

Titelblatt zum Schlussbericht

(Gemäß Nrn. 6.6 BNBest-BMBF 98 bzw. 11.6 NKBF 98)

Thema: *Nachwuchsgruppe ProAID (Protein Oxidation in Aging as Target for an Individualized Dietary Intervention)*

Förderkennzeichen	Autoren	Zuwendungsempfänger	Laufzeit	Hinweis auf Vertraulichkeit
01EA1706	Andrea Henze Harshadrai Rawel Kristine Wolf Isabel Huber Sabrina Gensichen Maximilian Martin Michal Rackiewicz	Universität Potsdam	01.12.2017 – 31.12.2023	<i>Vertrauliche Passagen in Teil II des Schlussberichtes wurden grau hinterlegt. Darüber hinaus sind Tabelle 1 sowie die Abbildungen 2, 3, 4 und 5 als vertraulich zu behandeln.</i>

Kontaktperson:

Name: Prof. Dr. Andrea Henze

Straße: Von-Danckelmann-Platz 2

PLZ Ort: 06120 Halle (Saale)

E-Mail: andrea.henze@landw.uni-halle.de

Telefon: 0345 5522702

Nachwuchsgruppe ProAID (01EA1706)

Schlussbericht Teil I

ProAID (*Protein Oxidation in Aging as a Target for an Individualized Dietary Intervention*) war eine Nachwuchsgruppe im Rahmen des Kompetenzclusters für Ernährung NutriAct am Institut für Ernährungswissenschaft der Universität Potsdam und wurde durch das Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) vom 01.12.2017 bis 31.12.2023 gefördert.

Im Fokus der Arbeiten der Nachwuchsgruppe stand der Zusammenhang von Ernährung und Altern bzw. der Entstehung altersbedingter Erkrankungen. Altern ist ein physiologischer, nicht umkehrbarer Prozess, der durch charakteristische Veränderungen der Zell- und Organfunktion geprägt ist. In welchem Umfang dabei altersbedingte Veränderungen eintreten und ggf. die Entstehung altersbedingter Erkrankungen begünstigen, ist individuell extrem verschieden. Ernährung kann diese Prozesse auf vielfältige Weise – sowohl positiv als auch negativ – beeinflussen. Die zugrundeliegenden Mechanismen sind bislang jedoch nicht systematisch erfasst und nur unvollständig verstanden. Das Ziel der Nachwuchsgruppe war es daher Mechanismen zu identifizieren, die den Zusammenhang zwischen Ernährung und Altern sowie individuelle Unterschiede erklärbar machen. Dafür wurden ernährungsbedingte Effekte auf Ebene körpereigener Proteine (Proteom) sowohl *in vivo* als auch *in vitro* untersucht. In diesem Zusammenhang wurden insbesondere oxidative Modifikationen von Proteinen (Redoxproteom) berücksichtigt, da sie nicht nur wesentlich an der Regulation des Stoffwechsels beteiligt sind, sondern auch Ursache und Folge altersbedingter sowie pathologischer Veränderungen sein können. Von besonderem Interesse war dabei *a)* oxidative Proteinmodifikationen zu identifizieren, die mit der Ausprägung des Alterungsprozesses assoziiert sind, *b)* oxidative Proteinmodifikationen zu identifizieren, die im engen Zusammenhang mit Ernährung/Ernährungsmustern stehen und ggf. als Biomarker verwendet werden können und *c)* die Bedeutung oxidativer Proteinmodifikationen im Stoffwechsel zu charakterisieren. Die komplexen Untersuchungen zu Proteom und Redoxproteom wurden in Zusammenarbeit mit dem Leibniz-Institut für Gemüse- und Zierpflanzenbau e.V. Großbeeren sowie der *Core Facility* für Massenspektrometrie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg realisiert.

Um die Bedeutung des Proteoms und Redoxproteoms als Vermittler ernährungsbedingter Effekte auf Altern und altersbedingte Erkrankungen systematisch darstellen zu können, wurden verschiedene Strategien verfolgt.

Aus Kooperationen mit dem Deutschen Institut für Ernährungsforschung (DIfE), der Charité-Universitätsmedizin Berlin und der Nachwuchsgruppe NuCo der Friedrich-Schiller-Universität Jena standen Plasma- bzw. Serumproben verschiedener Humanstudien (LeguAN, NutriAct, NuEva) zur Verfügung, deren Schwerpunkt eine diätetische Intervention war. Die Ernährungsinterventionsstudien unterschieden sich dabei in der Studienpopulation (Alter, Gesundheitsstatus) und Art der Ernährungsintervention (u.a. verschiedene Ernährungsform, proteinreiche Ernährung). Dadurch war es möglich den Zusammenhang von Ernährung, Alter, Geschlecht und altersbedingten Erkrankungen (u.a. Diabetes mellitus Typ 2) auf Ebene des Proteoms bzw. Redoxproteoms zu untersuchen. Die Proben- und Datenanalyse ist noch nicht für alle drei Studienkollektive vollständig abgeschlossen. Bereits jetzt deutet sich jedoch an, dass ein erheblicher Anteil der Plasma- und Serumproteine eine oxidative Modifikation aufweisen und Ernährung v.a. den Redoxstatus von Proteinen beeinflusst, die Bestandteil des Immunsystems bzw. an Entzündungsreaktionen beteiligt sind.

Um die komplexen Zusammenhänge von Ernährung, Altern und der Entstehung altersbedingter Erkrankungen auch auf Gewebeebene nachvollziehen zu können, wurde zusätzlich ein Langzeitfütterungsversuch im Tiermodell (Ratte) durchgeführt. Dabei sollte der Effekt einer westlichen Ernährungsweise (*Western Diet*) auf den Alterungsprozess und den Gesundheitszustand unter Berücksichtigung des Geschlechts untersucht werden. Die Ernährungsintervention orientierte sich hierbei an der durchschnittlichen Nährstoffzufuhr in Deutschland gemäß der Nationalen Verzehrsstudie II (NVSII) und wurde in enger Zusammenarbeit mit dem Max-Rubner-Laboratorium des Deutschen Institut für Ernährungsforschung durchgeführt. Die Tiere erhielten über einen Zeitraum von bis zu 18 Monaten eine *Western Diet* nach NVSII oder eine standardisierte Nagerdiät. und wurden regelmäßig u.a. hinsichtlich allgemeiner Gesundheitsparameter, Glucosestoffwechsel, Blutdruck und Aktivität untersucht. Der Einfluss der *Western Diet* spiegelte sich dabei fast ausschließlich bei Unterschieden im Körpergewicht wieder; deutlich ausgeprägter waren hingegen Geschlechtsunterschiede nahezu unabhängig von der Ernährungsintervention. Auf Ebene des Proteoms und Redoxproteoms der Leber konnte der Einfluss der *Western Diet* auf den Stoffwechsel nachvollzogen werden und ermöglichte die Identifizierung von Anpassungsstrategien des Organismus an die Unterschiede der Nahrungszufuhr. Neben dem Einfluss der Ernährung wurden hier auch geschlechtsspezifische Unterschiede in den Adaptationsmechanismen deutlich.

Die Bedeutung oxidativer Proteinmodifikationen für den Stoffwechsel wurde darüber hinaus auch *in vitro* in Zellkulturexperimenten untersucht. Für die Charakterisierung wurde exemplarisch der Prozess der Insulinsekretion gewählt, da diese sowohl durch Nährstoffe und Nahrungsaufnahme stimuliert wird, altersbedingten Veränderungen unterworfen ist und Ziel pathologischer Veränderungen sein kann. Dabei wurde deutlich, dass der Prozess der Insulinsekretion durch dynamische Veränderungen des Redoxstatus zahlreicher Proteine geprägt ist und ein enger Zusammenhang mit anderen regulierenden Mechanismen (v.a. Proteinphosphorylierung) besteht. Inwiefern diese Veränderungen sich altersabhängig verändern und welche Auswirkungen diese auf die zelluläre Resilienz haben, soll in Folgeprojekten untersucht werden.

Ebenfalls durch *in-vitro*-Versuche wurde die Biofunktionalität der Apocarotinoide als Vertreter der Gruppe der sekundären Pflanzenstoffe analysiert. Sekundäre Pflanzenstoffe zeichnen sich durch zahlreiche positive Effekte auf den menschlichen Organismus aus und tragen wesentlich zur gesundheitsfördernden Wirkung einer pflanzenbasierten Ernährung bei. Die Wirkung sekundärer Pflanzenstoffe wird dabei zum Teil auf ihre häufig antioxidative Wirkung zurückgeführt. Im Rahmen der Arbeiten der Nachwuchsgruppe sollte jedoch untersucht werden, ob diese Wirkung auch durch die Interaktion mit körpereigenen Proteinen und der damit verbundenen Modulierung der Proteineigenschaften vermittelt werden kann. In Kooperation mit dem Leibniz-Institut für Gemüse- und Zierpflanzenbau e.V. Großbeeren konnte dabei gezeigt werden, dass Apocarotinoide eine direkte Verbindung mit Proteinen eingehen können und die Aktivität ausgewählter Enzyme beeinflussen können.

In zukünftigen Projekten sollen die Ergebnisse der Nachwuchsgruppe integriert werden, um die Bedeutung des Redoxproteoms für die Vermittlung ernährungsbedingter Effekte systematisch zu beschreiben. Darüber hinaus soll dadurch die Ableitung individueller Präventions- und ggf. Therapiemaßnahmen unterstützt werden.

Nachwuchsgruppe ProAID (01EA1706)

Schlussbericht Teil II

Inhalt

1	Einleitung	2
2	Organisation und Struktur der Nachwuchsgruppe	4
3	Proteinanalytik.....	5
4	Projekt 1: Charakterisierung von oxPTM in Serumproben humaner Ernährungsinterventionsstudien.....	7
5	Projekt 2: Charakterisierung gewebespezifischer oxPTM unter Berücksichtigung von Alter, Geschlecht, Ernährung und altersbedingten Erkrankungen.....	10
6	Projekte 3 & 4: Ableitung von Ernährungsempfehlungen auf Basis von altersspezifischer oxPTM im Kontext von Ernährungsmuster/ Validierung phänotypoptimierter Ernährungsempfehlungen auf Basis von oxPTMs und Bewertung des Alterungsphänotyps	13
7	Projekt 5: Bedeutung von oxPTM für die Regulation des Stoffwechsels und Interaktion mit anderen PTM sowie Identifizierung neuer PTM durch sekundäre Pflanzenstoffe.....	14
8	Literatur.....	16

1 Einleitung

1.1 Wissenschaftlicher Hintergrund

Altern ist ein komplexer, physiologischer Vorgang, der zum Verlust der Zell- und Gewebeintegrität sowie Einschränkung der Organfunktion führt (1, 2). Dadurch kommt es zu charakteristischen altersbedingten Veränderungen wie Abnahme der Gefäßelastizität, Abnahme der renalen Filtrationsleistung und Reduktion der Lungenfunktion wodurch die Manifestation altersbedingter Erkrankungen wie Hypertonie, chronische Niereninsuffizienz und chronisch-obstruktive Lungenerkrankung begünstigt werden (1).

Der Alterungsprozess ist nicht umkehrbar, in seiner Ausprägung und Dynamik sehr variabel und durch einen individuellen Alterungsphänotyp (Zeitpunkt und Ausprägung altersbedingter Veränderungen sowie Manifestation und Progression altersbedingter Erkrankungen) gekennzeichnet. Bis zu 30 % des Alterungsphänotyps können durch genetische Faktoren erklärt werden (z.B. Apolipoprotein-E-Allel) (3, 4). Die größere Bedeutung haben jedoch Lebensstil (u.a. physische Aktivität, Stress, Umweltbelastung, Rauchen) und Ernährung (5-9), die zelluläre Mechanismen des Alterungsprozesses beeinflussen.

Auf zellulärer Ebene ist der Alterungsprozess u.a. geprägt durch Instabilität des Genoms, epigenetische Veränderungen und Verlust der Proteostase, wodurch eine Fehlregulation der Nährstoffverwertung (*Nutrient Sensing*), mitochondriale Dysfunktion und zelluläre Seneszenz begünstigt werden und die u.a. zur Manifestation von Stammzellerschöpfung und chronischer Entzündung beitragen (10). Insbesondere die vermehrte Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) und reaktiver Stickstoffspezies (RNS) – sogenannter oxidativer Distress (11) – kann die individuelle Alterung beschleunigen, da sie u.a. die Entstehung von DNA-Schäden begünstigen und zum Verlust der Proteostase sowie zellulären Seneszenz direkt beitragen (2). Gleichzeitig sind ROS und RNS in geringen Mengen jedoch auch essentiell für die Aufrechterhaltung des Metabolismus und wirken bezogen auf den Alterungsprozess als sogenannter oxidativer Eustress protektiv (2, 11). Ernährung kann dabei sowohl die Entstehung von oxidativem Distress als auch von oxidativem Eustress beeinflussen. Während Über- und Fehlernährung (u.a. Kalorienexzess, Verzehr von Lebensmitteln mit geringer Nährstoffdichte) die übermäßige Entstehung von ROS und RNS begünstigen, fördert eine Ernährung reich an Ballaststoffen, Obst und Gemüse und die damit verbundene Zufuhr von Antioxidantien sowie essentieller Mikronährstoffe ein Milieu des oxidativen Eustress und ist mit einer geringeren Morbiditäts- und Mortalitätsrate assoziiert (7, 9).

Die Mechanismen über die ROS und RNS die zelluläre Funktion regulieren bzw. destabilisieren, beruhen i.d.R. auf Ihrer Interaktion mit Makromolekülen (v.a. DNA, Lipide, Proteine) der Zelle (12). Oxidativer Distress führt dabei zur vermehrten Oxidation der DNA und begünstigt dadurch u.a. die Entstehung von Strangbrüchen und Basenfehlpaarungen und damit die Instabilität des Genoms (2). Durch Oxidation von Lipiden kann u.a. die Bildung von Prostanoiden und damit entzündliche Reaktion unterstützt werden (12). Oxidativer Distress fördert außerdem die vermehrte und v.a. irreversible Oxidation von Proteinen (u.a. Bildung von Carbonylen, 3-Nitrotyrosin) und trägt dadurch zum einen zu ihrem Funktionsverlust und zum anderen zur Störung des Proteinturnovers durch proteasomalen Abbau bzw. Autophagie bei (2, 12). Oxidativer Eustress hingegen ist ein wesentlicher Bestandteil der zellulären Regulation und wirkt v.a. durch reversible Oxidation von Proteinen. Dadurch können Proteineigenschaften (u.a. Stabilität, Lokalisierung) und Proteinfunktionen (u.a. Enzymaktivität) *ad hoc* an die physiologischen Bedürfnisse der Zelle angepasst werden (12).

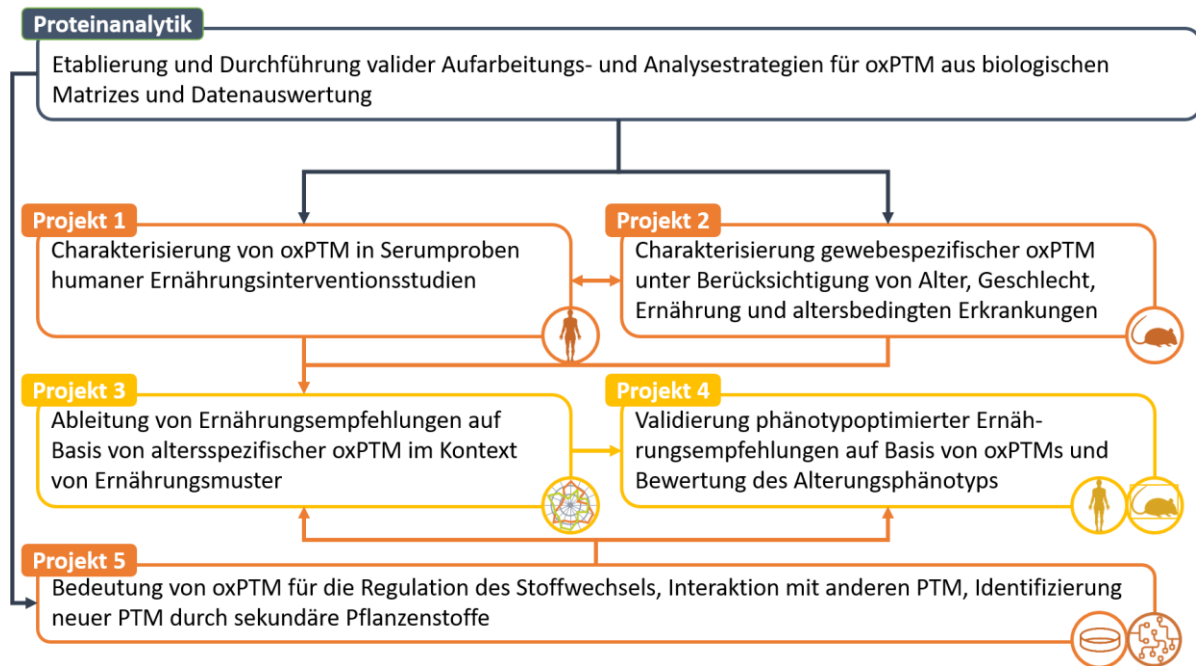
1.2 Fragestellung und Arbeitspakete/ Projekte

Während lange Zeit angenommen wurde, dass die Oxidation von Proteinen ein zufälliger und physiologisch eher irrelevanter Vorgang ist, konnten mittlerweile zahlreiche physiologische Prozesse – wie Energiestoffwechsel, Immunfunktion, Gefäßfunktion – identifiziert werden, die einer sogenannten Redoxregulation unterliegen (13, 14). Sowohl irreversible als auch reversible Oxidation von Proteinen (sogenannte oxidative posttranslationale Modifikationen, oxPTM) stellen daher eine Möglichkeit dar die Effekte von Ernährung auf den Organismus – und somit auch den Alterungsprozess – zu vermitteln und zu erklären.

Im Fokus der Nachwuchsgruppe stand die Analyse reversibler oxPTM als Sensoren und Mediatoren im Stoffwechsel. Das übergeordnete Ziel der Nachwuchsgruppe ProAID war es reversible oxPTM zu analysieren und ihre Abhängigkeit von Ernährung und unter besonderer Berücksichtigung des Alterungsprozesses und altersbedingter Erkrankungen zu charakterisieren. Dadurch sollte zum einen die Bedeutung von oxPTM im Stoffwechsel näher beschrieben werden und zum anderen das Potential von oxPTM als Biomarker für den individuellen Alterungsphänotyp eingeschätzt werden. Durch Kombination der Erkenntnisse sollten schließlich Ernährungsempfehlungen abgeleitet werden, die individuelle Unterschiede in Stoffwechsel und Alterungsprozess berücksichtigen. Voraussetzung – und Teil der Ziele der Nachwuchsgruppe ProAID – war die Etablierung valider Strategien zur Analyse reversibler oxPTM. Insgesamt ergaben sich die folgenden Arbeitspakete bzw. Projekte, deren Abhängigkeiten auch in Abbildung 1 dargestellt sind:

- Proteinanalytik: Etablierung und Durchführung valider Aufarbeitungs- und Analysestrategien für oxPTM aus biologischen Matrices und Datenauswertung
- Projekt 1: Charakterisierung von oxPTM in Serumproben humaner Ernährungsinterventionsstudien (Titel im Antrag: *Circulating oxPTMs in humans as indicators of the aging phenotype*)
- Projekt 2: Charakterisierung gewebespezifischer oxPTM unter Berücksichtigung von Alter, Geschlecht, Ernährung und altersbedingten Erkrankungen (Titel im Antrag: *Identification of circulating and tissue-specific oxPTMs that are associated with aging and age-related diseases and susceptible to diet*)
- Projekt 3: Ableitung von Ernährungsempfehlungen auf Basis altersspezifischer oxPTM im Kontext von Ernährungsmuster (Titel im Antrag: *Identification of dietary patterns associated with age-related oxPTMs and design of diets for specific dietary recommendations*)
- Projekt 4: Validierung phänotypoptimierter Ernährungsempfehlungen auf Basis von oxPTMs und Bewertung des Alterungsphänotyps (Titel im Antrag: *Efficiency of optimized diets to modulate oxPTMs and associated aging phenotypes*)
- Projekt 5: Bedeutung von oxPTM für die Regulation des Stoffwechsels und Interaktion mit anderen PTM sowie Identifizierung neuer PTM durch sekundäre Pflanzenstoffe (Titel im Antrag: *Cross-talk of oxPTMs with protein phosphorylation and secondary plant metabolites*)

Wie in Abbildung 1 ebenfalls deutlich wird, sind die Projekte 3 und 4 direkt abhängig von der Proteinanalytik/Methodenentwicklung sowie den Erkenntnissen aus den Projekten 1, 2 und 5. Die Projektnummerierung ist daher nicht als chronologische Nummerierung zu verstehen.



created by Dawid Zyla, designer 468, Adner Kadri, Oksana Latysheva from Noun Project

ABBILDUNG 1 ARBEITSZIELE UND PROJEKTE DER NACHWUCHSGRUPPE PROAID UND IHRE ABHÄNGIGKEITEN UNTEREINANDER.

In den folgenden Abschnitten wird die Struktur und Organisation der Nachwuchsgruppe sowie Ziele, geplante und durchgeführte Arbeiten der Proteinanalytik/Methodenentwicklung bzw. der Projekte zusammengefasst, Abweichungen vom ursprünglichen Arbeitsplan und wesentliche Erkenntnisse werden dargestellt. Darüber hinaus wird das weitere Vorgehen im Sinne eines fortgeschriebenen Verwendungsplans aufgezeigt und auf besondere Position in der Mittelverwendung hingewiesen.

1.3 Hinweise auf verwendete Mittel

Im Rahmen der Projektförderung erfolgten Zuwendungen in Höhe von ca. 2.000.000 € zuzüglich Projektpauschale im Umfang von ca. 400.000 €. Auf besondere Position der verwendeten Mittel wird in den folgenden Abschnitten gesondert eingegangen. Neben Personalmitteln im Umfang von 1.420.000 € wurden ca. 300.000 € für die Proteinanalytik, weitere 60.000 € für die spezifische Vorbereitung der Humanproben, insgesamt 67.000 € für die Realisierung des Tierversuchs und weitere 20.000 € für spezifische Analysen im Rahmen der Zellkulturexperimente verausgabt. Die übrigen Mittel in Höhe von ca. 130.000 € wurden für allgemeines Verbrauchsmaterial (v.a. Reaktionsgefäße, Pipettenspitzen, Plastik für die Zellkultur, Chemikalien zur Pufferherstellung etc.) verwendet.

2 Organisation und Struktur der Nachwuchsgruppe

Im Rahmen der Nachwuchsgruppe ProAID wurden rund 1.420.000 € für wissenschaftliche und technische Mitarbeiter sowie wissenschaftliche Hilfskräfte verwendet. Darüber hinaus erhielt die Nachwuchsgruppe personelle Unterstützung durch die Universität Potsdam und das Leibniz-Institut für Gemüse- und Zierpflanzenbau e.V. Für Weiterbildungsmaßnahmen, Teilnahme an Kongressen etc. wurden weitere 21.000 € verausgabt.

2.1 Aus- und Weiterbildungsmaßnahmen

Die Nachwuchsgruppe verstand sich als Möglichkeit der Weiterbildung und Weiterentwicklung aller Mitglieder. Dem entsprechend wurde die Erweiterung des individuellen Methoden- und Fähigkeitspektrums im Rahmen des Repertoires der Nachwuchsgruppe sowie die Wahrnehmung von Weiterbildungsmaßnahmen unterstützt und zur persönliche Weiterbildung durch Teilnahme an Kongressen, Tagungen und durch Kooperationen ermutigt.

Weiterbildungsmaßnahmen, die dabei wahrgenommen wurden, umfassten u.a.:

- Zertifizierte Weiterbildung zu Grundlagen der Versuchstierkunde entsprechend EU-Tätigkeit A (mit D) (ehemals FELASA B)
- Praxiskurs Zellkultur Bioassays von PromoCell
- *Brixen Proteomics* (Summer School)
- EMBO-Training *Self-Leadership for Scientists*

Kongresse und Tagungen, die wahrgenommen wurden, umfassten u.a.:

- Proteomic Forum
- Wissenschaftliche Kongresse der Deutschen Gesellschaft für Ernährung
- G-JAM 2023 (Groningen-Jena Aging Meeting)

Darüber hinaus hat sich die Nachwuchsgruppe in die Ausbildung durch Betreuung diverser Intensivpraktika (Richtungsmodule), Bachelor- und Masterarbeiten sowie der Ausbildung von Biologielaborantinnen an der Universität Potsdam eingebracht.

3 Proteinanalytik

Die Proteinanalytik war im Antrag nicht als eigenes Arbeitspaket bzw. Projekt dargestellt. Sie ist jedoch integraler Bestandteil aller Projekte und ein wesentlicher Faktor zum Erreichen der Ziele der Nachwuchsgruppe ProAID. Um Wiederholungen zu vermeiden, sollen daher Ziele, durchgeführte Arbeiten und Erkenntnisse der Proteinanalytik im Rahmen der Arbeiten der Nachwuchsgruppe in diesem Abschnitt dargestellt werden.

3.1 Notwendigkeit und Ziele der Proteinanalytik

Der Begriff Proteinanalytik beschreibt ein heterogenes Methodenspektrum und umfasst Methoden zur Proteinquantifizierung oder Erfassung der Enzymaktivität genauso wie die Charakterisierung ausgewählter Proteine mittels Antikörper-basierter Verfahren. Neben diesen „konventionellen“ Verfahren der Proteinanalytik, war jedoch ein wesentlicher Bestandteil der Arbeiten der Nachwuchsgruppe die massenspektrometrische Analyse von Proteinen in verschiedenen Probenmatrizes unter besonderer Berücksichtigung von reversiblen oxPTM, die charakterisiert und (relativ) quantifiziert werden sollten.

Reversible oxPTM beschreiben überwiegend oxidative Modifikationen der Seitenkette der Aminosäure Cystein. Sie sind nur bedingt stabil und ihre Häufigkeit durch das geringe Vorkommen von Cysteinresten in Proteinen begrenzt (15, 16). Daher ist es erforderlich etablierte Verfahren zur massenspektrometrischen Proteinanalytik an die besonderen Anforderungen der oxPTM-Analytik anzupassen, um repräsentative und valide Ergebnisse zu erzielen.

Für die massenspektrometrische Proteinanalytik und v.a. Analyse von oxPTM wurden im Rahmen der Nachwuchsgruppe zwei verschiedene Strategien angewendet: Die gerichtete Analyse ausgewählter

(bekannter) Proteine, die die genauere Charakterisierung der Oxidation ermöglicht, und die ungerichtete Analyse eines Proteingemischs mittels hochauflösender Massenspektrometrie (*i.e.* Orbitrap-MS/MS), die die Einschätzung der metabolischen Bedeutung von oxPTM eröffnet.

3.2 Gerichtete Analyse ausgewählter Proteine

Insbesondere in Projekt 1 sollten in Serum- bzw. Plasmaproben die oxPTM ausgewählter Proteine analysiert werden. Dabei war es das Ziel das Oxidationsmuster eines Proteins möglichst gut zu charakterisieren und ggf. Zusammenhänge zu klinischen bzw. biochemischen Parametern zu identifizieren. Auf der Grundlage von Vorarbeiten (17, 18) und der zur Verfügung stehenden Infrastruktur wurde für diesen Ansatz wie in der Vorhabenbeschreibung vorgesehen die Analyse mittels *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight*-Massenspektrometrie (MALDI-TOF-MS) ausgewählt. Dieses Vorgehen ermöglicht die Untersuchung intakter Proteine bis zu einem Molekulargewicht von ca. 30 000 Da und reduziert dadurch das Risiko während der Probenvorbereitung Änderungen des Oxidationsmusters zu induzieren. Voraussetzung dafür ist die Anreicherung bzw. Isolierung der ausgewählten Proteine aus der Probenmatrix. Dies erfolgte im Rahmen der Nachwuchsgruppe mittels Immunpräzipitation, die hinsichtlich folgender Aspekte optimiert wurde:

- Präsentation des Antikörpers zur Präzipitation mittels Zentrifugation: gerichtete Kopplung an Protein-A/G-Agarose vs. ungerichtete Kopplung an Sephadex G15
- Elution der Proteine: Variation pH-Wert, Variation Ionenstärke, Verwendung Chaotrope, keine Elution

Basierend auf den Ergebnissen wurde für die gerichtete Analyse von Proteinen mit einem Molekulargewicht von bis zu 30 000 Da eine Immunpräzipitation mit ungerichteter Kopplung des Antikörpers an Sephadex G15 ohne Elution durchgeführt. Die angereicherten Proteine wurden anschließend mittels MALDI-TOF-MS analysiert.

3.3 Ungerichtete Analyse komplexer Probenmatrizes mittels hochauflösender Massenspektrometrie

Die ungerichtete Proteinanalytik hat das Ziel möglichst viele (idealerweise alle) Proteine einer Probe zu erfassen und so molekularbiologische Zusammenhänge darstellbar zu machen. Durch Verwendung von Markierungsagenzien (sogenannten *Tags*) wird gleichzeitig die relative Quantifizierung der identifizierten Proteine ermöglicht. Die Analyse erfolgt auf Peptidebene und erfordert den enzymatischen Verdau der Proteine. Dabei führen Standard-*Workflows* i.d.R. zum Verlust von oxPTM. Um neben dem sogenannten Gesamtproteom auch Aussagen zu oxPTM bzw. dem Redoxproteom treffen zu können, wurde für die Arbeiten der Nachwuchsgruppe – wie in der Vorhabenbeschreibung vorgesehen – ein *Workflow* etabliert, der *a)* die Anreicherung Cystein-haltiger Peptide, *b)* Differenzierung reduzierter und reversibel oxidierter Cysteinreste und *c)* die relative Quantifizierung mittels isobaren *Tags* (*Tandem Mass Tags*, TMT) ermöglicht.

Dafür wurden verschiedene Alkylierungsreagenzien hinsichtlich ihrer Reaktionseffizienz mit reduzierten Thiolgruppen, Membrangängigkeit und Ionisierungseigenschaften in der Massenspektrometrie verglichen. Weiterhin wurde das bereits von Zougman et al. etablierte Cys-STrap-Verfahren (19, 20) so angepasst, dass eine Markierung mittels TMT in den verschiedenen Probenmatrizes möglich war. Das Ergebnis war ein *Workflow* der N-Ethylmaleimid (NEM) zur Alkylierung reduzierter Thiolgruppen in der Ausgangsprobe verwendet und nach tryptischem Verdau

der Proteine die Anreicherung über ein Thiolaustauschverfahren auf Basis von Aminopropyltrimethoxysilan und N-Succinimidylpyridyldithiolpropionat durch Elution (und Alkylierung) reversibel oxidierter Cysteinpeptide mittel N-Propylmaleimid (NPM) ermöglicht. Die so vorbereiteten Proben konnten mit TMT markiert und mittels Orbitrap-MS/MS analysiert werden.

Der so etablierte *Workflow* wurde v.a. für Projekt 1 (Humanstudien) zur Aufarbeitung von Plasmaproben (ca. 3 000 Proben) und Projekt 2 (Tierversuch) zur Analyse von Leberhomogenaten (ca. 175 Proben) eingesetzt. Die Datenauswertung erfolgte über die Software MaxQuant und Perseus sowie die Modellierung besonders potenter Kandidaten *in silico* mittels der Software *Molecular Operating Environment* (Chemical Computing Group).

3.4 Hinweise zur Mittelverwendung

Im Rahmen der Proteinanalytik ist die Bestimmung der Gesamtprotein- bzw. Peptidkonzentration wichtiger Bestandteil der verschiedenen Aufarbeitungs- und Bestimmungsmethoden. Dies erfolgte i.d.R. über Bicichinonsäure-Assay (BCA-Assay) bzw. Fluoreszenz-basierter Peptidanalytik. Dafür wurden insgesamt Mittel in Höhe von ca. 15.000 € aufgewendet.

Für die gerichtete Proteinanalytik mittels Immunpräzipitation und MALDI-TOF-MS wurden ebenfalls ca. 15.000 € u.a. für den Erwerb von Antikörpern, Kopplungsmaterial und MALDI-Probenträger aufgewendet.

Um die ungerichtete Proteinanalytik zu ermöglichen, wurden insgesamt rund 253.000 € aufgewendet. Davon entfielen ca. 38.000 € auf den enzymatischen Verdau, ebenfalls ca. 39.000 € auf die Anreicherung Cystein-haltiger Peptide, ca. 158.000 € auf die Markierung mit TMT zur relativen Quantifizierung und ca. 18.000 € auf Verbrauchsmaterial für die massenspektrometrische Analyse (Säulen etc.).

Die komplexe und rechenaufwändige Datenanalyse erforderte zusätzliche ca. 5.000 € für Hardware sowie ca. 10.000 € wurden für Software zur Proteinmodellierung.

4 Projekt 1: Charakterisierung von oxPTM in Serumproben humaner Ernährungsinterventionsstudien

4.1 Ziele, Arbeiten, Ergebnisse und Verwertungsplan

Die Analyse von Plasma- bzw. Serumproben stellt eine minimal-invasive Möglichkeit dar den Gesundheitszustand eines Organismus zu charakterisieren und Biomarker zu identifizieren. Da Plasma- und Serumproben i.d.R. zellfrei sind, sind v.a. die darin enthaltenen Proteine wertvolle Informationsträger. Plasma- bzw. Serumproteine sind zum einen Proteine, die von verschiedenen Geweben (v.a. jedoch der Leber) ins Blut sezerniert werden und dort für spezifischen Funktionen wie Transport, Kommunikation, Aufrechterhaltung onkotischer Druck, Substratumsetzung verantwortlich sind (21). Änderungen ihrer Konzentration aber auch ihrer Funktion (z.B. Aktivität) können als Indikatoren für physiologische und pathophysiologische Prozesse dienen (22). Zum anderen gehören zu den Plasma- und Serumproteinen auch Proteine, die durch minimale Defekte der Gewebeintegrität – sogenanntes *Tissue Leakage* – ins Blut gelangen und so potentielle Biomarker für Gewebefunktion und Gewebeintegrität darstellen (23).

Im Rahmen von Projekt 1 der Nachwuchsgruppe ProAID sollten Plasma- bzw. Serumproben verschiedener humaner Ernährungsinterventionsproben analysiert werden, um die Bedeutung von oxPTM als Bindeglied zwischen Ernährung und Alterungsphänotyp zu untersuchen. Hierfür standen Plasma- bzw. Serumproben der Studien LeguAN und NutriAct zur Verfügung. LeguAN war eine randomisierte Ernährungsinterventionsstudie, in der der Effekt einer sechswöchigen proteinreichen Ernährung (pflanzliches Protein vs. tierisches Protein) auf Leberfettgehalt und Insulinresistenz bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 untersucht wurde (24). Dem gegenüber steht die langfristige Ernährungsintervention (36 Monate) der NutriAct-Studie bei der in Personen zwischen 50 und 70 Jahren die Wirkung einer Ernährung reich an Protein, ungesättigtem Fett und Ballaststoffen auf Leberfettgehalt, Muskelmasse und altersbedingte Variablen (u.a. kognitive Leistungsfähigkeit, Entzündungsstatus) analysiert wurde (25-27). Darüber hinaus sollten im Rahmen von Projekt 1 auch Proben der Studien MAINTAIN und MMS (28-30), die beide metabolische Effekte durch Gewichtsreduktion bei Adipositaspatienten untersuchten, berücksichtigt werden. Auf die Analyse der Proben aus MAINTAIN und MMS wurde jedoch zu Gunsten der Proben aus der NuEva-Studie verzichtet. Die NuEva-Studie wurde im Rahmen der Nachwuchsgruppe NuCo der Friedrich-Schiller-Universität Jena realisiert und zielt darauf ab die Nährstoffzufuhr (insbesondere kritischer Nährstoffe wie Folsäure, Zink, ungesättigte Fettsäuren) verschiedener Ernährungsformen (*Western Diet*, Flexitarier, Vegetarier, Veganer) zu optimieren (31, 32) und stellt ein ideales Probenpanel für die Fragestellung in Projekt 1 der Nachwuchsgruppe ProAID dar.

Im Probenmaterial wurden ungerichtete und gerichtete Proteinanalysen durchgeführt (↗ Abschnitt 3 „Proteinanalytik“). Ursprünglich sollten dabei die Ergebnisse der ungerichteten Proteinanalytik (Orbitrap-Analysen) dazu dienen besonders geeignete Kandidaten für die gerichtete Analyse zur eingehenden Charakterisierung zu identifizieren. Die Notwendigkeit die Methoden an die aktuellen *State-of-Art*-Ansätze anzupassen, Verzögerungen in der Personalgewinnung und schließlich auch eine Havarie im Bereich der Massenspektrometrie führten jedoch zu Verzögerungen im Projektablauf und machten Anpassungen im Zeitplan und der Projektplanung notwendig. Daher wurde zusätzlich und parallel zur ungerichteten Analyse eine systematische Datenbank- und Literaturrecherche durchgeführt, um potentielle Kandidaten zu identifizieren, die *a)* von besonderer Bedeutung im Alterungsprozess bzw. der Manifestation altersbedingter Erkrankungen sind und *b)* oxPTM aufweisen (können). Basierend auf der so erstellten Kandidatenliste wurde die gerichtete Analyse ausgewählter Proteine in den Proben der Studien LeguAN, NutriAct und NuEva durchgeführt.

Mittels systematischer Literaturrecherche sollten Proteine identifiziert werden, für die bereits eine oxidative Modifikation beschrieben wurde und die gleichzeitig mit altersbedingten Erkrankungen assoziiert sind. Die Recherche erfolgte in der NCBI-Datenbank unter Verwendung definierter Suchbegriffe. Ebenfalls durch systematische Literaturrecherche wurde eine Liste altersbedingter Erkrankungen erstellt und ihren ICD-10-Codes (*International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems*) zugewiesen. Diese Liste wurde für die Datenbankrecherche eingesetzt. Grundlage dafür war ein Plasmaproteom-Referenzdatensatz, der vom *Human Peptide Atlas* abgerufen wurde und der über 3500 Plasma- bzw. Serumproteine umfasst. Mit Hilfe eines R-Skriptes und unter Kombination der ICD-10-Codes mit den im Proteomdatensatz hinterlegten OMIM-IDs (*Online Mendelian Inheritance in Man*) konnten potentielle Kandidaten identifiziert werden. Zusätzlich wurde der Proteomdatensatz mit Datenbanken der *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG; *KEGG Human Diseases in ICD-10 Classification*, *KEGG Pathway-based Classification of Disease*) unter Verwendung der erstellten ICD-10-Code-Liste und Abgleich mit UniProt-IDs gefiltert und so weitere Kandidatenproteine identifiziert.

Durch Kombination der systematischen Literaturrecherche mit der Datenbankrecherche konnte eine Liste mit 322 Kandidatenproteinen erstellt werden. Diese wurde weiter gefiltert und Proteine für die gerichtete Analyse mittels Immunopräzipitation und MALDI-TOF-MS (↗ Abschnitt 3 „Proteinanalytik“) ausgewählt. Im Rahmen der Projektlaufzeit der Nachwuchsgruppe wurde das Protein Transthyretin (TTR) in den Proben der LeguAN-, NutriAct- und NuEva-Studie hinsichtlich seiner oxPTM eingehend charakterisiert. Dabei wurde deutlich, dass eine Intervention mit proteinreicher Ernährung den Anteil von oxidiertem TTR senkt. Hingegen bestanden keine Unterschiede im Ausmaß der Oxidation des TTR zwischen den verschiedenen Ernährungsformen (NuEva). Die Bedeutung des veränderten oxPTM-Musters des TTRs muss nun weiter evaluiert werden. Dafür werden klinische Daten der Studien herangezogen, um u.a. einen Zusammenhang zu Leberfettgehalt, Entzündungsparametern und Insulinresistenz zu untersuchen. Perspektivisch soll die gerichtete Analyse von potentiellen Kandidaten in der Professur Ernährungsphysiologie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg fortgesetzt werden. Dazu soll neben Immunpräzipitation und MALDI-TOF-MS auch die Untersuchung mittels Triple-Quadrupol-Tandem-Massenspektrometrie (QQQ-MS/MS) eingesetzt werden, um das Kandidatenspektrum zu erweitern und gleichzeitig eine absolute Quantifizierung zu ermöglichen. Darüber hinaus soll die Liste von 322 Proteinen auch mit den Ergebnissen der ungerichteten Analyse abgeglichen und ggf. erweitert bzw. modifiziert werden.

Für die ungerichtete Analyse wurden Proben der Studien LeguAN (n = 76), NuEva (n = 156) und NutriAct (n = 2568) verwendet und wie in Abschnitt „3.3 Ungerichtete Analyse komplexer Probenmatrizes mittels hochauflösender Massenspektrometrie“ beschrieben aufgearbeitet. Dafür wurden sogenannte abgereicherte Plasma- bzw. Serumproben verwendet. D.h. hochabundante Proteine (u.a. Serumalbumin, Immunglobuline) wurden zuvor mittels Affinitätssäulen entfernt, um so die Komplexität der Plasma- bzw. Serumproben besser darstellen zu können.

Für die Proben der LeguAN-Studie sind Probenaufarbeitung, massenspektrometrische Analyse und Datenauswertung bereits vollständig abgeschlossen. Dabei wurde deutlich, dass die diätetische Intervention mit einer Ernährung reich an tierischem bzw. pflanzlichem Protein zu signifikanten Änderungen im Plasmaproteom führte, wobei die meisten regulierten Proteine im Zusammenhang mit der Immunfunktion/Entzündungsreaktion bzw. Zellmobilität und Zelladhäsion stehen.

Auch bezüglich der oxPTM von Plasma- bzw. Serumproteinen konnten in den Proben der LeguAN-Studie signifikante Unterschiede identifiziert werden. Dabei zeigten sich Änderungen im Redoxstatus v.a. in Proteinen des Komplementsystems und Proteinen, die mit Zellmobilität und Zelladhäsion assoziiert sind. Von großer Bedeutung ist in diesem Zusammenhang v.a., dass innerhalb eines Proteins sowohl Zu- als auch Abnahme der Oxidation beobachtet werden konnten.

Im Rahmen einer Promotion erfolgt die weitergehende Datenanalyse unter Erstellung von *Pathway*-Anreicherungen sowie der Korrelationsanalyse mit klinischen Parametern. Darüber hinaus sollen zukünftig ausgewählte Proteine hinsichtlich ihrer oxPTM durch Massenspektrometrie-basierte Quantifizierung (QQQ, MALDI-TOF-MS) sowie *in-silico*-Analysen näher charakterisiert werden.

Auch die Datenauswertung der NuEva-Studie, deren Proben bereits vollständig aufgearbeitet und analysiert wurden, erfolgt zur Zeit im Rahmen einer Promotion. Aufgrund personeller Veränderungen und Verzögerungen in der Bereitstellung von Verbrauchsmaterial konnten die NutriAct-Proben noch nicht vollständig aufgearbeitet werden. Es ist jedoch vorgesehen die Aufarbeitung, Analyse und Datenauswertung an der Professur für Ernährungsphysiologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg fortzusetzen.

Die bisherigen Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Proteomanalysen und Analysen der oxPTM zur Identifizierung potentieller Kandidaten führen, die die Ableitung individualisierter Präventions- und Therapiemaßnahmen ermöglichen. Dabei werden in der Datenauswertung v.a. auch geschlechtsspezifische Unterschiede sowie Zusammenhänge mit bestehenden Ernährungsmustern sowie altersbedingten Erkrankungen einbezogen werden.

4.2 Besondere Hinweise zur Mittelverwendung

Die Massenspektrometrie-basierte Proteinanalytik ist zeit- und materialintensiv. Wie bereits in Abschnitt 3 „Proteinanalytik“ deutlich wurde, ist ein erheblicher Anteil der Zuwendungen in die Proteinanalytik geflossen. Zusätzlich zu den Mitteln, die für die eigentliche Probenvorbereitung und Datenanalyse notwendig waren, wurde für die Abreicherung hochabundanter Proteine über Affinitätssäulen insgesamt ca. 60.000 € investiert.

5 Projekt 2: Charakterisierung gewebespezifischer oxPTM unter Berücksichtigung von Alter, Geschlecht, Ernährung und altersbedingten Erkrankungen

5.1 Ziele, Arbeiten, Ergebnisse und Verwertungsplan

Plasma- und Serumproteine können als Indikatoren für gewebespezifische Prozesse dienen. Um eine valide Einschätzung von Vorgängen auf Organebene zu erhalten, ist jedoch die Untersuchung von Gewebeproben unabdingbar. Daher wurde im Rahmen der Arbeiten der Nachwuchsgruppe ProAID ein Langezeitfütterungsversuch mit Ratten durchgeführt. Dies ermöglichte Veränderungen im Rahmen der Alterung auf Gewebeebene und unter kontrollierbaren Ernährungsbedingungen zu verfolgen. Vorgesehen war hierbei eine Fütterungsintervention an Ratten für bis zu 21 Monate. Neben männlichen und weiblichen Ratten des Stamms Wistar – als klassisches Alterungsmodell (33) – sollten dabei auch Rattenstämme verwendet werden die typische altersbedingte Erkrankungen ausbilden: Hypertonie (Rattenstamm: *Spontaneously Hypertensive Heart Failure Rat*, SHHF (34-36)) und Diabetes mellitus Typ 2 (Rattenstamm: *University of California Davis – Type 2 Diabetes Mellitus*, UCD-T2DM (37)). Die Fütterungsintervention sollte keine Extremdiät (wie Hochfettdiät) darstellen, sondern sich an der typischen westlichen Ernährung (*Western Diet*) orientieren. Daher wurde auf Basis der Nationalen Verzehrsstudie II (38) und unter Berücksichtigung Nager-spezifischer Anforderungen hinsichtlich des Nährstoffgehalts eine moderate *Western Diet* abgeleitet (Fett: 36 Energie%, Protein: 22 Energie%, Kohlenhydrate: 40 Energie% – davon 1/3 Zucker, Ballaststoffe: 2,5 Gewichts%) und mit einer Standardnagerdiät (Fett: 10 Energie%, Protein: 22 Energie%, Kohlenhydrate: 60 Energie%, Ballaststoffe: 5 Gewichts%) verglichen. Die Tiere sollten regelmäßig hinsichtlich Glucosetoleranz (oraler Glucosetoleranztest, nicht-nüchtern Blutglucose), Blutdruck (*Tail-Cuff*-Verfahren), Aktivität (Infrarotsystem) und Körperzusammensetzung (Magnetresonanztomographie, MRT) untersucht werden. Darüber hinaus sollten jeweils nach sechs, zwölf, 18 und 21 Monaten Organ- und Blutentnahmen unter finaler Narkose erfolgen und für Histologie (Organe), klinische Chemie (Blutproben) sowie Proteinanalytik (Organe und Blutproben) verwendet werden. Für die Organentnahmen waren Leber, Nieren, Herz, Pankreas und Aorta vorgesehen. Zusätzlich erfolgt die Entnahme von Skelettmuskulatur und Fettgewebe. Der Fütterungsversuch wurde wie geplant durchgeführt. Aus Tierschutz-ethischen und logistischen Gründen mussten jedoch folgende Anpassungen vorgenommen werden

- Auf den Rattenstamm UCD-T2DM wurde verzichtet. Eine fristgerechte Bereitstellung des Rattenstammes war aufgrund einer Kombination (patent)rechtlicher Bedenken der *University of California Davis* (UCD) und bestehender Hygienestandards der aufnehmenden Tierversuchseinrichtung des Deutschen Instituts für Ernährungsforschung (DIfE) nicht möglich.
- Die Intervention wurde aufgrund des schlechten Allgemeinzustandes der älteren Tiere für alle Tiere spätestens nach 18 Monaten beendet.
- Für die Bestimmung der Körperzusammensetzung war die Anschaffung eines entsprechenden MRT-Gerätes geplant. Aus Gründen der Nachhaltigkeit (Ratten werden an der Universität Potsdam und auch am DIfE kaum verwendet), infrastrukturellen Problemen (Aufstellungsort) und unter Abwägung von Kosten und Nutzen wurde von der Anschaffung abgesehen. Um dennoch auf entsprechende Informationen zurückgreifen zu können, wurde ein Teil der Tiere für die Analyse der Körperzusammensetzung mittels MRT an die Core Facility 7T experimentelle MRTs der Charité-Universitätsmedizin Berlin überführt. Hier war jedoch nur die Untersuchung von Tieren im Alter von zehn Wochen und sechs Monaten möglich.

Weiterhin machten u.a. Verzögerungen in der Personalgewinnung, Einschränkungen der SARS-CoV2-Pandemie sowie Verzögerungen im Ablauf des Tierversuchs durch infrastrukturelle Anpassungen in der Tierversuchseinrichtung und Beschaffung der SHHF-Ratten deutliche Anpassungen im Projektablauf notwendig. Daher wurden im Rahmen der Förderperiode nur die ungerichteten Proteinanalysen abgeschlossen und darüber hinaus auf das Leberproteom beschränkt (↗ folgender Absatz).

Alle Tiere (Wistar und SHHF, n = 274) wurden hinsichtlich der Entwicklung des Körpergewichts, der Glucosetoleranz, Aktivität und des Blutdrucks charakterisiert. Darüber hinaus erfolgte die Bestimmung des Blutbildes und die Erfassung klinisch-chemischer Parameter (u.a. Cholesterol, Leberenzyme, Kreatinin) in finalen Blutproben. Histologische Untersuchungen und Proteinanalytik wurden aufgrund des Probenumfangs bei gleichzeitig hoher Arbeitsbelastung durch den Tierversuch selbst im Rahmen der Förderperiode auf die Leberproben fokussiert.

Im Rahmen des Fütterungsversuches wurden sowohl für Wistar- als auch für SHHF-Ratten massive Geschlechtsunterschiede deutlich, die sich in nahezu allen durchgeführten Analysen widerfanden. So war ein Unterschied im Körpergewicht zwischen Weibchen und Männchen erwartet worden. Der ebenfalls erwartete Effekt der *Western Diet* auf das Körpergewicht konnte jedoch nur für die Männchen beobachtet werden. Insgesamt waren die Effekte der Diät wenig ausgeprägt und zeigten sich weder hinsichtlich der Glucosetoleranz noch der Aktivität, klinisch-chemische Parameter oder histologischen Auswertung (Leber).

Geschlechtsspezifische Unterschiede wurden auch im Rahmen der ungerichteten Proteinanalytik der Leberproben deutlich und zeigten sich sowohl auf Ebene des Gesamtproteoms als auch auf Ebene der oxPTM. Darüber hinaus konnte auf Proteomebene auch ein Effekt der Diät differenziert werden. Insgesamt konnten für Männchen 184 und für Weibchen 188 Leberproteine identifiziert werden, die sich in Abhängigkeit der Versuchsdiät (*Western Diet* vs. Standarddiät) signifikant unterschieden. Davon waren zehn bzw. 18 Proteine unabhängig vom Alter durch die *Western Diet* beeinflusst, während für die übrigen Proteine neben einem Einfluss der Diät auch altersbedingte Effekte beobachtet wurden. Interessanterweise gab es zwischen den regulierten (signifikant unterschiedlichen) Proteinen keine Überschneidungen zwischen den Geschlechtern. Dies spiegelte sich auch in den *Pathway-Enrichment*-Analysen wieder. Während die regulierten Proteine der Weibchen v.a. Prozesse der Thermogenese, Atmungskette und des Citratzyklus reguliert waren, konnte für Männchen eine spezifische

Anreicherung in Prozessen des Fettstoffwechsels/der Peroxisomen und der Biotransformation beobachtet werden. Unabhängig davon gab es aber auch Überschneidungen zwischen Geschlechtern. So wurden sowohl in Weibchen als auch Männchen Stoffwechselwege des Carbonsäuremetabolismus, des Terpen- und Steroidmetabolismus und des Nukleosid- und Thiolmetabolismus durch die *Western Diet* reguliert; die regulierten Proteine unterschieden sich jedoch zwischen den Geschlechtern.

Auch hinsichtlich der oxPTM konnten in den Leberproben nicht nur Effekte des Geschlechts, sondern auch von Alter und Ernährung identifiziert werden. Insgesamt waren hier bei den Männchen 87 oxPTM-Sites und bei den Weibchen 80 oxPTM-Sites signifikant in Abhängigkeit der Diät reguliert, die ebenfalls verschiedenen Stoffwechselwegen zugeordnet werden konnten. Für die Weibchen ergaben die *Pathway-Enrichment*-Analysen insbesondere eine Regulation im Bereich des Fettstoffwechsels, des Arachidonsäuremetabolismus, der Peroxisomen, der NAD⁺- und Oxidoreduktasen sowie des Pyruvatstoffwechsels, während für Männchen eine besonders starke Regulation des Nukleotidmetabolismus auffiel. Diese Ergebnisse stehen auch im Einklang mit den Arbeiten von Xiao et al. zur sogenannten *Oximouse* (39). Im Rahmen des *Oximouse*-Projektes wurde und wird das Redoxproteom der Maus charakterisiert. Auch hier zeigten sich Alterseffekte und darüber hinaus konnten gewebespezifische Unterschiede im Redoxproteom identifiziert werden. Der Einfluss von Geschlecht und Ernährung wurde jedoch bislang nicht berücksichtigt.

Auf Grundlage der ungerichteten Proteinanalytik der Leberproben wurden einige Proteine von besonderem Interesse identifiziert, die entweder von besonders zentraler Bedeutung für die Regulation der jeweiligen Stoffwechselwege sind oder besonders stark hinsichtlich der relativen Konzentration bzw. des Redoxstatus reguliert wurden. Die Proteine sollen in künftigen Arbeiten näher charakterisiert und die Ergebnisse der ungerichteten Proteinanalytik validiert werden. Neben der Quantifizierung der Proteine und Differenzierung des Redoxstatus über Western Blot, ELISA und QQQ-MS soll dabei auch die Aktivität von Enzymen berücksichtigt werden. Darüber hinaus ist vorgesehen auch die anderen entnommen Organe hinsichtlich des Proteoms- und Redoxproteoms zu untersuchen, um die Einflüsse von Ernährung, Alter und Geschlecht systematisch zu beurteilen.

Die Ergebnisse werden erheblich zum Verständnis geschlechtsspezifischer Unterschiede hinsichtlich der Stoffwechselregulation allgemein aber hinsichtlich Anpassungseffekten im Alterungsprozess und zur Adaptation der Nährstoffzufuhr beitragen. Langfristig ermöglichen sie nicht nur ein tiefergehendes Verständnis von Geschlechtsdimorphismen, sondern auch die Anpassung und Ableitung von Präventions- und Therapiemaßnahmen.

5.2 Besondere Hinweise zur Mittelverwendung

Neben den Mitteln, die für die ungerichtete Proteinanalytik – einschließlich Probenvorbereitung – notwendig waren, fielen im Rahmen des Tierversuches besondere Kosten. Dazu zählten zum einen die Versuchsdieten (*Western Diet*, Standardnagerdiät), die hinsichtlich ihrer Zusammensetzung aufeinander abgestimmt (Proteinquelle, Zusammensetzung des Fettanteils etc.) und durch γ -Bestrahlung sterilisiert werden mussten. Insgesamt waren für das Versuchsfutter Ausgaben in Höhe von ca. 41.500 € notwendig. Die Beschaffung der Tiere – insbesondere des Rattenstamms SHHF – war mit Ausgaben in Höhe von ca. 18.500 € verbunden. Die hohen Kosten gehen v.a. auf die Notwendigkeit der Rederivierung der Tiere zurück, um den Hygienestandards der aufnehmenden Tierhaltungseinrichtung zu entsprechen und damit auch Einflüsse durch Pathogene zu minimieren.

Weiterhin wurden Analysen als Auftrag (Leberhistologie, MRT) durchgeführt, für die ebenfalls Kosten übernommen werden mussten. Für die histologischen Untersuchungen wurde ein Pathologe beauftragt, um eine valide und publikationsfähige Beurteilung der Leberhistologie zu gewährleisten. Hierbei entstanden Ausgaben in Höhe von ca. 4.500 €. Die MRT-Analysen erfolgten in der Core Facility 7T experimentelle MRTs der Charité-Universitätsmedizin Berlin. Für die MRT-Analysen von insgesamt 24 Tieren wurden einschließlich Transport und einer einwöchigen Haltung zur Adaptation der Tiere ca. 2.500 € verausgabt.

6 Projekte 3 & 4: Ableitung von Ernährungsempfehlungen auf Basis von altersspezifischer oxPTM im Kontext von Ernährungsmuster/ Validierung phänotypoptimierter Ernährungsempfehlungen auf Basis von oxPTMs und Bewertung des Alterungsphänotyps

6.1 Ziele, Arbeiten, Ergebnisse und Verwertungsplan

Der Alterungsphänotyp beschreibt den Zusammenhang von chronologischem und biologischem Alter und berücksichtigt den Zeitpunkt und das Ausmaß altersbedingter Veränderungen sowie die Manifestation und Progression altersbedingter Erkrankungen (1, 2). Der Alterungsphänotyp ist individuell extrem verschieden und im Wesentlichen von Genom, Lebensstil und Ernährung abhängig. Dabei stellen v.a. Lebensstil- und Ernährungsinterventionen eine Möglichkeit dar den individuellen Alterungsphänotyp zu beeinflussen und zu modulieren (5-9). Im Rahmen der Nachwuchsgruppe ProAID wurde die Hypothese aufgestellt, dass oxPTM als Prädiktoren bzw. Indikatoren für einen bestimmten Alterungsphänotyp (bzw. der Wahrscheinlichkeit von dessen Ausprägung) fungieren können. Da oxPTM gleichzeitig dem Einfluss von Ernährung und Lebensstil unterworfen sind, weisen sie hohes Potential als Biomarker für den Erfolg einer entsprechenden Intervention auf.

Im Rahmen von Projekte 3 und 4 der Nachwuchsgruppe ProAID sollte diese Hypothese getestet werden. Basierend auf den Ergebnissen der Projekte 1 und 2 sollten oxPTM/redoxregulierte Proteine identifiziert werden, die von besonderer Bedeutung für den Alterungsphänotyp und/oder charakteristisch für Ernährungsmuster/Ernährungstypen sind. Durch Ergebnisse aus Projekt 5 sollte die Liste um Proteine erweitert werden, die spezifisch Interaktionen mit sekundären Pflanzenstoffen eingehen und so als potentielle Indikatoren der Biofunktionalität dieser Metabolite dienen könnten.

Die Bedeutung der oxPTM bzw. Metabolit-modifizierten Proteine für den Alterungsphänotyp und der Zusammenhang mit Ernährungsmustern sollte im Rahmen von Projekt 3 in einer Subkohorte der EPIC-Studie Potsdam validiert werden (*European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition*), die bereits für die Validierung anderer Biomarker verwendet wurde (40). Basierend auf den Ergebnissen sollten Ernährungsempfehlungen abgeleitet werden, die spezifische Alterungsphänotypen bzw. deren Prävention adressieren. Im Fokus standen hier v.a. Alterungsphänotypen, die durch die Ausprägung von Insulinresistenz bzw. Diabetes mellitus Typ 2 und/oder kardiovaskuläre Erkrankungen (v.a. Hypertonie) charakterisiert sind. In Projekt 4 sollten die Ernährungsempfehlungen im Rahmen von humanen Kurzzeiternährungsinterventionen validiert und das Potential der oxPTM getestet werden.

Aufgrund der zeitlichen Verschiebungen in den Projekten 1, 2 und 5 und als Ergebnis der Zwischenevaluation der Nachwuchsgruppe wurden die Projekte 3 und 4 ausgesetzt. Es ist vorgesehen die Arbeitspläne wieder aufzugreifen, wenn valide Ergebnisse der Projekte 1, 2 und 5 vorliegen.

6.2 Besondere Hinweise zur Mittelverwendung

Es wurden keine Mittel für die Projekte 3 und 4 verwendet.

7 Projekt 5: Bedeutung von oxPTM für die Regulation des Stoffwechsels und Interaktion mit anderen PTM sowie Identifizierung neuer PTM durch sekundäre Pflanzenstoffe

7.1 Ziele, Arbeiten, Ergebnisse und Verwertungsplan

Die Bildung von oxPTM ist v.a. vom zellulären Milieu und der Proteinstruktur abhängig. Im Gegensatz zu anderen PTM sind an ihrer Bildung i.d.R. keine Enzyme direkt beteiligt. Lediglich durch die Regulation des zellulären Redoxmilieus tragen antioxidative Enzyme wie Superoxiddismutase, Catalase oder Glutathionperoxidasen indirekt zur Bildung von oxPTM bei (41). Daher wurde oxPTM auch lange eine physiologische Bedeutung und lediglich eine pathologische Wirkung zugeschrieben. Zunehmend wird jedoch die essentielle Bedeutung von oxPTM in der Regulation des Stoffwechsels wahrgenommen und zahlreiche Redox-regulierte Stoffwechselwege wurden beschrieben [Literatur]. Dabei wird jedoch auch deutlich, dass oxPTM oft nicht isoliert, sondern vielmehr in Interaktion mit anderen PTM agieren. Von besonderer Bedeutung in diesem Zusammenhang ist das Zusammenspiel mit Proteinphosphorylierung, die ebenfalls Eigenschaften und Aktivität von Proteinen wesentlich regulieren. Tatsächlich wurde die Interaktion von (reversibler) Proteinoxidation und Proteinphosphorylierung bereits für verschiedene zelluläre Prozesse wie z.B. den Nrf2-Signalweg umfangreich charakterisiert (12). Da eine systematische Auseinandersetzung mit der Thematik jedoch fehlt, war es Ziel der Nachwuchsgruppe das Zusammenspiel von Proteinoxidation und Proteinphosphorylierung für die Regulation des Stoffwechsels näher zu charakterisieren. Dies sollte sowohl in Gewebeproben aus Projekt 2 als auch in Form von Zellkulturversuchen erfolgen.

In diesem Zusammenhang sollte auch die Bedeutung sekundärer Pflanzenstoffe berücksichtigt werden. Sekundäre Pflanzenstoffe sind nicht essentiell für den menschlichen Organismus, weisen jedoch häufig positive Wirkung auf die Gesundheit auf und können u.a. antiinflammatorisch und antioxidative wirken (42). Die positive Wirkung wird zumindest teilweise auf die Beeinflussung des Redoxstatus des Organismus durch sekundäre Pflanzenstoffe zurückgeführt, da sie häufig antioxidativ wirken. Daher sollten in der Nachwuchsgruppe Effekte sekundärer Pflanzenstoffe sowie von Substanzgemischen auf oxPTM in der Zellkultur untersucht werden. Darüber hinaus war es das Ziel von Projekt 5 „neue“ PTM durch Interaktion von sekundären Pflanzenstoffen mit endogenen Proteinen zu identifizieren und so mögliche alternative Wege für die Vermittlung der Biofunktionalität der sekundären Pflanzenstoffe aufzuzeigen.

Für die Charakterisierung der Interaktion von Proteinoxidation und Proteinphosphorylierung wurde ein Zellkulturmodell zur Untersuchung der Insulinsekretion gewählt. Die Insulinsekretion ist Prozess, der zum einen essentiell von der Nahrungsaufnahme abhängt und zum anderen sowohl während des Alterungsprozesses aber auch im Zusammenhang mit alters- und ernährungsbezogenen Erkrankungen Veränderungen unterliegt. In der murinen Zelllinie INS-1E wurde dafür zunächst Änderungen des oxPTM-Musters während der Glucose-stimulierten Insulinsekretion untersucht und die Zellen umfangreich bezüglich der Insulinsekretion sowie Bildung von ROS charakterisiert. Dabei konnten 320 Proteine identifiziert werden, deren Redoxstatus sich durch Stimulation mit Glucose über einen Zeitraum von 60 min änderte. Insgesamt zeigten 87 Proteine eine Zunahme der Oxidation unmittelbar

nach Stimulation mit Glucose und 266 Proteine innerhalb von 5 min nach Stimulation. Gleichzeitig gab es jedoch auch Proteine, deren reduzierten Varianten als Folge der Glucosestimulation zunahm sowie Proteine, die im zeitlichen Verlauf sowohl eine Zu- als auch eine Abnahme im Redoxstatus zeigten (Abbildung 2). Unter redoxregulierten Proteinen waren auch 16 Kinasen und fünf Phosphatasen. Zur Zeit werden die Ergebnisse an der Professur Ernährungsphysiologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg im Rahmen deiner Promotion an anderen Zelllinien validiert und die Interaktion mit Phosphorylierung näher charakterisiert.

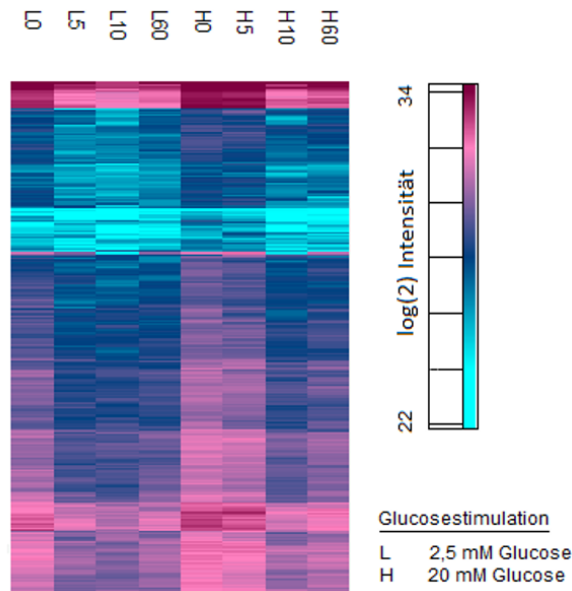


ABBILDUNG 2 HEATMAP REDOXREGULierter PROTEINE NACH STIMULATION VON INS-1E-ZELLEN MIT 2,5 MMOL/L GLUCOSE (L) ODER 20 MMOL/L GLUCOSE (H) UNMITTELBAR NACH STIMULATION (L0/H0) BZW. NACH 5, 10 UND 60 MIN.

Darüber hinaus wurde der Einfluss sekundärer Pflanzenstoffe auf oxPTM bzw. Bildung neuer PTM in Kooperation mit dem Leibniz-Institut für Gemüse- und Zierpflanzenbau e.V. (IGZ) im Rahmen der gemeinsam betreuten Promotion von Maximilian Martin untersucht. Dabei wurden v.a Apocarotinoide berücksichtigt, die einen besonderen Forschungsschwerpunkt am IGZ bilden. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass Apocarotinoide Addukte mit Proteinen über Bindung an Cysteinseitenketten eingehen. Weiterhin konnte *in vitro* gezeigt werden, dass die Aktivität der antioxidativen Enzyme Superoxiddismutase 1 und Catalase durch Apocarotinoide reguliert werden können. Dieser Einfluss konnte auch in HepG2-Zellen als *in-vitro*-Modell des Lebermetabolismus nachgewiesen werden. Weiterhin konnte in diesem Zusammenhang gezeigt werden, dass Apocarotinoide die Aktivität scheinbar unabhängig von der Expression der beiden Enzyme modulieren.

Perspektivisch soll der Einfluss der Apocarotinoide auf den Stoffwechsel systematisch untersucht werden. Neben Zellkulturarbeiten, die auch andere Organmodelle berücksichtigen, soll insbesondere über *in-silico*-Analysen der Einfluss von Apocarotinoiden auf ausgewählte Proteine untersucht werden. Die Ergebnisse tragen langfristig dazu bei die Mechanismen, über die sekundäre Pflanzenstoffe ihre Wirkung auf den Menschen vermitteln zu verstehen. Dadurch können in Zukunft z.B. auch Maßnahmen z.B. hinsichtlich der Applikation sekundärer Pflanzenstoffe abgeleitet werden (Weg der Aufnahme, Reinheit der applizierten Form etc.).

7.2 Besondere Hinweise zur Mittelverwendung

Auch in Projekt 5 wurden verschiedene Methoden der Proteinanalytik – einschließlich gerichteter und ungerichteter massenspektrometrischer Untersuchung – eingesetzt. Darüber hinaus wurden für die Charakterisierung der INS-1E-Zellen ca. 20.000 € benötigt (v.a. Bestimmung der Insulinkonzentration mittels ELISA).

8 Literatur

1. Aunan JR, Watson MM, Hagland HR, Soreide K. Molecular and biological hallmarks of ageing. *The British journal of surgery*. 2016;103(2):e29-46.
2. Lopez-Otin C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. The hallmarks of aging. *Cell*. 2013;153(6):1194-217.
3. Barzilai N, Huffman DM, Muzumdar RH, Bartke A. The critical role of metabolic pathways in aging. *Diabetes*. 2012;61(6):1315-22.
4. Soerensen M, Dato S, Tan Q, Thinggaard M, Kleindorp R, Beekman M, et al. Evidence from case-control and longitudinal studies supports associations of genetic variation in APOE, CETP, and IL6 with human longevity. *Age (Dordrecht, Netherlands)*. 2013;35(2):487-500.
5. Brooks-Wilson AR. Genetics of healthy aging and longevity. *Human genetics*. 2013;132(12):1323-38.
6. Fontana L, Partridge L. Promoting health and longevity through diet: from model organisms to humans. *Cell*. 2015;161(1):106-18.
7. Kieft-de Jong JC, Mathers JC, Franco OH. Nutrition and healthy ageing: the key ingredients. *Proc Nutr Soc*. 2014;73(2):249-59.
8. Solon-Biet SM, McMahon AC, Ballard JW, Ruohonen K, Wu LE, Cogger VC, et al. The ratio of macronutrients, not caloric intake, dictates cardiometabolic health, aging, and longevity in ad libitum-fed mice. *Cell metabolism*. 2014;19(3):418-30.
9. Mathers JC. Nutrition and ageing: knowledge, gaps and research priorities. *Proc Nutr Soc*. 2013;72(2):246-50.
10. López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. Hallmarks of aging: An expanding universe. *Cell*. 2023;186(2):243-78.
11. Sies H, Jones DP. Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2020;21(7):363-83.
12. Sies H, Berndt C, Jones DP. Oxidative Stress. *Annual review of biochemistry*. 2017;86:715-48.
13. Janssen-Heininger YM, Mossman BT, Heintz NH, Forman HJ, Kalyanaraman B, Finkel T, et al. Redox-based regulation of signal transduction: principles, pitfalls, and promises. *Free Radic Biol Med*. 2008;45(1):1-17.
14. Paulsen CE, Carroll KS. Orchestrating redox signaling networks through regulatory cysteine switches. *ACS Chem Biol*. 2009;5(1):47-62.
15. Forman HJ, Maiorino M, Ursini F. Signaling functions of reactive oxygen species. *Biochemistry*. 2010;49(5):835-42.
16. Jacob C, Battaglia E, Burkholz T, Peng D, Bagrel D, Montenarh M. Control of oxidative posttranslational cysteine modifications: from intricate chemistry to widespread biological and medical applications. *Chem Res Toxicol*. 2012;25(3):588-604.
17. Henze A, Homann T, Rohn I, Aschner M, Link CD, Kleuser B, et al. *Caenorhabditis elegans* as a model system to study post-translational modifications of human transthyretin. *Sci Rep*. 2016;6:37346.
18. Henze A, Raila J, Scholze A, Zidek W, Tepel M, Schweigert FJ. Does N-acetylcysteine modulate posttranslational modifications of transthyretin in hemodialysis patients? *Antioxid Redox Signal*. 2013;19(11):1166-72.
19. Zougman A, Banks RE. C-Strap Sample Preparation Method--In-Situ CysteinyI Peptide Capture for Bottom-Up Proteomics Analysis in the STRap Format. *PloS one*. 2015;10(9):e0138775.
20. Zougman A, Selby PJ, Banks RE. Suspension trapping (STRap) sample preparation method for bottom-up proteomics analysis. *Proteomics*. 2014;14(9):1006-0.
21. Schwick HG, Haupt H. Chemistry and function of human plasma proteins. *Angewandte Chemie (International ed in English)*. 1980;19(2):87-99.
22. Geyer PE, Holdt LM, Teupser D, Mann M. Revisiting biomarker discovery by plasma proteomics. *Molecular systems biology*. 2017;13(9):942.
23. Anderson NL, Anderson NG. The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects. *Mol Cell Proteomics*. 2002;1(11):845-67.

24. Pivovarova-Ramich O, Markova M, Weber D, Sucher S, Hornemann S, Rudovich N, et al. Effects of diets high in animal or plant protein on oxidative stress in individuals with type 2 diabetes: A randomized clinical trial. *Redox biology*. 2020;29:101397.
25. Meyer NMT, Pohrt A, Wernicke C, Pletsch-Borba L, Apostolopoulou K, Haberbosch L, et al. Improvement in Visceral Adipose Tissue and LDL Cholesterol by High PUFA Intake: 1-Year Results of the NutriAct Trial. *Nutrients*. 2024;16(7).
26. Pletsch-Borba L, Wernicke C, Apostolopoulou K, Spira D, Pohrt A, Hornemann S, et al. Nutritional counseling frequency and baseline food pattern predict implementation of a high-protein and high-polyunsaturated fatty acid dietary pattern: 1-year results of the randomized NutriAct trial. *Clinical nutrition (Edinburgh, Scotland)*. 2021;40(11):5457-66.
27. Wernicke C, Pohrt A, Pletsch-Borba L, Apostolopoulou K, Hornemann S, Meyer N, et al. Effect of unsaturated fat and protein intake on liver fat in people at risk of unhealthy aging: 1-year results of a randomized controlled trial. *The American journal of clinical nutrition*. 2023;117(4):785-93.
28. Mai K, Li L, Wiegand S, Brachs M, Leupelt V, Ernert A, et al. An Integrated Understanding of the Molecular Mechanisms of How Adipose Tissue Metabolism Affects Long-term Body Weight Maintenance. *Diabetes*. 2019;68(1):57-65.
29. Maurer L, Mai K, Krude H, Haynes JD, Weygandt M, Spranger J. Interaction of circulating GLP-1 and the response of the dorsolateral prefrontal cortex to food-cues predicts body weight development. *Molecular metabolism*. 2019;29:136-44.
30. Prehn K, Jumpertz von Schwartzberg R, Mai K, Zeitz U, Witte AV, Hampel D, et al. Caloric Restriction in Older Adults-Differential Effects of Weight Loss and Reduced Weight on Brain Structure and Function. *Cerebral cortex (New York, NY : 1991)*. 2017;27(3):1765-78.
31. Dawczynski C. A Study Protocol for a Parallel-Designed Trial Evaluating the Impact of Plant-Based Diets in Comparison to Animal-Based Diets on Health Status and Prevention of Non-communicable Diseases-The Nutritional Evaluation (NuEva) Study. *Frontiers in nutrition*. 2020;7:608854.
32. Dawczynski C, Weidauer T, Richert C, Schlattmann P, Dawczynski K, Kiehntopf M. Nutrient Intake and Nutrition Status in Vegetarians and Vegans in Comparison to Omnivores - the Nutritional Evaluation (NuEva) Study. *Frontiers in nutrition*. 2022;9:819106.
33. Clause BT. The Wistar Rat as a right choice: establishing mammalian standards and the ideal of a standardized mammal. *Journal of the history of biology*. 1993;26(2):329-49.
34. Doggrell SA, Brown L. Rat models of hypertension, cardiac hypertrophy and failure. *Cardiovascular research*. 1998;39(1):89-105.
35. Heyen JR, Blasí ER, Nikula K, Rocha R, Daust HA, Friedrich G, et al. Structural, functional, and molecular characterization of the SHHF model of heart failure. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2002;283(5):H1775-84.
36. McCune SA, Baker PB, Stills HF. SHHF/Mcc-c/i Rat: Model of Obesity, Non-insulin-dependent Diabetes, and Congestive Heart Failure. *ILAR News*. 1990;32(3):23-7.
37. Cummings BP, Digitale EK, Stanhope KL, Graham JL, Baskin DG, Reed BJ, et al. Development and characterization of a novel rat model of type 2 diabetes mellitus: the UC Davis type 2 diabetes mellitus UCD-T2DM rat. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology*. 2008;295(6):R1782-93.
38. Nationale Verzehrsstudie II, Ergebnisbericht Teil 2. Die bundesweite Befragung zur Ernährung von Jugendlichen und Erwachsenen. Karlsruhe, Germany: Max Rubner-Institut 2008.
39. Xiao H, Jedrychowski MP, Schweppe DK, Huttlin EL, Yu Q, Heppner DE, et al. A Quantitative Tissue-Specific Landscape of Protein Redox Regulation during Aging. *Cell*. 2020;180(5):968-83.e24.
40. Riboli E, Kaaks R. The EPIC Project: rationale and study design. *European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition*. *International journal of epidemiology*. 1997;26 Suppl 1:S6-14.
41. Berlett BS, Stadtman ER. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J Biol Chem*. 1997;272(33):20313-6.
42. Morand C, Tomás-Barberán FA. Contribution of plant food bioactives in promoting health effects of plant foods: why look at interindividual variability? *European journal of nutrition*. 2019;58(Suppl 2):13-9.