

Apolipoprotein E protein-protein interactions and its subcellular localization – studies in cultured cells and targeted gene replacement mice

Dissertation Johanna Rüter

1. Gutachter: Prof. Dr. Gerald Rimbach

Humanes Apolipoprotein E (APOE), welches eine wichtige Rolle im Lipidstoffwechsel spielt, ist polymorph mit den drei Hauptallelen *APOE ϵ 2*, *APOE ϵ 3* und *APOE ϵ 4*, die zu drei verschiedenen menschlichen APOE-Isoformen führen. Das *ϵ 4* Allel ist ein genetischer Risikofaktor für die Alzheimer-Demenz (AD), daher konzentriert sich der Großteil der APOE-Forschung bislang auf die AD Pathologie. Darüber hinaus gibt es immer mehr Hinweise auf andere Funktionen von APOE durch die Beteiligung von APOE an biologischen Prozessen wie Transkriptionsregulierung, mitochondrialem Stoffwechsel, Immunantwort und Reaktion auf Ernährungsfaktoren. Ziel dieser Arbeit war es, mögliche neue Funktionen des menschlichen APOE zu identifizieren. Zu diesem Zweck wurden APOE Protein-Protein-Interaktionen, die subzelluläre Lokalisierung von APOE und epigenetische Aspekte des *APOE* Gens *in vitro* in APOE-transfizierten Hepatozyten und *in vivo* in APOE „Targeted Gene Replacement“ (TR) Mäusen untersucht.

Durch APOE Co-Immunopräzipitations-Studien (Co-IP) in der Leber von APOE-TR-Mäusen wurden über 300 Proteine identifiziert, die möglicherweise mit APOE assoziiert sind. Die drei vielversprechendsten Kandidaten waren die α -Untereinheit der verzweigtkettigen alpha-Ketosäure-Dehydrogenase (BCKDHA), der spannungs-abhängige Anionen Kanal 1 (VDAC1) und die β -Untereinheit der ATP-Synthase (ATP5B). Diese drei mitochondrialen Proteine wurden in weitere funktionelle Studien einbezogen, und die Interaktion mit APOE wurde auf APOE-Isoform-abhängige Unterschiede, den Einfluss diätetischer Restriktion (DR) und die Bedeutung dieser Interaktionen auf nachgeschaltete Signalwege untersucht. DR führte, im Vergleich zu einer *ad libitum* (AL) Fütterung, zu einer Verstärkung der APOE Protein-Protein-Interaktionen, die am ausgeprägtesten bei VDAC1 zu beobachten war. Dies könnte auf eine mögliche Funktion von APOE im Energiestoffwechsel hindeuten. Bei der Interaktion von APOE mit VDAC1 und ATP5B wurden teilweise Unterschiede zwischen APOE3 und APOE4 festgestellt, die ATP-Spiegel waren jedoch durch die APOE-Isoform nicht verändert, was gegen eine Beeinträchtigung der ATP-Synthese oder -Translokation durch die Interaktion mit APOE spricht. Da BCKDHA am Abbau von verzweigtkettigen Aminosäuren (BCAA) beteiligt ist, wurde die Enzymaktivität des BCKD-Komplexes gemessen. Trotz der vergleichbaren BCKDHA-APOE Interaktion bei AL-gefütterten APOE3- und APOE4-Mäusen war die Aktivität bei APOE4 signifikant erhöht. Die Expression von BCAA Katabolismus Proteinen und die BCAA-Plasmaspiegel waren jedoch nicht verändert.

Die VDAC1-APOE Interaktion deutet auf eine mögliche Funktion von APOE in Mitochondrien-assoziierten ER Membranen (MAMs) hin, da VDAC1 selbst dort lokalisiert ist. Die Isolierung reiner subzellulärer Fraktionen aus Huh7-Zellen zeigte eine vierfache Anreicherung von APOE in den MAM-Fractionen im Vergleich zu den Gesamtzellfraktionen. Die Anreicherung in MAMs war bei APOE3 und APOE4 vergleichbar, ebenso die Expression von MAM-Marker Proteinen. Die Anzahl der Kontakte zwischen ER und Mitochondrien wurde mittels Proximity Ligation Assay (PLA) untersucht und ergab keine Isoform-abhängigen Unterschiede, was zusammenfassend darauf hindeutet, dass die APOE-Isoform keinen Einfluss auf die hepatischen MAMs hat.

Die *APOE*-Allele unterscheiden sich nur in einer bzw. zwei Basen, wobei *APOE ϵ 4* die meisten Cytosinreste aufweist. Die Analyse der *APOE* DNA-Methylierung in murinem Hippocampus ergab eine allel-abhängige unterschiedliche Methylierung an den Stellen des „single nucleotide polymorphism“ (SNP), wobei *APOE ϵ 4* aufgrund des höheren Cytosingehalts einen höheren Methylierungsgrad aufwies, gefolgt von *APOE ϵ 3* und *APOE ϵ 2*. Mittels Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP) wurde die Bindung des Methyl-CpG-bindenden Proteins 2 (MECP2) an die *APOE*-DNA untersucht, und es zeigte sich, dass MECP2 trotz der höheren Methylierung in *APOE ϵ 4* tendenziell weniger mit *APOE ϵ 4* assoziiert war als mit *APOE ϵ 3*. Die APOE-Proteinexpression war jedoch nicht verändert, was eher gegen eine Regulation der Transkription oder alternatives Spleißen durch Methylierung oder MECP2-Bindung spricht.

Insgesamt liefert die vorliegende Arbeit einen Beitrag dazu, dass APOE durch Interaktion mit mitochondrialen Proteinen und die Akkumulation in MAMs eine Rolle im mitochondrialen und MAM-Stoffwechsel spielt. Jedoch beeinflusst die APOE-Isoform diese Prozesse in der Leber kaum. Die Modulation der APOE Protein-Protein-Interaktionen durch DR und die APOE-Isoform-abhängige Regulation der BCKD-Aktivität unterstreichen die Bedeutung von APOE im Ernährungskontext. Darüber hinaus beeinflusst die *APOE*-Variation epigenetische Veränderungen im *APOE*-Gen.