	1
[V].RPASSAASVYAGAGGSGSR.[I]	28-46	19	1xTMT [N-Term]	2
[A].SSAASVYAGAGGSGSR.[I]	31-46	16	1xTMT [N-Term]	1
[S].SAASVYAGAGGSGSR.[I]	32-46	15	1xTMT [N-Term]	8
[A].ASVYAGAGGSGSR.[I]	34-46	13	1xTMT [N-Term]	3
[A].SVYAGAGGSGSR.[I]	35-46	12	1xTMT [N-Term]	9
[G].SAGLAGMGGIQTEKETMQDLNDR.[L]	60-82	23	2xOx. [M7; M17] 1xTMT [K14] 1xTMT [N-Term]	4
[G].SAGLAGMGGIQTEKETMQDLNDR.[L]	60-82	23	1xOx. [M] 1xTMT [K14] 1xTMT [N-Term]	7
[G].SAGLAGMGGIQTEKETMQDLNDR.[L]	60-82	23	1xTMT [K14] 1xTMT [N-Term]	5
[G].MGGIQTEKETMQDLNDR.[L]	66-82	17	1xOx. [M1] 1xTMT [K8] 1xTMT [N-Term]	2
[G].MGGIQTEKETMQDLNDR.[L]	66-82	17	1xTMT [K8] 1xTMT [N-Term]	3
[M].GGIQTEKETMQDLNDR.[L]	67-82	16	1xOx. [M10] 1xTMT [K7] 1xTMT [N-Term]	3
[R].KVVDDTNITR.[L]	180-189	10	1xTMT [K1] 1xTMT [N-Term]	3
[N].SMQTVQKTTTR.[K]	394-404	11	1xOx. [M2] 1xTMT [K7] 1xTMT [N-Term]	1
[N].SMQTVQKTTTR.[K]	394-404	11	1xTMT [K7] 1xTMT [N-Term]	3
[M].QTVQKTTTR.[K]	396-404	9	1xTMT [K5] 1xTMT [N-Term]	3
[Q].TVQKTTTR.[K]	397-404	8	1xTMT [K4] 1xTMT [N-Term]	3
[R].VVSETNDTR.[V]	411-419	9	1xTMT [N-Term]	3

**Tabelle A.12.:** Identifizierte, APOE zugeordnete N-terminale Peptide des TMT-HUNTER Experimentes 3DR-4DR.

Annotierte Sequenz	Position in Prot.seq.	Sequenzlänge / AA	Modifikation	# PSMs
[A].KVEQAVETEPEPELR.[Q]	19-33	15	1xTMT [K1] 1xTMT [N-Term]	22
[K].VEQAVETEPEPELR.[Q]	20-33	14	1xTMT[N-Term]	4
[E].QAVETEPEPELR.[Q]	22-33	12	1xTMT [N-Term]	3
[Q].AVETEPEPELR.[Q]	23-33	11	1xTMT [N-Term]	1
[A].VETEPEPELR.[Q]	24-33	10	1xTMT [N-Term]	1
[V].ETEPEPELR.[Q]	25-33	9	1xTMT [N-Term]	2

**Tabelle A.13.:** Identifizierte, KRT18 zugeordnete N-terminale Peptide des TMT-HUNTER Experimentes 3DR-4DR.

Annotierte Sequenz	Position in Prot.seq.	Sequenzlänge / AA	Modifikation	# PSMs
[R].VRPASSAASVYAGAGGSGSR.[I]	27-46	20	1xTMT [N-Term]	1
[R].SVWGGSVGSAGLAGMGGIQT-EKETMQDLNDR.[L]	52-82	31	2xOx. [M15; M25] 1xTMT [K22] 1xTMT [N-Term]	1
[G].SAGLAGMGGIQTETEMQDLNDR.[L]	60-82	23	2xOx. [M7; M17] 1xTMT [K14] 1xTMT [N-Term]	7
[Q].TVQKTTTR.[K]	397-404	8	1xTMT6plex [K4]; 1xTMT [N-Term]	6

#### Apolipoprotein E (P02649)

10	20	30	40	50	60	70
	D	DDD				
MKVLWAALLV	TFLAGCQAKV	EQAVETEPEP	ELRQQTEWQS	GQRWELALGR	FWDYLRWVQT	LSEQVQEELL
80	90	100	110	120	130	140
SSQVTQELRA	LMDETMKELK	AYKSELEEQL	TPVAEETRAR	LSKELQAAQA	RLGADMEDVX	GRLVQYRGEV
150	160	170	180	190	200	210
QAMLGQSTEE	LRVRLASHLR	KLRKRLLRDA	DDLQKRLAVY	QAGAREGAER	GLSAIRERLG	PLVEQGRVRA
220	230	240	250	260	270	280
ATVGSLAGQP	LQERAQAWGE	RLRARMEEMG	SRTRDRLDEV	KEQVAEVRAR	LEEQAQQIRL	QAEAFQARLK
290	300	310				
SWFEPLVEDM	QRQWAGLVEK	VQAAVGTSA	PVPSDNH			

X = C (APOE3); R (APOE4)

■ = Identifizierte Peptide

D = Dimethylierte Aminosäure

#### Keratin 18 (P05784)

10	20	30	40	50	60	70
		DD			D	
MSFTTRSTTF	STNYRSLGSV	RTPSQVRVPA	SSAASVYAGA	GGSGSRISVS	RSVWGGSVGS	AGLAGMGGIQ
80	90	100	110	120	130	140
TEKETMQDLN	DRLASVLDKV	KSLETENRRL	ESKIREHLEK	KGPQGVRDWG	HYFKIIEDLR	AQIFANSVDN
150	160	170	180	190	200	210
ARIVLQIDNA	RLAADDFRVK	YETELAMRQS	VESDIHGLRK	VVDDTNITRL	QLETEIEALK	EELLFMKKNH
220	230	240	250	260	270	280
EEEVQGLEAQ	IASSGLTVEV	DAPKSQDLK	IMADIRAQYE	ALAQKNREEL	DKYWSQQIEE	STTVVTTKSA
290	300	310	320	330	340	350
	D					
EIRDAETTLT	ELRRTLQMLE	IDLDSMKNQN	INLENSLGDV	EARYKAQMEQ	LNGVLLHLES	ELAQTRAEGQ
360	370	380	390	400	410	420
RQAQYEYALL	NIKVKLEAEI	ATYRRILLEDG	EDFSLNDALD	SSNSMQTVQK	TTRKIVDGR	VVSETNDTRV

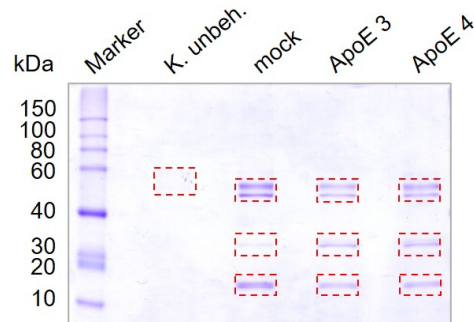
■ = Caspase Spaltungsmotiv

■ = Identifizierte Peptide

D = Dimethylierte Aminosäure

**Abbildung A.7.:** Peptide von APOE und KRT18 welche im HUNTER-Experiment des Lebergewebes von DR-Mäusen identifiziert wurden. Farbliche Hervorhebung der identifizierten Peptide (blau) unter Angabe der modifizierten Aminosäurereste (D = Dimethyl). Innerhalb der Proteinsequenz von APOE ist die Position der Aminosäure-Substitution, welche die Isoformen unterscheidet, hervorgehoben (gelb); innerhalb von KRT18 die Caspase-Spaltstelle (gelb).

## A.4 Kapitel 5



**Abbildung A.8.:** Coomassie-gefärbtes SDS-PAGE Gel des Co-IP/PEPPI-MD Experimentes. Für die Aufarbeitung ausgeschnittene Banden sind mit einer gestrichelten, roten Umrandung dargestellt.

**Tabelle A.14.:** Angewandter LC-Gradient für die MS-Analyse der MD-Peptide.<sup>[52]</sup>

Zeit / min	Eluent A / %	Eluent B / %
0-5	96	4
5-7	85	15
7-127	50	50
127-129	10	90
129-140	10	90
140-140,1	96	4
140,1-150	96	4

**Tabelle A.15.:** Identifizierte potentielle APOE3 Interaktionspartner der Co-IP/BU-MS-Analyse der APOE3 transfizierten Huh7-Zellen. Abundanz-Verhältnisse APOE3 gegen jene der unbehandelten Kontrolle (K. unbeh.).

Protein	Protein-Accession	Gen	APOE3/K. unbeh.
Mitochondrial import receptor subunit TOM40 homolog	O96008	<i>TOMM40</i>	20000,0
Surfeit locus protein 4	O15260	<i>SURF4</i>	20000,0
Spectrin alpha chain, non-erythrocytic 1	Q13813	<i>SPTAN1</i>	20000,0
Very-long-chain (3R)-3-hydroxyacyl-CoA dehydratase 3	Q9P035	<i>HACD3</i>	20000,0

**Tabelle A.15.:** Fortsetzung Tabelle: Identifizierte potentielle APOE3 Interaktionspartner der Co-IP/BU-MS-Analyse der APOE3 transfizierten Huh7-Zellen. Abundanz-Verhältnisse APOE3 gegen jene der unbehandelten Kontrolle (K. unbeh.).

<b>Protein</b>	<b>Protein- Accession</b>	<b>Gen</b>	<b>APOE3/K. unbeh.</b>
Voltage-dependent anion-selective channel protein 1	P21796	<i>VDAC1</i>	399,0
Cytochrome b5 type B	O43169	<i>CYB5B</i>	284,7
Transmembrane protein 43	Q9BTV4	<i>TMEM43</i>	199,0
Isoform 1 of Voltage-dependent anion-selective channel protein 2	P45880-1	<i>VDAC2</i>	199,0
Voltage-dependent anion-selective channel protein 3	Q9Y277	<i>VDAC3</i>	116,6
Microsomal glutathione S-transferase 1	P10620	<i>MGST1</i>	75,9
Stomatin	P27105	<i>STOM</i>	32,3
Lon protease homolog, mitochondrial	P36776	<i>LONP1</i>	30,3
Cytoskeleton-associated protein 4	Q07065	<i>CKAP4</i>	16,1
Membrane-associated progesterone receptor component 1	O00264	<i>PGRMC1</i>	11,5
Reticulocalbin-1	Q15293	<i>RCN1</i>	11,0
Malectin	Q14165	<i>MLEC</i>	10,0
Calnexin	P27824	<i>CANX</i>	7,0
Complement component 1 Q subcomponent-binding protein, mitochondrial	Q07021	<i>C1QBP</i>	5,6
Minor histocompatibility antigen H13	Q8TCT9	<i>HM13</i>	3,2
Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit beta-1	P62873	<i>GNB1</i>	2,4
Alpha-2-macroglobulin	P01023	<i>A2M</i>	2,3

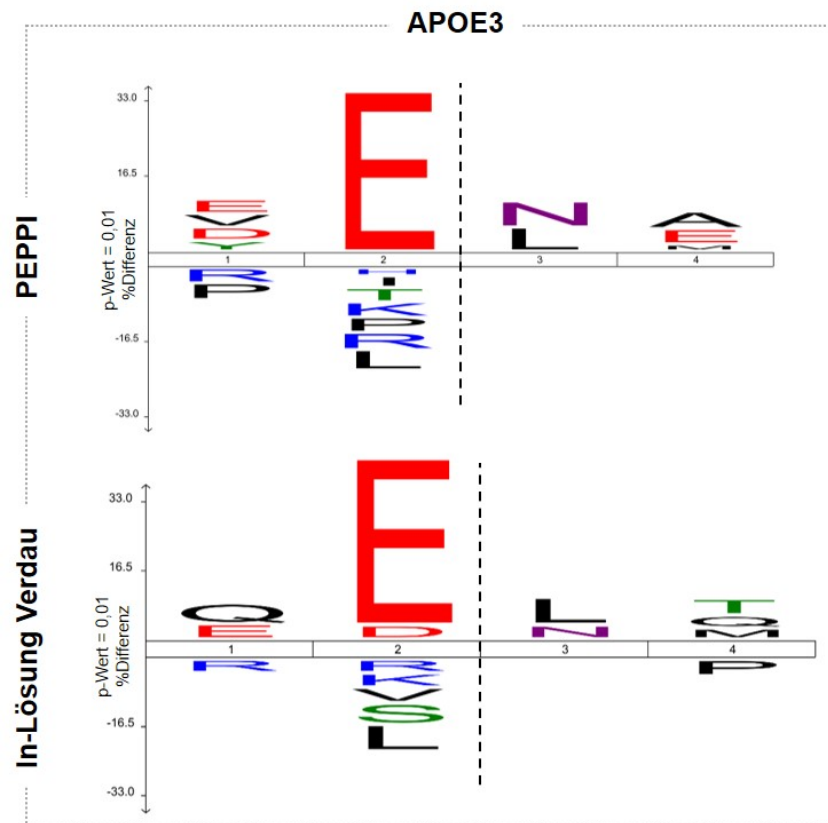
**Tabelle A.16.:** Identifizierte potentielle APOE4 Interaktionspartner der Co-IP/BU-MS-Analyse der APOE4 transfizierten Huh7-Zellen. Abundanz-Verhältnisse APOE4 gegen jene der unbehandelten Kontrolle (K. unbeh.).

<b>Protein</b>	<b>Protein- Accession</b>	<b>Gen</b>	<b>APOE4/K. unbeh.</b>
Mitochondrial import receptor subunit TOM40 homolog	O96008	<i>TOMM40</i>	20000,0
Surfeit locus protein 4	O15260	<i>SURF4</i>	20000,0
Voltage-dependent anion-selective channel protein 1	P21796	<i>VDAC1</i>	999,0
Transmembrane protein 43	Q9BTV4	<i>TMEM43</i>	665,7
Isoform 1 of Voltage-dependent anion-selective channel protein 2	P45880-1	<i>VDAC2</i>	399,0
Voltage-dependent anion-selective channel protein 3	Q9Y277	<i>VDAC3</i>	332,3
Lon protease homolog, mitochondrial	P36776	<i>LONP1</i>	75,9
Stomatin	P27105	<i>STOM</i>	44,5
Immunoglobulin lambda-like polypeptide 5	B9A064	<i>IGLL5</i>	20,7
Membrane-associated progesterone receptor component 1	O00264	<i>PGRMC1</i>	5,2
Cytoskeleton-associated protein 4	Q07065	<i>CKAP4</i>	4,9
H(+)/Cl(-) exchange transporter 7	P51798	<i>CLCN7</i>	3,1
Calnexin	P27824	<i>CANX</i>	2,0

**Tabelle A.17.:** Identifizierte potentielle Protein-Protein-Interaktionspartner von APOE der Co-IP/*Middle-Down*-MS-Analyse. Aufgeführte Proteine wurden innerhalb des APOE3-, als auch des APOE4-Experimentes identifiziert. Grau hinterlegte Proteine wurden ebenfalls in Co-IP/BU-MS-Analysen beobachtet.

Protein-Accession	Gen	Protein
Q9H0R1	<i>AP5M1</i>	AP-5 complex subunit mu-1
Q9Y4K1	<i>CRYBG1</i>	Beta/gamma crystallin domain-containing protein 1
P27824	<i>CANX</i>	Calnexin
Q96DZ9	<i>CMTM5</i>	CKLF-like MARVEL transmembrane domain-containing protein 5
Q9UM11	<i>FZR1</i>	Fizzy-related protein homolog
Q96M96	<i>FGD4</i>	FYVE, RhoGEF and PH domain-containing protein 4
Q3V6T2	<i>CCDC88A</i>	Girdin
Q8N196	<i>SIX5</i>	Homeobox protein SIX5
P82094	<i>TMF1</i>	Isoform 2 of TATA element modulatory factor
P16157	<i>ANK1</i>	Isoform Er11 of Ankyrin-1
O60299	<i>LZTS3</i>	Leucine zipper putative tumor suppressor 3
Q96KA5	<i>CLPTM1L</i>	Lipid scramblase CLPTM1L
O96008	<i>TOMM40</i>	Mitochondrial import receptor subunit TOM40 homolog
Q8N1F7	<i>NUP93</i>	Nuclear pore complex protein Nup93
O95948	<i>ONECUT2</i>	One cut domain family member 2
Q9BXW6	<i>OSBPL1A</i>	Oxysterol-binding protein-related protein 1
Q13162	<i>PRDX4</i>	Peroxiredoxin-4
P09874	<i>PARP1</i>	Poly [ADP-ribose] polymerase 1
Q9H2K2	<i>TNKS2</i>	Poly [ADP-ribose] polymerase tankyrase-2
A6NEV1	<i>PRR23A</i>	Proline-rich protein 23A
P05166	<i>PCCB</i>	Propionyl-CoA carboxylase beta chain, mitochondrial
Q9ULI3	<i>HEG1</i>	Protein HEG homolog 1
Q9UPX0	<i>IGSF9B</i>	Protein turtle homolog B
Q9ULW8	<i>PADI3</i>	Protein-arginine deiminase type-3
P11234	<i>RALB</i>	Ras-related protein Ral-B
Q9HCE6	<i>ARHGEF10L</i>	Rho guanine nucleotide exchange factor 10-like protein
P27105	<i>STOM</i>	Stomatin
Q9BZM4	<i>ULBP3</i>	UL16-binding protein 3
Q9UKN7	<i>MYO15A</i>	Unconventional myosin-XV
P21796	<i>VDAC1</i>	Voltage-dependent anion-selective channel protein 1
Q13698	<i>CACNA1S</i>	Voltage-dependent L-type calcium channel subunit alpha-1S
A6NN14	<i>ZNF729</i>	Zinc finger protein 729





**Abbildung A.9.:** IceLogo<sup>[175]</sup> der C-terminalen Spaltspezifität der APOE3 Co-IP/MD-Experimente.

**Tabelle A.18.:** Potentielle APOE Interaktionspartner identifiziert in den Co-IP/PEPPI-Experimenten. Überschneidung der Proteinlisten der APOE3- und APOE4-Proben.

Protein-Accession	Gen	Protein
P61604	HSPE1	10 kDa heat shock protein, mitochondrial
P31947	SFN	14-3-3 protein sigma
Q9P212	PLCE1	1-phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate phosphodiesterase epsilon-1
Q9NVE7	PANK4	4'-phosphopantetheine phosphatase
P78348	ASIC1	Acid-sensing ion channel 1
Q9BSE5	AGMAT	Agmatinase, mitochondrial
P05089	ARG1	Arginase-1
P25705	ATP5F1A	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial
O60706	ABCC9	ATP-binding cassette sub-family C member 9
Q9UHR4	BAIAP2L1	Brain-specific angiogenesis inhibitor 1-associated protein 2-like protein 1

**Tabelle A.18.:** Fortsetzung Tabelle: Potentielle APOE Interaktionspartner identifiziert in den Co-IP/PEPPI-Experimenten. Überschneidung der Proteinlisten der APOE3- und APOE4-Proben.

<b>Protein- Accession</b>	<b>Gen</b>	<b>Protein</b>
Q9Y6D5	ARFGEF2	Brefeldin A-inhibited guanine nucleotide-exchange protein 2
Q5T0N1	CFAP70	Cilia- and flagella-associated protein 70
A8TX70	COL6A5	Collagen alpha-5(VI) chain
P15924	DSP	Desmoplakin
Q9H5L6	THAP9	DNA transposase THAP9
Q5VV43	KIAA0319	Dyslexia-associated protein KIAA0319
O75150	RNF40	E3 ubiquitin-protein ligase BRE1B
Q75N03	CBLL1	E3 ubiquitin-protein ligase Hakai
P61565	ERVK-21	Endogenous retrovirus group K member 21 Env polyprotein
Q9BQ87	TBL1Y	F-box-like/WD repeat-containing protein TBL1Y
P08F94	PKHD1	Fibrocystin
P21333	FLNA	Filamin-A
P47929	LGALS7	Galectin-7
P00367	GLUD1	Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial
P04792	HSPB1	Heat shock protein beta-1
P08238	HSP90AB1	Heat shock protein HSP 90-beta
Q9H9B1	EHMT1	Histone-lysine N-methyltransferase EHMT1
P06312	IGKV4-1	Immunoglobulin kappa variable 4-1
Q8NDY3	ADPRHL1	Inactive ADP-ribosyltransferase ARH2
P16144	ITGB4	Integrin beta-4
Q9BZV3	IMPG2	Interphotoreceptor matrix proteoglycan 2
A0FGR8	ESYT2	Isoform 2 of Extended synaptotagmin-2
O95206	PCDH8	Isoform 2 of Protocadherin-8
P52747	ZNF143	Isoform 3 of Zinc finger protein 143
P09086	POU2F2	Isoform 5 of POU domain, class 2, transcription factor 2
Q8N1N4	KRT78	Keratin, type II cytoskeletal 78
P05787	KRT8	Keratin, type II cytoskeletal 8
Q9HBH9	MKNK2	MAP kinase-interacting serine/threonine-protein kinase 2

**Tabelle A.18.:** Fortsetzung Tabelle: Potentielle APOE Interaktionspartner identifiziert in den Co-IP/PEPPI-Experimenten. Überschneidung der Proteinlisten der APOE3- und APOE4-Proben.

<b>Protein- Accession</b>	<b>Gen</b>	<b>Protein</b>
A4D2B0	MBLAC1	Metallo-beta-lactamase domain-containing protein 1
Q9H019	MTFR1L	Mitochondrial fission regulator 1-like
Q96HD9	ACY3	N-acyl-aromatic-L-amino acid amidohydrolase (carboxylate-forming)
P20929	NEB	Nebulin
Q6ZN44	UNC5A	Netrin receptor UNC5A
O75376	NCOR1	Nuclear receptor corepressor 1
Q96NR3	PTCHD1	Patched domain-containing protein 1
Q06830	PRDX1	Peroxiredoxin-1
P11086	PNMT	Phenylethanolamine N-methyltransferase
Q9Y2H2	INPP5F	Phosphatidylinositol phosphatase SAC2
O00443	PIK3C2A	Phosphatidylinositol 4-phosphate 3-kinase C2 domain-containing subunit alpha
Q6ZPD9	DPY19L3	Probable C-mannosyltransferase DPY19L3
Q9P2K9	DISP3	Protein dispatched homolog 3
A6ND36	FAM83G	Protein FAM83G
Q7Z3U7	MON2	Protein MON2 homolog
Q96LQ0	PPP1R36	Protein phosphatase 1 regulatory subunit 36
P31151	S100A7	Protein S100-A7
P05109	S100A8	Protein S100-A8
Q8TDW7	FAT3	Protocadherin Fat 3
Q9Y5H4	PCDHGA1	Protocadherin gamma-A1
Q9P2E7	PCDH10	Protocadherin-10
P23469	PTPRE	Receptor-type tyrosine-protein phosphatase epsilon
P23470	PTPRG	Receptor-type tyrosine-protein phosphatase gamma
Q9UGC6	RGS17	Regulator of G-protein signaling 17
Q86UA6	RPAIN	RPA-interacting protein
P29508	SERPINB3	Serpin B3
Q9NVD3	SETD4	SET domain-containing protein 4
Q6U841	SLC4A10	Sodium-driven chloride bicarbonate exchanger

**Tabelle A.18.:** Fortsetzung Tabelle: Potentielle APOE Interaktionspartner identifiziert in den Co-IP/PEPPI-Experimenten. Überschneidung der Proteinlisten der APOE3- und APOE4-Proben.

<b>Protein- Accession</b>	<b>Gen</b>	<b>Protein</b>
Q9H2B4	SLC26A1	Sulfate anion transporter 1
Q5UIP0	RIF1	Telomere-associated protein RIF1
Q53EQ6	TIGD5	Tigger transposable element-derived protein 5
Q15562	TEAD2	Transcriptional enhancer factor TEF-4
Q07283	TCHH	Trichohyalin
P0CB47	UBTFL1	Upstream-binding factor 1-like protein 1
Q6UXI7	VIT	Vitrin
Q9H869	YY1AP1	YY1-associated protein 1
Q5SVQ8	ZBTB41	Zinc finger and BTB domain-containing protein 41
P25311	AZGP1	Zinc-alpha-2-glycoprotein

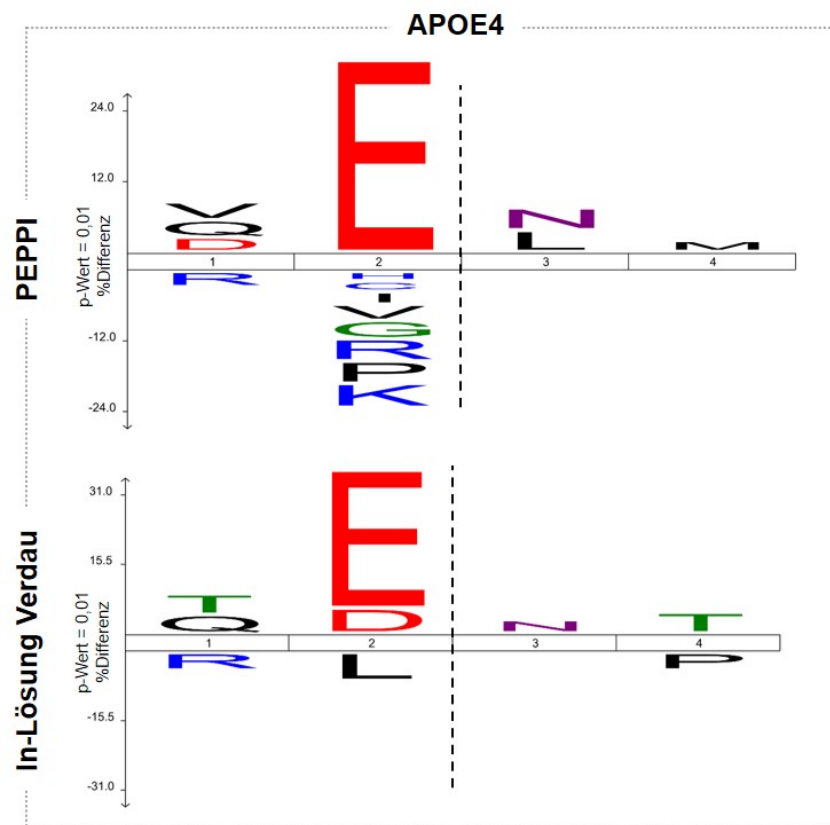


Abbildung A.10.: IceLogo<sup>[175]</sup> der C-terminalen Spaltspezifität der APOE4 Co-IP/MD-Experimente.



# Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur mithilfe der von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel unter Anleitung meines akademischen Betreuers verfasst habe. Sämtliche wörtlich oder inhaltlich übernommene Stellen habe ich als solche gekennzeichnet. Nicht selbstständig durchgeführte, aber für das Verständnis der Arbeit erforderliche, praktische Arbeiten sind im Text eindeutig gekennzeichnet. Die vorliegende Arbeit lag weder im Ganzen noch in Teilen im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vor. Sie wurde in ihrer Gesamtheit nicht veröffentlicht oder zur Veröffentlichung eingereicht. Teile dieser Arbeit wurden in einer fachwissenschaftlichen Zeitschrift veröffentlicht. Die Arbeit entstand unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft. Bis zum Tage der Vorlage dieser Arbeit wurde mir kein akademischer Grad entzogen.

Kiel, den 19.03.2024

---

Stephanie Bilke

## Liste der in den Promotionssemestern entstandenen Publikation

P. Huebbe, S. Bilke, J. Rueter, A. Schloesser, G. Campbel, C.-C. Glüer, R. Lucius, C. Röcken, A. Tholey, G. Rimbach, „Human APOE4 Protects High-Fat and High-Sucrose Diet Fed Targeted Replacement Mice against Fatty Liver Disease Compared to APOE3“, *Aging and disease*, 2024, <https://doi.org/10.14336/AD.2023.0530>.