

Aus dem CharitéCentrum 2 für Grundlagenmedizin

Institut für Physiologie
Campus Charité Mitte (CCM)
Direktor: Prof. Dr. med. Wolfgang M. Kübler

Habilitationschrift

Mechanismen des Chromatin-Remodellings am Beispiel der molekularen Smyd1-PML-SUMO1-Achse

zur Erlangung der Lehrbefähigung
für das Fach Physiologie

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät Charité
– Universitätsmedizin Berlin

von

Dr. rer. nat. Janine Berkholz

Eingereicht:	November 2022
Dekan:	Prof. Dr. Axel R. Pries
1. Gutachter/in:	Prof. Dr. Andrea Olschewski
2. Gutachter/in:	Prof. Dr. Johannes Vogel

Inhaltsverzeichnis

1.	EINLEITUNG	6
1.1	Der Nucleus als Organelle und Kompartiment eukaryotischer Zellen	6
1.2	Chromatin-Remodelling und Histonmodifikationen	12
1.3	Methyltransferasen.....	16
1.4	Smyd-Genfamilie	17
1.5	Kernkörper	20
1.6	PML.....	28
2.	AUSGEWÄHLTE ORIGINALARBEITEN	31
2.1	siRNA-mediated inhibition of skNAC and Smyd1 expression disrupts myofibril organization: Immunofluorescence and electron microscopy study in C2C12 cells	31
2.2	skNAC and Smyd1 in transcriptional control	37
2.3	The methyltransferase Smyd1 mediates LPS-triggered up-regulation of IL-6 in endothelial cells.....	48
2.4	Stability of Smyd1 in endothelial cells is controlled by PML-dependent SUMOylation upon cytokine stimulation.....	70
2.5	Promyelocytic leukemia protein promotes the phenotypic switch of smooth muscle cells in atherosclerotic plaques of human coronary arteries	89
3.	DISKUSSION	109
3.1	Smyd1 als Kofaktor der Transkription während der Differenzierung von Myoblasten.....	109
3.2	Smyd1 als Histonmethyltransferase.....	111
3.3	Smyd1 steuert als Regulator und Interaktionspartner von PML und PML- NBs über SUMOylierungsreaktionen seinen eigenen Abbau.....	115
3.4	Smyd1 als multifunktionales Signalprotein.....	121
3.5	Einschränkungen der Forschungsergebnisse und ihrer Interpretationen sowie weitergehende Fragestellungen.....	124
4.	ZUSAMMENFASSUNG/SUMMARY	127

5.	LITERATURVERZEICHNIS.....	130
6.	DANKSAGUNG.....	140
7.	EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG.....	141

Abkürzungsverzeichnis

α NAC	Nascent Polypeptide-associated complex subunit alpha
ATP	Adenosintriphosphat
CBs	Cajal Körper, Cajal Bodies bzw. Coiled Bodies
CD14	Cluster of differentiation 14
DDR	DNA Damage Response (DNA-Schadensantwort)
dHCASMC	differenzierte humane koronararterielle glatte Muskelzellen
DNA:	Desoxyribonukleinsäure
EA.hy926	Homo sapiens endothelial hybrid cell line
EC	Endothelzelle
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
H3K4	Lysins 3 im Histon H4
H3K36	Lysins 3 im Histon H36
H3K79	Lysins 3 im Histon H79
HAT	Histonacetyltransferase
HCASMC	humane koronararterielle glatte Muskelzellen
HDAC	Histondeacetylase
HLB	Histon-Locus-Body
HIF1 α	Hypoxie-induzierter Faktor 1 alpha
HMT	Histonmethyltransferase
hnRNA	heterogenous nuclear RNA, heterogene Kern-RNA
HUVEC	Human umbilical vein endothelial cells (Endothelzellen aus humanen Nabelschnurvenen)
IFN- γ	Interferon- γ
I κ B α	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha
IL-6	Interleukin 6
IRAK	Interleukin 1 receptor-associated kinase
lncRNA	Long non-coding RNA
LPS	Lipopolysaccharide
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinasen
MD2	Myeloid differentiation factor 2
miRNA	microRNA
NAC	Nascent polypeptide-associated complex
NCoR	Nuclear corepressor receptor
NEAT1	Nuclear-enriched abundant Transcript 1
NF- κ B	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells
NPC	Nuclear pore complex
NS	Nuclear speckle
nSBs	Nuclear stress bodies
piRNA	Piwi-interacting RNA
PML	Promyelocytic leukemia protein; Promyelozytisches Leukämieprotein
PML-NBs	Promyelocytic leukemia protein nuclear body, PML-Kernkörperchen
PNCs	Perinucleoläre compartments
PPAR1 γ	Peroxisome proliferator-activated receptor γ
prä-mRNA	pre-mRNA, precursor messenger RNA
PSs	Paraspeckles
RasGRF2	Ras-specific guanine nucleotide-releasing factor 2
RBCC	RING/B-Box/Coiled-Coil
RNF4	Ring finger protein 4
RNP	Ribonucleoprotein

rRNA	ribosomale RNA
SAM	S-Adenosylmethionin
SAPK	Stress-aktivierte Proteinkinasen
sCD44	soluble Cluster of differentiation 44
SENPs	Sentrin/SUMO-specific protease
SIM	SUMO-interacting motif
siRNA	small interfering RNA
skNAC	Skeletal and heart muscle-specific variant of the alpha subunit of nascent polypeptide associated complex
SMC	Smooth muscle cell; glatte Muskelzelle
Smyd1	SET and MYND domain containing 1
snoRNA	small nucleolar RNA
snRNPs	small nuclear RNA
SRF	Serum response factor
SRP	Signal recognition particle
STUbL	SUMO-targeted ubiquitin-ligases
SUMO	Small ubiquitin-related modifier
TIRAP	TIR domain-containing adaptor protein
TNF- α	Tumor necrosis factor- α
TRB3	Tribbles-related protein 3
TLR4	Toll-like receptor 4
UBC9	Ubiquitin-conjugating enzyme 9

1. Einleitung

1.1 Der Nucleus als Organelle und Kompartiment eukaryotischer Zellen

Der Zellkern (Nucleus) ist die namensgebende (griechisch: εὖ = gut, positiv; κερῶν = Kern) Organelle der Zellen von Eukaryoten (Tiere, Pflanzen, Pilze und Protozoen). Denn im Gegensatz zu den Zellen der Prokaryoten (Bakterien und Archaeen) besitzen alle eukaryotischen Zellen einen Nucleus – selbst die wenigen Ausnahmen, die auf den ersten Blick von dieser Regel abweichen (z.B. hochspezialisierte Synzytien, die mehrere Kerne aufweisen wie quergestreifte Muskelfasern oder plazentäre Synzytiotrophoblasten oder kernlose Zellen wie Erythrozyten), stellen ausdifferenzierte Zellen dar, die in früheren Entwicklungsstadien einkernig waren ([Alberts et al., 2017](#)).

Obwohl der Nucleus mit einem Durchmesser von 5-10 µm die größte Zellorganelle ist, lässt er sich nur mikroskopisch von anderen Organellen oder dem Zytoplasma abgrenzen. Tatsächlich müssen eukaryotische Zellen im Allgemeinen sogar erst mit spezifischen Farbstoffen (z.B. Feulgen) oder Fluorophoren (z.B. DAPI, Hoechst-Dye) inkubiert werden, um den Nucleus licht- bzw. fluoreszenzmikroskopisch darzustellen. Der Nucleus ist von einer etwa 35 nm dicken Kernhülle bestehend aus zwei biologischen Membranen (äußere und innere Kernmembran) umgeben, die das Innere des Nucleus vom Zytoplasma abtrennt (Abb. 1). Die äußere Kernmembran geht ohne Unterbrechung in die Membran des rauhen Endoplasmatischen Reticulums (rER) über, so dass sich die perinukleäre Zisterne (der Raum zwischen den beiden Kernmembranen) direkt in das Lumen des rER fortsetzt. Die innere Kernmembran wird zum Inneren des Nucleus hin von einer 20-100 nm breiten Kernlamina bedeckt, die im Wesentlichen aus verschiedenen Formen des Intermediärfilaments Lamin besteht und an der mechanischen Verankerung des Nucleus in der Zelle beteiligt ist ([Adam, 2017](#)). Zum Inneren des Nucleus hin folgt nach der Kernlamina das Nukleoplasma (oder Karyoplasma), das aus dem Chromatin (siehe unten) und einer unstrukturierten Grundmasse (Karyolymphe) besteht, die von einer stützenden Kernmatrix durchzogen wird, die im Wesentlichen ebenfalls aus Laminen aufgebaut ist ([Alberts et al., 2017](#)). In die Kernhülle eines Nucleus sind ungefähr 1000 Kernporenkomplexe (Nuclear pore complex; NPC) integriert, deren genaue Anzahl je nach Zelltyp und Zellzyklusstadium variiert ([Alber et al., 2007](#)). Jeder NPC besteht aus bis zu 500 Proteinen ([Lin et al., 2016](#)). Durch die NPC diffundieren Moleküle vom Zytoplasma aus in den Nucleus (und umgekehrt). Obwohl jeder NPC einen Gesamtdurchmesser von ca. 100 nm hat, ist die

Lücke, durch die Moleküle in bzw. aus dem Nucleus gelangen können, aufgrund von Barriereproteinen nur 9-12 nm breit (Feldherr und Akin, 1990). Durch ihre Struktur stellen diese Barriereproteine außerdem sicher, dass nur bestimmte Moleküle durch die NPC diffundieren bzw. transportiert werden (hohe Selektivität).

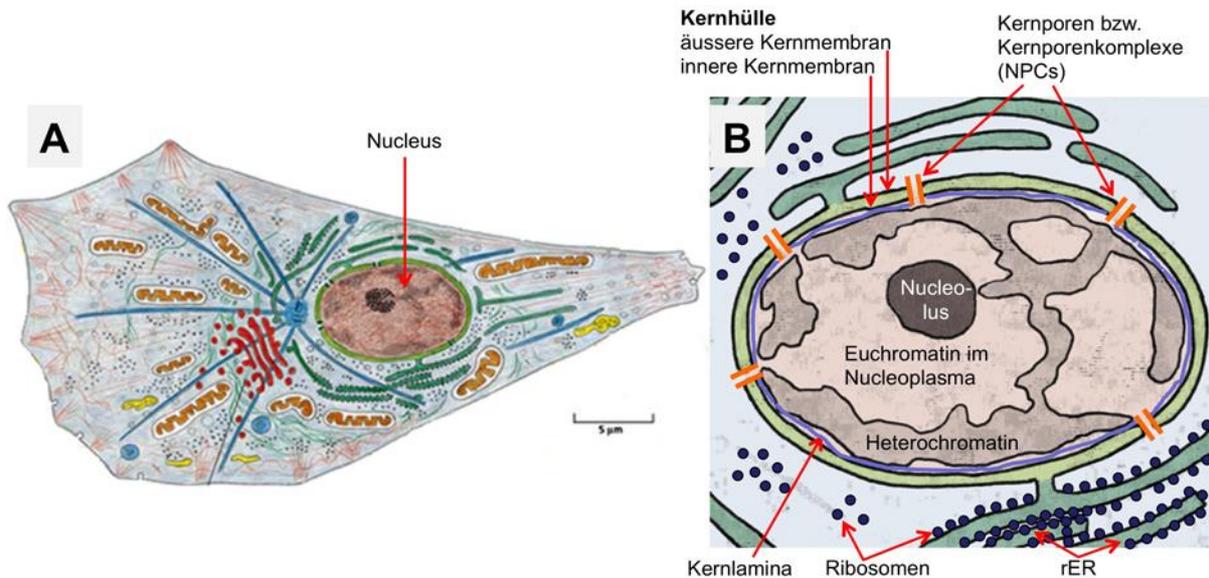


Abb. 1: Schematische Darstellung einer typischen Eukaryontenzelle (A) und des Nucleus (B). Die strukturellen Komponenten des Nucleus sind beschriftet. Modifiziert nach (Alberts *et al.*, 2017).

Der Nucleus ist das zelluläre Kompartiment, in dem der Großteil der genomischen DNA in Form der Chromosomen im Nucleoplasma aufbewahrt wird (Ausnahme: DNA in Mitochondrien). Die Chromosomen kondensieren in der Mitosephase des Zellzyklus (M-Phase; Kernteilungsphase), so dass sie mikroskopisch visualisiert werden können, während sie in der Interphase (G1/G0-Phase; S-Phase; G2-Phase) zu dünnen Fäden ausgezogen sind, die lichtmikroskopisch nicht sichtbar sind (Alberts *et al.*, 2017).

Chromosomen bestehen aus Chromatin (DNA und Proteinkomplexe). Man unterscheidet zwischen Euchromatin (locker verpackte DNA; aktiv, d.h. leichter für Enzyme der Replikation und Transkription zugänglich) und Heterochromatin (verdichtete DNA, häufig in der Nähe von Strukturkomponenten auf Chromosomen wie Histonen, Zentromeren und Telomeren; leichter kontrastierbar, dadurch dunkler als Euchromatin im Transmissionselektronenmikroskop, wie in Abb. 2 zu sehen ist).

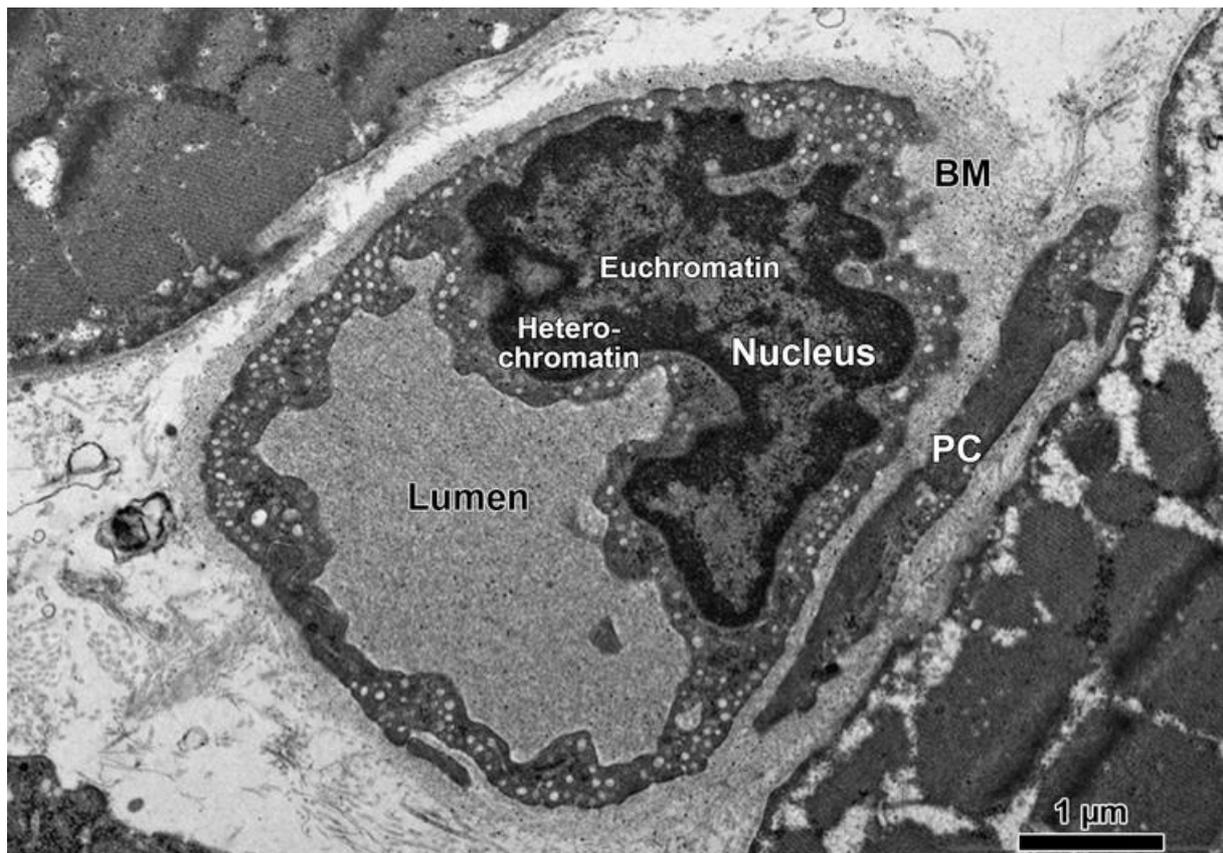


Abb. 2: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme einer Kapillare aus einem Skelettmuskel eines Hypertonie-Patienten. Zu sehen ist eine Endothelzelle mit Nucleus, die das Kapillarlumen definiert, und abluminal von einer Basalmembran (BM) mit einem Perizyten (PC) umgeben ist. Im Nucleoplasma des Zellkerns lassen sich Bereiche mit hellem Euchromatin und dunklem Heterochromatin erkennen. Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von PD Dr. Oliver Baum, Universität Bern.

Die Chromosomen verteilen sich nicht zufällig im Nucleus, sondern sind dort in spezifischen, dynamischen Bereichen (Chromosomenterritorien) zu finden ([Cremer et al., 2020](#)). Chromosomenterritorien bestehen sowohl aus Chromatin-Domänen (in denen sich die DNA sowie naszierende hnRNA mit Spleissosomen befinden) als auch aus kanalförmigen Interchromatin-Domänen (in denen sich u.a. Kernkörper organisieren).

Die DNA im Nucleus ist mit Nucleosomen assoziiert, die aus je vier Histonen mit hohen Anteilen an basischen Aminosäuren bestehen, durch die sie mit den sauren Phosphatresten im DNA-Strang interagieren. Je zwei Kopien der Histone H2a, H2b, H3 und H4 bilden ein Oktamer-Nucleosom, um das sich die DNA wickelt. Das Histon H1/5 verdeckt als Adapter eine etwa 150 bp lange DNA-Linker-Sequenz zwischen zwei solcher DNA/Histon-Oktameren und schützt sie so vor dem Abbau. Von allen fünf Histonen gibt es mehrere Varianten/Isoformen, deren Expression während der Organismusentwicklung oft unterschiedlich reguliert ist ([Draizen et al., 2016](#)).

Die DNA wird während der S-Phase des Zellzyklus im Nucleus unter Mitwirkung zahlreicher Enzyme verdoppelt (Replikation). Dabei wird zunächst der DNA-Doppelstrang durch Topoisomerasen entwunden, um dann durch Helikasen zu zwei parallelliegenden Einzelsträngen dissoziiert zu werden. Durch Primasen werden Primer auf beiden DNA-Einzelsträngen synthetisiert, die als Startsequenz für die DNA-Polymerase III dienen. Diese DNA-Polymerase liest die Nucleotidsequenz auf dem DNA-Doppelstrang bidirektional innerhalb einer Replikationsblase immer in 3'- zu 5'-Richtung ab: während der eine Strang der Helikase folgend kontinuierlich kopiert wird, wird der andere Strang diskontinuierlich in 5'- zu 3'-Richtung verlängert (Alberts *et al.*, 2017). In der anschließenden Mitose wird der verdoppelte Chromosomensatz durch den Spindelapparat auf die beiden Tochterzellen verteilt.

Noch vor Abschluss der Replikation werden die neuen DNA-Abschnitte im Bereich von sogenannten CpG-Inseln an ausgewählten Adenin-Basen und (beim Menschen vorwiegend) Cytosin-Basen zu N⁶-Methyladenin bzw. 5-Methylcytosin durch DNA-Methyltransferasen methyliert (Alberts *et al.*, 2017). Die übertragenen Methylreste stammen aus S-Adenosylmethionin (SAM). Das Methylierungsmuster der alten DNA-Stränge dient dabei als Vorlage, wodurch die DNA-Methylierung zu einer epigenetischen Modifikation wird, die aufgrund der Aktivität von spezifischen DNA-Demethylasen reversibel ist. Durch das DNA-Methylierungsmusters unterscheiden sich aktive (Euchromatin) und inaktive (Heterochromatin) Bereiche innerhalb der DNA (Alberts *et al.*, 2017).

Die DNA-Methylierung ist ein dynamischer Prozess, da auch neue DNA-Methylierungen, z.B. nach Zelldifferenzierung, gesetzt werden können. Hierdurch kommt dieser DNA-Modifikation eine wichtige biologische Rolle in der Epigenetik zu, die davon ausgeht, dass Veränderungen im DNA-Methylierungsmuster zu neuen Genexpressionsmuster führen, die sich phänotypisch auswirken und eventuell vererbt werden (Alberts *et al.*, 2017).

Die Transkription ist ein weiterer Prozess, der an der DNA im Nucleus stattfindet. In einem komplexen Prozess unter Einbeziehung zahlreicher Transkriptionsfaktoren, die an spezifische Promotor- oder Suppressorsequenzen binden (Transkriptionsapparat), wird durch die Aktivität der DNA-abhängigen RNA-Polymerase II von einer DNA-Teilsequenz eine mRNA-Matrize (hnRNA; prä-mRNA; Primärtranskript) gezogen. Die RNA-Polymerase I synthetisiert rRNA und teilweise auch sn-RNA (small nuclear RNA), während die Synthese der tRNA, der 5S rRNA und der 7SL-RNA des SRP (Signal

recognition particle), der die fertigen Ribosomen am rER verankert, durch die RNA-Polymerase III erfolgt (Alberts *et al.*, 2017).

Durchschnittlich sind Primärtranskripte in eukaryotischen Zellen etwa 7.000 Nukleotide lang, können aber durchaus eine Länge von bis zu 20.000 Nukleotiden erreichen. Noch im Nucleus werden die Primärtranskripte bei Eukaryoten posttranskriptional modifiziert: zu der mRNA-Prozessierung gehört neben dem Guanin-Capping am 5`-Ende und der Polyadenylierung am 3`-Ende das Splicing, bei dem die Introns durch ein Spleissosom aus der hnRNA herausgeschnitten werden, um dann die reife, nur noch aus Exon-bestehende mRNA aus dem Nucleus zu schleusen. Durch die posttranskriptionale Modifikation der hnRNA wird verhindert, dass Intron-haltige mRNA an die Ribosomen transportiert und als Matrize für die Translation verwendet wird (Alberts *et al.*, 2017).

Auch die Apoptose, der kontrollierte programmierte Zelltod, ist zu mindestens teilweise im Nucleus lokalisiert (Alberts *et al.*, 2017). Während ihrer Initiationsphase werden in unterschiedlichen Kompartimenten der eukaryontischen Zelle spezifische Signalkaskaden in Gang gesetzt, die dann in der Ausführungsphase im Nucleus konvergieren. Dabei werden spezielle Caspasen (Caspasen-3, -6 und -7) hochreguliert, die die verschiedenen Formen des Intermediärfilaments Lamin der Kernlamina spalten und so zum Zerfall der Kernhülle führen. Außerdem aktivieren diese drei Caspasen weitere Enzyme durch limitierte Proteolyse (z.B. Caspase-aktivierte DNase, CAD), die dann die genomische DNA der Linker-Regionen zwischen den Histon-Nucleosomen fragmentieren (Alberts *et al.*, 2017).

Es hat sich herausgestellt, dass einzelne zytoplasmatische Enzyme temporär in den Nucleus transportiert werden, und so den katalytischen Umsatz in manchen Stoffwechselwegen regulieren. So wird beispielsweise die Hexokinase-2, eines der Schrittmacherezyme der Glykolyse, in Hefezellen bei hoher intrazellulärer Glucose-Konzentration vom Zytoplasma in den Nucleus transportiert (Draizen *et al.*, 2016). Dort vermag sich die Hexokinase-2 in Assoziation mit dem Zinkfingerrezeptor Mig1 an eine spezifische Promotorsequenz anzulagern, wodurch die Genexpression von Enzymen der Glucose-Repression induziert wird (Moreno *et al.*, 2005). Ob ein solcher Feedback-Mechanismus auch die Grundlage dafür ist, dass die CMP-NeuAc Synthetase, die für die Biosynthese des Nukleotidzuckers N-Acetyl-Neuraminsäure (einer zentralen Komponente der Glykokalyx) entscheidend ist, in den Nucleus von Wirbeltierzellen transportiert wird, ist noch nicht geklärt (Kean *et al.*, 2004).

Neben einzelnen Enzymen und funktionellen Protein-Komplexen (z.B. NPC) lassen sich im Nucleus auch größere Ribonucleoprotein (RNP)-Aggregate nachweisen, die - wie es der Name besagt - aus RNA-bindenden Proteinen/Enzymen und RNA aufgebaut sind. Zu den konstitutiv exprimierten RNP-Komplexen gehören neben den Ribosomen-Untereinheiten, dem Spliceosom, der Telomerase auch das Vault-Gewölbe bzw. der Vault-Tresor, eine zytoplasmatische Organelle mit bislang unbekannter Funktion, die im Elektronenmikroskop wie die Gewölbedecke einer Kathedrale mit 39-facher Bogensymmetrie aussieht ([van Zon et al., 2003](#)). RNPs sind aber auch transient exprimierte Initiations- und Elongationsfaktoren der Transkription ebenso wie die Nuklease RNase P, die die Prozessierung von tRNA-Vorstufen bewirkt. Auch einige RNA-Viren, der RNA-induzierte Silencing-Komplex (RISC), der für RNA-Interferenz verwendet wird, und das Enzym Cas9 des CRISPR/Cas-Komplexes stellen RNP-Aggregate dar.

Es sind verschiedene Klassen an nichtcodierenden RNA-Molekülen im Nucleus identifiziert worden, die oft am Aufbau der RNP-Komplexe beteiligt sind. So gibt es zahlreiche, etwa 20-30 Nucleotide lange small RNA-Moleküle, die sich auf microRNA (miRNA), Piwi-interacting RNA (piRNA) oder small interfering RNA (siRNA) verteilen ([Kim et al., 2009b](#)). Außerdem sind bislang etwa 30 verschiedene 100-300 Nucleotide lange small nucleolar RNA (snoRNA) und small nuclear RNA (snRNA) identifiziert worden ([Matera et al., 2007](#)). Aufgrund des hohen Uracil-Anteils wird snRNA auch als U-RNA bezeichnet, die mit spezifischen Proteinen zu small nuclear RNP (snRNP)-Komplexen des Spleissosoms aggregieren ([Matera et al., 2007](#)). Daneben finden sich im Nucleus auch bis zu mehrere tausend Exemplare an long noncoding RNA (lncRNA)-Molekülen wie MALAT1, NEAT1, PVT1, CCAT1 und Xist, die alle länger als 200 Nucleotide sind ([Yao et al., 2019](#)). Sie treten häufig als Regulatoren in Genexpressionsnetzwerken auf, indem sie z.B. die Architektur des Nucleus beeinflussen, die Transkription steuern oder die Stabilität der mRNA im Zytoplasma modulieren ([Quinn und Chang, 2016](#)).

Im Nucleus gibt es außerdem diskrete Strukturen im μm -Bereich, die als Kernkörper bezeichnet werden. Der Nucleolus ist der größte dieser Kernkörper. Daneben sind weitere Kernkörper mit unterschiedlichen Funktionen beschrieben worden (siehe Kapitel 1.4).

Die hier vorgelegte, vermutlich nicht vollständige Übersicht zeigt, dass der Nucleus der eukaryotischen Zellen nicht nur eine einfache, homogene Organelle zur Aufbewahrung

der DNA oder zur Realisierung der Transkription ist, sondern vielmehr auch ein wichtiges Kompartiment im Stoffwechsel darstellt, in dem zahlreiche biochemische und zellbiologische Prozesse stattfinden und integriert werden. Die vielfältigen zellphysiologischen Funktionen innerhalb des Nucleus werden u.a. durch zwei Mechanismen reguliert: 1. posttranslationale Modifizierung von Komplexkomponenten und 2. lokale und transiente Bildung von Kompartimenten (Kernkörper), in denen dann temporär spezialisierte molekulare Prozesse verwirklicht werden. Diese beiden Regulationsmechanismen, die im Nucleus stattfinden, sollen an den zwei Beispielen der 1. Histonmodifikation sowie 2. der Assemblierung von Kernkörpern im Folgenden näher beschrieben werden.

1.2 Chromatin-Remodelling und Histonmodifikationen

Chromatin stellt kein statisches DNA-Gerüst dar, sondern kann seine räumliche Struktur punktuell verändern, indem die Konformation und Position der Histone und/oder der dazugehörigen DNA-Abschnitte modifiziert wird. Zu den molekularen Prozessen, die zur Veränderung der Architektur des Chromatins führen (‘Chromatin-Remodelling’), zählen 1. Histonmodifikationen, 2. aktive Bewegungen und Umstrukturierungen der Nucleosomen durch ATP-abhängige Chromatin-Remodelling-Komplexe (Teif und Rippe, 2009) sowie 3. DNA-Methylierungen. Durch Chromatin-Remodelling wird der Zugang von DNA-abhängigen RNA-Polymerasen oder anderen Proteinen zu den Promotorregionen von ausgewählten Genen erleichtert/erschwert, die mit den entsprechenden Nucleosomen assoziiert sind. Hierdurch kann die Häufigkeit der Gentranskription ohne Veränderung der DNA-Sequenz reguliert werden, was ein Kennzeichen von epigenetischen Prozessen ist. Insofern verwundert es nicht, dass falsch erfolgtes Chromatin-Remodelling zu pathologischen Erkrankungen führen kann (z.B. Hypo- und Hypermethylierung der DNA bei Krebs). Vor allem aufgrund der Pionierarbeiten von M. Grunstein und C.D. Allis, die hierfür 2018 den Laskerpreis verliehen bekommen haben, ist inzwischen klar geworden, dass enzymatisch-katalysierte Modifikationen bestimmter Aminosäuren in Histonen die zelluläre Genaktivität beeinflussen (Grunstein, 1997; Strahl und Allis, 2000). Eine Hypothese besagt, dass durch die Histonmodifikationen eine dichte Verpackung der Nucleosomen sterisch beeinträchtigt wird, wodurch die DNA für den Transkriptionsapparat zugänglich wird/bleibt. Im Gegensatz dazu geht die **Histoncode-Hypothese** davon aus, dass Histonmodifikationen die Wechselwirkung zwischen Histon und DNA

indirekt beeinflussen, indem andere Proteine rekrutiert werden, die dann modulierend auf die Transkription einwirken (Jenuwein und Allis, 2001). So wird beispielsweise die RelA-Untereinheit der NF- κ B durch SETD6 methyliert, wodurch die transkriptionelle Aktivierung von Zytokinen bei Entzündungsreaktionen reduziert wird (Levy *et al.*, 2011).

Die vier Histon-Proteine des Oktamers (H2a, H2b, H3 und H4) sind globuläre Proteine mit flexiblen N- und C-Termini, die oft aus den Nucleosomen herausragen. Etliche Aminosäurereste an diesen exponierten Stellen der Histone können gleichzeitig und reversibel modifiziert sein (Abb. 3). Am häufigsten werden bei Wirbeltieren die Histone H3 oder H4 modifiziert. Methylierung, Acetylierung, Phosphorylierung sind als verbreitete posttranslationale Modifikationen von Histonen beschrieben und detailliert funktionell charakterisiert worden (Strahl und Allis, 2000).

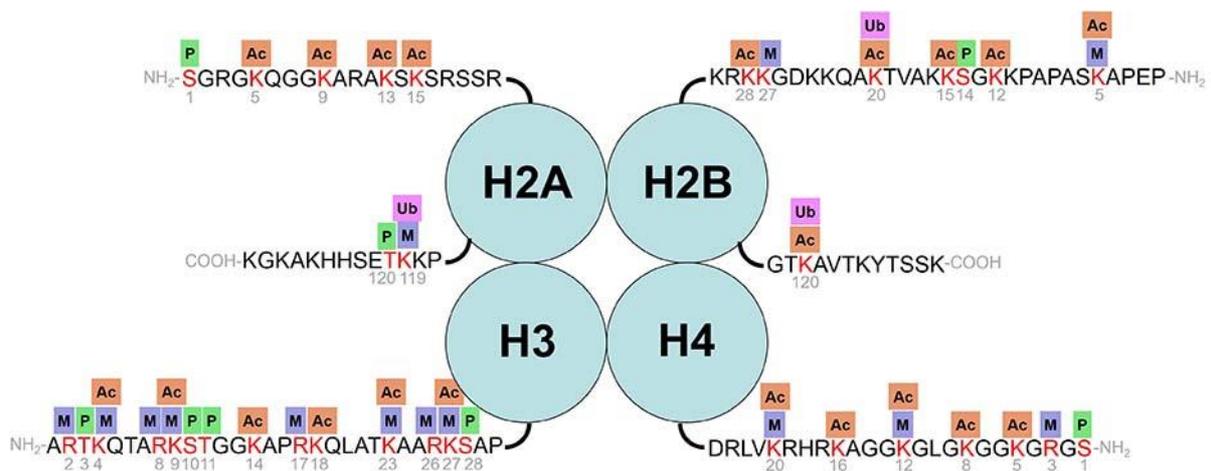


Abb. 3: Schematische Darstellung einiger möglicher posttranslationalen Modifikationen von Histonproteinen im Nucleosom. Zahlreiche Aminosäuren innerhalb der Amino- und Carboxytermini der vier Histone (H2A, H2B, H3 und H4) können enzymatisch modifiziert werden (u.a. Acetylierung, Methylierung, Phosphorylierung, Ubiquitinylierung). Die verschiedenen posttranslationalen Modifikationen üben unterschiedlichen Einfluss auf die Transkriptionsraten von nachfolgenden Genen und somit auf die zelluläre Genexpression aus. Die grauen Zahlen unter den modifizierbaren Aminosäuren repräsentieren ihre Positionen innerhalb der Primärstruktur. Modifiziert nach (Portela und Esteller, 2010)

Histone können – wie andere Proteine auch - sowohl an Lysin- als auch an Argininresten durch Methyltransferasen durch Übertragung von Methylgruppen (in der Regel aus S-Adenosyl-Methionin) **methyliert** werden. Durch die Methylgruppe(n) wird die Stärke der positiven Ladung bzw. der hydrophobe Charakter des Lysins erhöht. Es ist daher nicht verwunderlich, dass die Position einer methylierten Aminosäure innerhalb der Histon-Primärstruktur eine funktionelle Bedeutung hat: so z.B. sind Methylierungen des Lysins (K) an der Aminosäure-Position 4 im Histon H3 (H3K4), H3K36 oder H3K79 im Allgemeinen mit der Steigerung der Transkriptionsrate verbunden, während bei Methylierungen von H3K9, H3K27 oder H4K20 häufig Gen-Silencing beobachtet wird (Hyun *et al.*, 2017). Auch können entweder ein, zwei oder drei Methylgruppen auf Lysin bzw. ein oder zwei Methylreste auf Arginin übertragen werden. Je nach Grad der Methylierung einer Aminosäure (und der Modifikationen der benachbarten Aminosäuren) kann die posttranslationale Modifikation zu unterschiedlichen Funktionen führen: bei H3K9me ist die Transkription bestimmter mRNA gesteigert, während H3K9me_{2/3} mit einer Repression der entsprechenden Gene assoziiert ist (Barski *et al.*, 2007).

Histonmethylierungen können als epigenetische Modifikationen zellphysiologische Prozesse auf unterschiedlichen Ebenen beeinflussen (Kouzarides, 2007): 1. Methylierungen verändern die elektrostatische Wechselwirkung des Histons mit der negativ geladenen DNA (Phosphatreste des Rückgrats des Doppelstrangs), was zu einer direkten Induktion/Repression der Transkription von Genen führen kann, die in unmittelbarer Nachbarschaft mit dem Nucleosom assoziiert sind. 2. Methylierungen von Histonen führen gemäß der Histoncode-Hypothese zu veränderten Protein-Protein-Wechselwirkung und können so einen indirekten Einfluss über die Modulation von Signaltransduktionskaskaden auf den Grad der Chromatinkondensation, die Genexpression, die genomische Stabilität (=Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen), die Stammzellreifung, die Zelllinienentwicklung, die genetische Prägung, die DNA-Methylierung und die Mitose ausüben (Alam *et al.*, 2015).

Durch Übertragung der Acetylgruppe von Acetyl-CoA gleichfalls auf Lysinreste werden Histone durch HAT (Histonacetyltransferase) **acetyliert** (Roth *et al.*, 2001). HAT können aber auch Nicht-Histon-Proteine wie nukleäre Rezeptoren oder andere Transkriptionsfaktoren acetylieren und deren Transkriptionsraten erhöhen (Roth *et al.*, 2001). Die biologischen HAT-Wirkungen können dadurch aufgehoben werden, dass die Acetylreste an den Proteinen durch antagonistische HDAC (Histondeacetylase)

wieder abgespalten werden. Es sind Sequenzen von mindestens 13 Enzymen mit HAT-Aktivität im menschlichen Genom identifiziert worden, von denen sich die meisten Proteine aufgrund von Sequenzähnlichkeiten drei Kernfamilien zuordnen lassen: GNAT-Familie, MYST-Familie und p300/CBP-Familie (Roth *et al.*, 2001; Yuan und Marmorstein, 2013). Durch die Acetylgruppe wird die positive Ladung des Lysins aufgehoben, wodurch die elektrostatische Wechselwirkung zwischen der Aminosäure und der negativ geladenen DNA reduziert wird. In der Folge öffnet sich die Chromatin-Struktur, so dass der Transkriptionsapparat vermutlich besser mit der DNA interagieren kann (Roth *et al.*, 2001). Die Gene, die mit den acetylierten Nucleosomen assoziiert sind, werden vermehrt transkribiert. Fehlgesteuerte Histonacetylierungen sind entsprechend mit der Ätiologie von Entzündungskrankheiten und Krebs assoziiert worden (Roth *et al.*, 2001).

Ausgewählte Proteinkinasen können alle Histon-Proteine an bestimmten Serin-, Threonin- und Tyrosinresten **phosphorylieren** (Rossetto *et al.*, 2012). Eine zentrale Rolle wird dabei den Serinresten S10 und S28 im Histon H3 zugeschrieben (Adewumi *et al.*, 2019), die u.a. durch Mitogen-activated Protein Kinasen (MAPK), Stress-activated Protein Kinasen (JNK/SAPK) oder Aurorakinasen phosphoryliert werden. Phosphorylierungen dieser Serine lösen nachfolgend weitere Histonmodifikationen aus (u.a. K9ac, K14ac). Da sich dieser Crosstalk der posttranslationalen Histonmodifikationen je nach Kinase unterscheidet, werden in der Folge unterschiedliche Zellkaskaden initiiert, die letztlich zu diversen phänotypischen Veränderungen führen, z.B. Chromosomenkondensation oder Mitose (Rossetto *et al.*, 2012).

Da bei der **Ubiquitylierung** ein 76 Aminosäure langes Peptid und nicht eine kleine chemische Restgruppe an ein Lysin innerhalb einer Primärstruktur gehängt wird, unterscheidet sich diese wesentlich von den anderen posttranslationalen Modifikationen. Alle Histon-Proteine können mono-ubiquityliert werden (Mattioli und Penengo, 2021). Während diese Modifikation im Histon H3 vor allem zur Regulation der Transkription bestimmter Gene beiträgt, ist die Ubiquitylierung im Histon H2A an der Initiation der DNA Damage Response (DDR) beteiligt, mit der sich Zellen durch die Induktion von DNA-Reparaturprozessen vor genotoxischem Stress schützen (Mattioli und Penengo, 2021).

Lysin-Sumoylierung, Lysin-Biotinylierung, Lysin-Propionylierung, Lysin-Butyrylierung, Glutamin-Seronylierung und Arginin-Citrullylierung von Histonen sind zwar

identifiziert, aber noch nicht eingehend analysiert worden ([Strahl und Allis, 2000](#); [Ryu und Hochstrasser, 2021](#)).

Posttranslationale Modifikationen in Histonen und DNA-Methylierungen weisen oft ein ähnliches Muster auf, so dass vermutet wurde, dass eine Wechselwirkung zwischen den beiden epigenetischen Prozesse wesentlich zur Etablierung des zellulären Phänotyps beiträgt ([Cedar und Bergman, 2009](#)).

1.3 Methyltransferasen

Methyltransferasen übertragen eine oder mehrere Methylgruppe(n) auf zelluläre Substrate. Sie sind wichtige Enzyme im Rahmen zahlreicher anabolischer Prozesse bei der Aktivierung von Enzymen, haben aber auch essenzielle Bedeutung beim Prozessieren von Nucleinsäuren als Informationsträger, z.B. bei der DNA-Methylierung, beim mRNA-Capping und der Modifizierung von tRNA ([Boriack-Sjodin und Swinger, 2016](#)).

Als Methylgruppendonator dient in der Regel S-Adenosyl-L-Methionin (SAM), das bei der nucleophilen Addition der Methylgruppe auf Lysin zu S-Adenosyl-Homocystein oxidiert wird ([Zhang *et al.*, 2003](#)). Die meisten Histon-Methyltransferasen exprimieren für die Katalyse dieser Reaktion eine ca. 130 Aminosäuren lange SET (Su(var)3-9, Enhancer of Zeste, Trithorax)-Domäne ([Qian und Zhou, 2006](#)). Neben der SET-Domäne weisen die entsprechenden Histon-Methyltransferasen noch gelegentlich eine N-terminale Prä-SET-Domäne mit bis zu neun konsekutiven Cysteinen sowie eine obligate C-terminale Post-SET-Domäne mit drei Cysteinen auf, mit denen Zinkionen gebunden werden, die für die Katalyse notwendig sind. Diese beiden Domänen sind an der SAM-Bindung und der Wechselwirkung mit dem Histon beteiligt ([Qian und Zhou, 2006](#)).

Von den im humanen Genom kodierten Methyltransferasen sind sechs von insgesamt neun Arginin-spezifischen Histon-Methyltransferasen ([Hwang *et al.*, 2021](#)) und bislang 43 identifizierte Lysin-spezifische Histon-Methyltransferasen nachgewiesenermaßen enzymatisch aktiv ([Dillon *et al.*, 2005](#); [Qian und Zhou, 2006](#); [Crump und Milne, 2019](#)). Obwohl fast alle Lysin-spezifischen Histon-Methyltransferasen eine SET-Domäne besitzen, lassen sich aufgrund des allgemeinen Domänenaufbaus und durch Sequenzähnlichkeiten mindestens sieben Genfamilien mit folgenden Mitgliedern definieren:

EZ Genfamilie: EZH1, EZH2

MLL/SET1 Genfamilie: MLL1 (HRX, ALL1), MLL2 (ALR, KMT2D), MLL3, MLL4 (HRX2), MLL5, SETD1A, SETD1B, SET1 (ASH2), SET1L

NSD/SET2 Genfamilie: NSD1, NSD2 (MMSET/WHSC1), NSD3 (WHSC1), HIF1 (HYPB), ASH1

PRDM/RIZ Genfamilie: PRDM1 (BLIMP1), PRDM2 (RIZ)

SMYD Genfamilie: SMYD1, SMYD2, SMYD3, SMYD4, SMYD5

SUV39 Genfamilie: SETMAR, SUV39H1, SUV39H2, G9a (EHMT2), GLP1 (EHMT1), ESET (SETDB1), CLLL8 (SETDB2)

SUV4-20 Genfamilie: SUV4-20H1, SUV4-20H2

7BS KMT/DOT1 Genfamilie: DOT1L (DOT1, KMT4).

sowie die **SET-Methyltransferasen:** SET, SETD2, SETD3, SETD4, SETD5, SETD6, SETD7 (KMT7, SET7, SET7/9), SETD8 (KMT5A), SETD9.

Darüber hinaus ist eine Nicht-SET-Domänen-haltige Genfamilie von Lysin-spezifischen Histone-Methyltransferasen mit Spezifität für H3K79 identifiziert worden. Aus dieser Familie wird eine Methyltransferase (DOT1-like (DOT1L) protein) auch in humanen Zellen exprimiert ([Feng et al., 2002](#)). Die Vielfalt der Lysin-spezifischen Histone-Methyltransferasen wird durch Spleissisoformen sowie die Ausbildung von umfassenden Proteinkomplexen (z.B. WRAD bestehend aus WDR5-RbBP5-ASH2L-DPY30-Proteinen) noch weiter erhöht ([Ernst und Vakoc, 2012](#)).

1.4 Smyd-Genfamilie

Die Smyd-Genfamilie besteht aus fünf Mitgliedern, die als Smyd1, Smyd2, Smyd3, Smyd4 und Smyd5 bezeichnet werden ([Spellmon et al., 2015](#)). Alle Mitglieder der Smyd-Genfamilie weisen eine ähnliche Domänenstruktur auf (Abb. 4). Namensgebend enthalten sie eine SET (Su(var)3-9, Enhancer-of-zeste and Trithorax)- und eine MYND (myeloid, Nervy, and DEAF-1)-Domäne ([Gottlieb et al., 2002](#); [Leinhart und Brown, 2011](#)), wobei die SET-Domäne durch die MYND-Domäne und weitere Sequenzen in zwei Segmente unterteilt wird. Der SET-Domäne folgt eine cysteinreiche sogenannte post-SET-Domäne. Die SET-Domäne ist für die Methylierung von unacetylierten Lysinresten an Histonen verantwortlich ([Rea et al., 2000](#); [Jenuwein und Allis, 2001](#); [Nakayama et al., 2001](#)). Die MYND-Domäne besteht aus einem Cluster von Cystein- und Histidinresten, die ein konserviertes Zink-Finger-Motiv ausbilden, das die Bindung an prolinreiche Bereiche in Zielproteinen ermöglicht. Im Fall von Smyd1 ist diese an der Rekrutierung von Histon-Deacetylasen (HDACs) beteiligt ([Gottlieb et al., 2002](#)).

Für die MYND-Domäne konnte zudem (mit Hilfe elektrostatischer Oberflächenanalyse) gezeigt werden, dass diese bei Smyd1-3 stark positiv geladen ist und vermutlich die Bindung an DNA ermöglicht (Spellmon *et al.*, 2015). Smyd1-4 weisen zudem eine C-terminale Domäne auf, welche strukturelle Ähnlichkeiten mit Tetratricopeptide Repeats (TPR) aufweist, und für die Bindung von Ko-Chaperonen an das Hitzeschockprotein 90 (Hsp90) von Bedeutung ist (Brown *et al.*, 2015). Es wird zusätzlich angenommen, dass die C-terminale Domäne eine auto-inhibitorische Funktion besitzt, indem sie die Substratbindestelle kontrolliert (Jiang *et al.*, 2011; Sirinupong *et al.*, 2011).

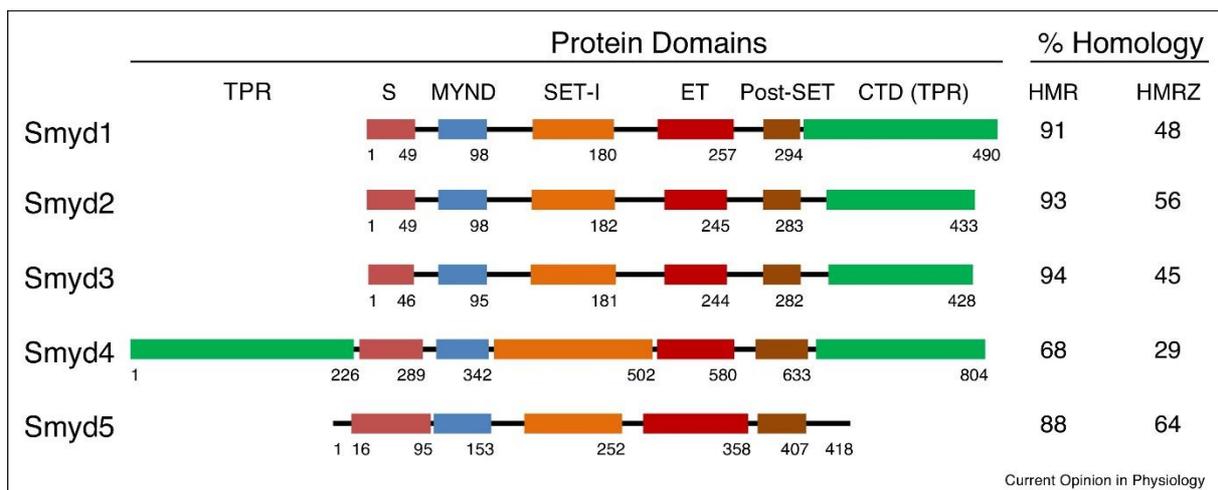


Abb. 4: Domänenstruktur der Smyd-Familie. Die Smyd-Familie besteht aus fünf Mitgliedern, die alle als Charakteristikum eine durch die SET-Domäne gespaltene MYND-Domäne aufweisen (Tracy *et al.*, 2018). HMR = Mensch, Maus, Ratte; HMRZ = Mensch, Maus, Ratte, Zebrafisch.

Die höchsten Konzentrationen von Smyd1, Smyd2 und Smyd3 finden sich im Herz und im Skelettmuskel, während Smyd4 hauptsächlich in den Gonaden lokalisiert ist und Smyd5 in vielen Zelltypen exprimiert wird (Kim *et al.*, 2014).

Aufgrund der konsistenten Organisation ihrer Domänenstruktur weisen prinzipiell alle Smyd-Proteine eine Lysin-Methyltransferase-Aktivität auf, die es ihnen ermöglicht, die Methylierung von Histonen und speziellen Nicht-Histon-Proteinen zu katalysieren. Dabei sind vier der fünf Smyd-Familienmitglieder in der Lage, Histone zu methylieren, wodurch sie die Transkriptionsfrequenz von definierten Genen kontrollieren. Nur für Smyd4 konnte bislang keine Methyltransferaseaktivität, weder *in vivo*, noch *in vitro*, nachgewiesen werden. Für die übrigen Mitglieder der Smyd-Familie konnte gezeigt werden, dass diese folgende Lysinereste an entsprechenden Histonen methylieren: H3K4, H3K36 oder H4K5 (Brown *et al.*, 2006; Huang und Xu, 2017; Tracy *et al.*, 2018). Die Komplexität dieser Histonmodifikation wird dadurch erhöht, dass die meisten

Lysine einmal (me1), zweimal (me2) oder sogar dreimal (me3) methyliert werden können. Diese posttranslationalen Modifikationen der Histone verursachen Konformationsänderungen des Nukleosoms, wodurch die Zugänglichkeit der Promotorsequenzen für den Transkriptionsapparat direkt verändert werden kann (Bannister und Kouzarides, 2011). Alternativ könnten methylierte Histone gemäß dem Histon-Code (Strahl und Allis, 2000) von Faktoren gebunden werden, die dann indirekt Veränderungen der Transkriptionsfrequenz der nachgeschalteten Zielgene auslösen. Das Chromatin-Remodelling kann Smyd1 zudem auch durch die Interaktion mit HDAC1-3, NCoR and SMART beeinflussen (Sims *et al.*, 2002). Auch können Smyd-Proteine über ihre Zinkfingerdomäne mit anderen Proteinen interagieren, und so z.B. Transkriptions-Corepressoren (Thompson und Travers, 2008; Stender *et al.*, 2012) oder Transkriptionsfaktoren (Sims *et al.*, 2002) rekrutieren. Des Weiteren kann die Transkription bestimmter Zielgene durch einige Mitglieder der Smyd-Familie dadurch gesteuert werden, dass ihre Bindung an DNA-Abschnitte zur sterischen Hemmung des Transkriptionsapparats oder zur Erhöhung ihrer Methyltransferase-Aktivität (Xu *et al.*, 2011; Franklin *et al.*, 2016) führt. Protein-Protein-Interaktionen sowie die Methylierung von Nicht-Histon-Proteinen stellen weitere Wirkmechanismen der Smyd-Mitglieder dar, die auch außerhalb des Zellkerns eine Rolle spielen könnten (Rasmussen *et al.*, 2015). Spezifische Interaktionen mit Proteinen werden vermutlich durch die MYND-Domäne vermittelt, wie die Beteiligung von Smyd1 und Smyd2 am Aufbau von Sarkomeren (Sarkomer-Assembly) (Tan *et al.*, 2006; Just *et al.*, 2011; Voelkel *et al.*, 2013) oder die Interaktion von Smyd1 mit skNAC (Sims *et al.*, 2002) zur Regulation der Zytoplasma-Kern-Translokation.

Die fünf Proteine der Smyd-Genfamilie wurden ursprünglich im Herz und in Skelettmuskeln entdeckt, wo sie an der Kardiomyogenese und dem Sarkomeraufbau beteiligt sind (Du *et al.*, 2014). Inzwischen ist jedoch klar, dass ihre Gewebeverteilung und ihre funktionelle Relevanz viel komplexer ist als zunächst berichtet, da Smyd-Proteine mit vielen anderen Proteinen interagieren, wodurch sie an vielen weiteren zellphysiologischen Prozessen wie Chromatin-Remodelling, Transkription, Signaltransduktion und Zellzykluskontrolle modifizierend beteiligt sind (Du *et al.*, 2014; Spellmon *et al.*, 2015; Rueda-Robles *et al.*, 2021).

Eine Beteiligung an der Krebsentstehung konnte für Smyd2, Smyd3 und Smyd4 nachgewiesen werden (Tracy *et al.*, 2018; Yi *et al.*, 2019; Bottino *et al.*, 2020). Auch zahlreiche kardiovaskuläre Erkrankungen gehen mit Überexpression oder Dysfunktion

von Smyd-Proteinen einher (Spellmon *et al.*, 2015). Zunehmend mehr Daten legen zudem eine zentrale Rolle der Smyd-Mitglieder bei der Modulation inflammatorischer Prozesse nahe (Doughan *et al.*, 2016; Rubio-Tomas, 2021).

1.5 Kernkörper

In vielen Nuclei der eukaryotischen Zellen werden Vesikel mit Durchmesser im μm -Bereich lichtmikroskopisch beobachtet, die als Kernkörper (Nuclear bodies, NB) bezeichnet werden (Mao *et al.*, 2011; Stanek und Fox, 2017). Obwohl einige dieser Kernkörper sich in Form und Größe ähneln, lassen sie sich aufgrund ihrer spezifischen Proteinzusammensetzung immunhistochemisch eindeutig voneinander unterscheiden (Abb. 5). Elektronenmikroskopische Analysen zeigten, dass die Kernkörper nicht mit einer biologischen Membran gegenüber dem Karyoplasma

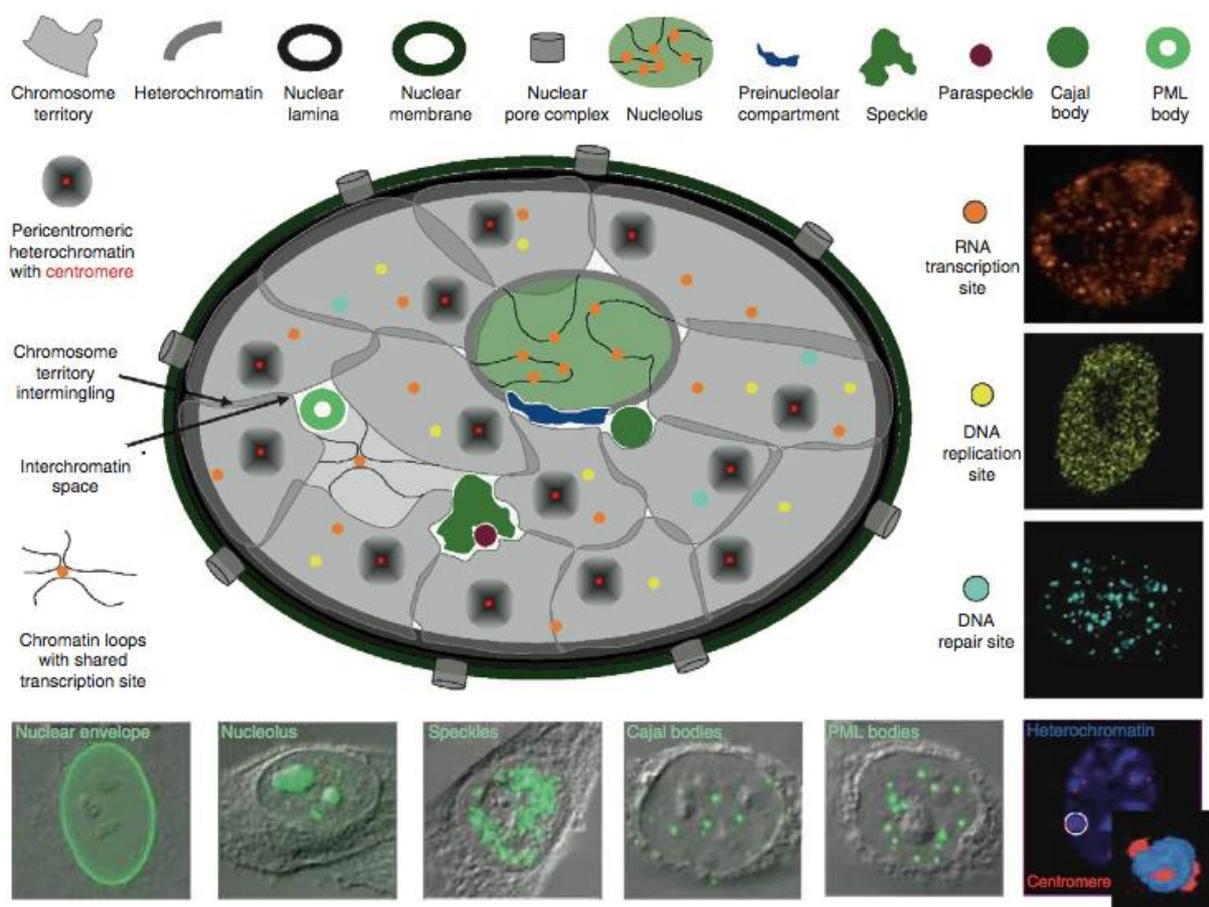


Abb. 5: Schematische Übersicht über den intranukleären Aufbau. Zwischen den Chromatin-Domänen (grau) finden sich spaltähnliche Interchromatindomänen, in denen die Kernkörper lokalisiert sind. Die mindestens neun verschiedenen Kernkörper unterscheiden sich in Anzahl und Größe (siehe Tab. 1). Die Abbildung wurde entnommen aus (Lenser *et al.*, 2010).

abgegrenzt sind. Entsprechend sind Kernkörper als molekulare Komplexe oder Aggregate, als biomolekulare Kondensate, als membranlose Organellen oder auch als Hubs und Cluster beschrieben worden ([Sabari et al., 2020](#)).

Alle Kernkörper sind von dynamischer Natur, d.h. dass sie nicht permanent existieren, sondern nur in bestimmten Phasen des Zellzyklus zu beobachten sind, z.B. während der Interphase. In anderen Phasen des Zellzyklus hingegen, z.B. während der Mitose, lösen sich die Kernkörper-Aggregate auf, wobei ihre Komponenten anschließend im Karyoplasma oder in anderen Kernbereichen einzeln zwischengespeichert werden ([Sabari et al., 2020](#)). Aufgrund dieser Dynamik ist vermutet worden, dass die Kernkörper temporär benötigte Reaktionsräume für molekulare Interaktionen darstellen, die ansonsten in der überfüllten Umgebung im Nukleus nur schwer oder gar nicht möglich wären.

Die molekularen Komponenten, aus denen sich die Kernkörper zusammensetzen, sind inzwischen vielfach mittels Proteom-weiter Analysemethoden und anschließender Massenspektrometrie identifiziert worden. Obwohl sich einige Kernkörper bestimmte Strukturelemente teilen, weisen sie alle spezifische Proteinprofile auf, auf die funktionelle Unterschiede zwischen den verschiedenen Kernkörpern zurückgehen ([Galganski et al., 2017](#)). Auch sind in fast allen bislang identifizierten Kernkörpern Anteile von DNA oder RNA integriert (Ausnahme: PML-NB, siehe unten). Interessanterweise können sich einige der Kernkörper aufgrund gerichteter Quartärstrukturen ihrer Proteinanteile sowie spezifischer Helix-Bildung der Nukleinsäureabschnitte zu mindestens teilweise selbstorganisatorisch ausbilden ([Kaiser et al., 2008](#)).

Obwohl man inzwischen einige zellphysiologische und/oder bestimmte biochemische Eigenschaften der Kernkörper kennt (Tab. 1), sind noch viele Fragen insbesondere bezüglich ihrer Funktion offen. Die meisten Kernkörper sind an DNA- oder RNA-betreffenden Prozessen beteiligt, z.B. an der Regulation der Chromosomenstruktur, der DNA-Replikation, der DNA-Reparatur, der Transkription inklusive posttranskriptionaler Verarbeitung der mRNA und der Assemblierung der beiden Ribosomenuntereinheiten. Auffällig ist, dass für die Realisierung dieser Prozesse größere Komplexe von RNA-bindenden Proteinen und RNA benötigt werden, die als Ribonucleoproteine (RNPs) beschrieben worden sind ([Dreyfuss et al., 1988](#)) und ihrerseits oftmals in Kernkörpern zusammengebaut werden. RNPs sind daher oft zentraler Bestandteil von Kernkörpern. Eine Ausnahme stellen PML-NBs dar, die als

reine Proteinaggregate (also nicht als RNPs) Plattformen für posttranslationale Modifikationen von zellulären Proteinen darstellen und somit auch nachgeschaltete Signaltransduktionskaskaden beeinflussen können.

	Wichtigste Funktion(en)	Hauptkomponente(n)	Durchmesser (µm)	Anzahl
Nucleolus	Biogenese der beiden Ribosomenuntereinheiten	RNA-Polymerase I rRNA Processing-faktoren ribosomale Assemblierungsfaktoren	3–8	1 (manchmal bis zu 4)
Nuclear speckle (NS)	Lagerung und Recycling von Spleißfaktoren mRNA-Prozessing	MALAT1-lncRNA	1–3	20–50
Paraspeckle (PS)	mRNA-Regulation, RNA-Editing	NEAT1-lncRNA NONO, SFPQ/PSF, PSPC1	0,2–1	2–30
Nuclear stress body (nSB)	Regulation der Transkription und des Spleißens unter Stress	HSATIII-lncRNAs HSF1, HAP	1–2	2–6
Cajal body (CB)	Biogenese, Reifung und Recycling kleiner RNAs	Coilin, SMN	0,3–1,0	1–10
Peri-nucleolar compartment (PNC)	Posttranskriptionelle Modifikation einiger Pol III-RNA Transkripte	PTB	0,2–1	1–2 Tumorzellen bis zu 10)
Histone locus body (HLB)	Modifikation der Histon-mRNA	NPAT, FLASH, U7-snRNP, CPSF-73	0,2–1,2	2–4
PML nuclear body (PML-NB)	Regulation der Genomstabilität, DNA-Reparatur, Kontrolle der Transkription, Virusabwehr, Signaltransduktionskaskaden	PML-Protein	0,1–1	10–30

Tab. 1: Übersicht über prominente Kernkörper und einige ihrer Eigenschaften. Modifiziert nach (Dundr und Misteli, 2010).

Neben den acht unterscheidbaren, gut charakterisierten Kernkörpern, die im Folgenden besprochen werden, werden zu den Kernkörpern noch sogenannte ‚Orphan nuclear bodies‘ (Carmo-Fonseca *et al.*, 2010) gezählt, die bislang noch nicht

so intensiv untersucht worden sind, namentlich Polycomb (PcG)-Body, OPT Domäne, Sam68, Cleavage body, Clastosomes, SUMO body, PIKA (Carmo-Fonseca *et al.*, 2010), Super-Enhancer, YAP, SPOP/DAXX (Sabari *et al.*, 2020) und Gems = Gemini of Cajal bodies (Nizami *et al.*, 2010).

Nucleolus

Der bekannteste Kernkörper ist der Nucleolus, der als Dock für den Zusammenbau der beiden Ribosomenuntereinheiten aus ribosomaler RNA (rRNA) und zahlreichen Proteinen (40S Untereinheit: 18S rRNA und 33 Proteine; 60S Untereinheit: 28S, 5,8S und 5S rRNA und 49 Proteine) fungiert, welche dann nach Fertigstellung durch die Kernporen ins Zytoplasma transportiert werden (Scheer und Hock, 1999). Daneben beeinflusst der Nucleolus auch andere zelluläre Prozesse wie die Mitose, den Zellzyklus, die Proliferation sowie die Biogenese mehrerer RNPs (Boisvert *et al.*, 2007).

Mittels Elektronenmikroskopie ist der Feinbau des Nucleolus untersucht worden (Hernandez-Verdun, 2006): in der Mitte des Kernkörpers befindet sich das fibrilläre Zentrum (FC), das von einer Fibrillarin- und Nucleolin-haltigen, dichten fibrillären Komponente (DFC) umgeben ist. Nach außen hin folgt die Nucleophosmin-haltige körnige Komponente (GC). Die einzelnen Schritte des Zusammenbaus der beiden Ribosomenuntereinheiten lassen sich diesen Nucleolus-Schichten zuordnen: die rRNA-Primärtranskripte werden im FC aus der DNA umgeschrieben, in der DFC gespalten und modifiziert, um dann in der GC mit den ribosomalen Proteinen zusammengesetzt zu werden (Hernandez-Verdun, 2006).

Nuclear speckle (NS)

Im Vergleich zu den anderen Kernkörpern ist die Anzahl an Nuclear speckles (NSs) hoch, da jeder Nucleus etwa 20-50 dieser molekularen Aggregate enthält. Auf lichtmikroskopischer Ebene haben NS einen Durchmesser von etwa 1-3 µm, jedoch zeigte die elektronenmikroskopische Analyse, dass NSs aus Clustern von zahlreichen Interchromatin Granules (ICGs) aufgebaut sind, die jeweils einen Durchmesser von 20–25 nm haben und durch feine Fibrillen untereinander verknüpft sind (Galganski *et al.*, 2017).

In jedem ICG der NSs finden sich snRNPs, die für verschiedene Reaktionen der mRNA-Prozessierung benötigt werden, wie z.B. Aktivierung und Repression der

Transkription, Transkriptionselongation und -termination, mRNA-Spleißen, Polyadenylierung am 3'-Ende sowie mRNA-Export aus dem Nucleus (Kiss, 2004). Auch Enzyme, die die Aktivität dieser mRNA-modifizierenden snRNPs modulieren, sind in den NS verpackt. Hierzu gehören zahlreiche (mehr als 30) Proteinkinasen sowie Enzyme des Phosphoinositol-Signalwegs, der Ubiquitylierung und der SUMOylierung. In den NS-Komplexen wird auch eine lange nicht-kodierende (lnc) RNA namens MALAT1 (Metastasis-associated lung carcinoma transcript 1) integriert, die eine Rolle bei physiologischen Prozessen wie beim alternativen Spleißen oder der epigenetischen Modulation der Genexpression, aber auch bei der pathologischen Krebsentstehung spielt (Zhang *et al.*, 2017).

Paraspeckle (PS)

Paraspeckles (PSs) sind kleine, unregelmäßig geformte Kernkörper, die in großer Anzahl (2 bis 30 pro Kern von Säugetierzellkernen) stets in unmittelbarer Nähe (griechisch: παρά = bei) zu Nuclear speckles aufzufinden sind (Fox *et al.*, 2018).

Für die Architektur der PS ist eine lncRNA namens NEAT1 (Nuclear-enriched abundant transcript 1) mit einer Länge von 3200 Nucleotiden entscheidend, das zusammen mit den konstitutiv exprimierten Proteinen NONO/p54nrb, SFPQ/PSF und PSPC1 einen Keim für die Rekrutierung von mindestens 30 RNA-bindenden Proteinen bildet (Fox *et al.*, 2018). Etliche dieser NEAT1-bindenden Proteine haben Funktionen bei der Genregulation (z.B. als Transkriptionsfaktoren), werden sie durch Rekrutierung bzw. Sequestrierung in PS depletiert, so fehlen sie bei der Transkription von anderen Genen. Durch diesen Mechanismus als "molekularer Schwamm" (Nakagawa *et al.*, 2018) können PSs und ihre Komponenten eine Rolle bei der Regulation der mRNA-Transkription und des RNA-Editierens (posttranskriptionelle Modifikation einzelner Nucleotide) vor allem während der Zelldifferenzierung oder bei Virusinfektionen spielen. Da jedoch NEAT1-KO-Mäuse lebensfähig sind, werden PSs als nicht-essentielle Kernkörper betrachtet, die aufgrund besonderer Umweltaforderungen gebildet werden (Nakagawa *et al.*, 2011).

Nuclear stress body (nSB)

Im Nucleus von Zellen, die proteotoxischem (entweder thermischem, osmotischem oder hypoxischem) Stress ausgesetzt werden, lassen sich vermehrt Nuclear stress bodies (nSBs) beobachten (Biamonti und Vourc'h, 2010). Entsprechend kommen in

nSBs vor allem Proteine vor, die als Heat Shock Proteine bekannt sind, u.a. heat shock transcription factor 1 (HSF1) und hnRNP A1-associated protein (HAP) (Weighardt *et al.*, 1999). Außerdem werden highly repetitive satellite III-long non-coding RNAs (HSATIII-lncRNAs, als Adapter für die Proteinbindung) in nSBs eingebaut (Goenka *et al.*, 2016).

Es wird angenommen, dass nSBs an der Geninduktion von Faktoren für diejenigen biochemischen Prozesse beteiligt sind, durch die gestresste Zellen vor Schaden geschützt werden, u.a. an der Regulation der Expression von spezifischen Transkriptions- und Spleissfaktoren (Mao *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2020).

Cajal body (CB)

Die Anzahl von Cajal-Körpern (Cajal Bodies bzw. Coiled Bodies, CBs) im Nucleus variiert je nach Zelltyp: während differenzierte Zellen nur 1-3 CBs aufweisen, sind bis zu 10 Exemplare dieser Kernkörper in proliferierenden Embryonalzellen oder Tumorzellen zu beobachten (Wang *et al.*, 2016; Stanek, 2017). CBs sind in unmittelbarer Nähe zu Nucleoli zu finden, wenn sich die Zellen nicht gerade teilen.

Coilin, das die Assoziation der CBs mit den Nucleoli vermittelt, gilt als Marker für CBs. In den CBs finden sich zahlreiche snRNP-Aggregate, die u.a. als Spleissosomen die Spleißmaschinerie des Nucleus generieren und posttranskriptional modifizieren, bevor diese zu den Nuclear speckles weitertransportiert werden (Sleeman und Lamond, 1999). Außerdem sind CBs an der Prozessierung der Histon-mRNA und der Erhaltung von Telomeren beteiligt (Wang *et al.*, 2016).

In CBs von Wirbeltierzellen wird auch das Survival of Motor Neuron (SMN)-Protein exprimiert, das den Zusammenbau eines größeren Chaperon-Proteinaggregats organisiert, der die Montage von snRNAs kontrolliert. Mutationen im SMN-Gen führen zu einer spinalen Muskelatrophie (Ji *et al.*, 2021) bei etwa 1/10000 Neugeborenen.

Perinucleolar compartment (PNC)

Perinucleoläre Kompartimente (PNCs) werden am Rand von Nucleoli in allen eukaryotischen Zellen beobachtet. Statt 1-2 PNC-Exemplare in Primärkulturen und Zelllinien werden in kultivierten Tumorzellen bis zu 10 PNC-Exemplare nachgewiesen (Pollock und Huang, 2010). Interessanterweise korreliert die Anzahl von PNCs mit der Metastasierungs-kapazität der Krebszellen in einem breiten Spektrum solider Tumoren (Norton *et al.*, 2008).

Eine Reihe von Proteinen und RNAs wechselwirken dynamisch mit PNC, die am Prä-mRNA-Spleißen, alternativen Spleißen und RNA-Polyadenylieren beteiligt sind. Im Allgemeinen wird das Polypyrimidine tract-binding protein (PTB) als Markerprotein für PNC betrachtet. Außerdem sind die Präsenz vom CUG-binding protein (CUG-BP), Cyclin-dependent kinase (CDK)13, KH-type splicing regulatory protein (KSRP), Raver1, Raver2, Rod1 und Nucleolin in PNCs nachgewiesen, deren mRNA durch die RNA-Polymerase II transkribiert werden. Die bisher identifizierten RNA-Moleküle, die in PNC modifiziert werden (RNase mitochondrial processing (MRP)-RNA, ribonuclease P (RNase P)-RNA, hY-RNA, Alu-RNA und signal recognition particle-7SL (SRP-7SL)-RNA) sind kleine, nichtkodierende RNAs, die von der RNA-Polymerase III transkribiert werden. Ausgehend von diesem Transkriptionsmuster ist vermutet worden, dass PTBs Teil eines Mechanismus sind, mit dem die RNA-Polymerase II die spezifische Transkriptionsaktivität der RNA-Polymerase III besonders in Tumorzellen kontrolliert ([Pollock und Huang, 2010](#)).

Histone locus body (HLB)

In Histon-Locus-Körpern (HLBs) werden die Faktoren modifiziert und somit aktiviert, die für die Umwandlung der Histone-hnRNA zur reifen mRNA erforderlich sind ([Tatomer *et al.*, 2016](#); [Marzluff und Koreski, 2017](#)). Nachdem die DNA in der S-Phase des Zellzyklus repliziert wurde, müssen in der nachfolgenden G2-Phase zahlreiche Histone hergestellt werden, um ausreichend Nucleosomen für die Verpackung beider (des alten und des neuen) DNA-Stränge zur Verfügung zu haben. Die Gene für die fünf Histone liegen in eukaryotischen Zellen mehrfach geclustert an einem Genlocus auf der DNA vor. Die mRNA der Histone wird dann nach der Transkription zu den HLB transportiert ([Marzluff und Koreski, 2017](#)). Innerhalb einer Matrix, die hauptsächlich aus dem Gerüstprotein NPAT (Nuclear Protein of the ATM locus) aufgebaut ist, werden FLASH (Flice-assoziiertes riesiges Protein), U7 Small Nuclear RNP (U7 snRNP) und die Endonuklease CPSF-73 rekrutiert und zu einem Aggregat zusammenbaut. Dieser Proteinkomplex modifiziert dann das 3'-Ende der Histon-mRNAs, die ungewöhnlicherweise nicht polyadenyliert sind, sondern in einer konservierten Stammschleife enden, die die Halbwertszeit der Histon-mRNA beeinflusst ([Marzluff und Koreski, 2017](#)).

PML nuclear body (PML-NB)

PML-Kernkörperchen (PML nuclear bodies, PML-NB; auch bekannt als POD (PML oncogenic domain), ND10 (nuclear domain 10) oder Kremer-Kernkörperchen) wurden vor über 50 Jahren elektronenmikroskopisch im Nucleus entdeckt ([de The et al., 1960](#)). PML-NBs haben einen Durchmesser von 0,1-1 µm und sind damit etwas kleiner als die anderen Kernkörper, kommen aber in großer Anzahl (10-30) im Nucleus von kultivierten Zellen vor ([Ascoli und Maul, 1991](#); [Lallemund-Breitenbach und de The, 2018](#)).

Inzwischen sind etliche Bestandteile der PML-NB identifiziert worden: neben dem namensgebenden PML-Protein können sich noch etwa 150 andere Proteine, z.B. p53, Sp100, Daxx and CBP in PML-NBs organisieren ([Van Damme et al., 2010](#); [Hoischen et al., 2018](#)). Nicht alle dieser Proteine sind in allen PML-NBs zu finden, vielmehr kann man unterschiedliche Typen von PML-NBs definieren. Diese Vielfalt mag erklären, wieso PML-Kernkörperchen nicht nur (wie die anderen Kernkörper) mit der Regulation von biochemischen DNA- oder RNA-Prozessen wie der Aufrechterhaltung der Genomstabilität, der DNA-Reparatur, der Kontrolle der Transkription oder der Virusabwehr in Verbindung gebracht werden, sondern auch über posttranslationale Modifikationen zahlreiche zelluläre Signaltransduktionskaskaden bzw. Proteinfunktionen beeinflussen ([Borden, 2002](#); [Everett und Chelbi-Alix, 2007](#); [Lallemund-Breitenbach und de The, 2010](#)).

PML-NB wirken durch vier unterscheidbare Eigenschaften an den zahlreichen zellphysiologischen Funktionen mit: 1. als Proteindepots, 2. als Bereiche nukleärer Aktivität, 3. als Orte der RNA-Regulation oder 4. als Hotspots für posttranslationale Modifikationen von Proteinen (z.B. SUMOylierung) ([Scherer und Stamminger, 2016](#)). Bei der SUMOylierung wird ein etwa 12 kDa langes Peptid, der Small Ubiquitin Related Modifier (SUMO) an einen Lysinrest innerhalb einer Konsensussequenz ΨKxE/D (hydrophobe Aminosäure gefolgt von Lysin, einer beliebigen Aminosäure und entweder Glutaminsäure oder Asparaginsäure) von definierten Zielproteinen kovalent durch Ligasen verknüpft ([Geiss-Friedlander und Melchior, 2007](#)). Die SUMOylierung ist ein reversibler Prozess, denn die Dekonjugation von SUMO von Proteinen kann durch spezifische SUMO-Proteasen katalysiert werden ([Mikolajczyk et al., 2007](#)).

Die SUMOylierung von Proteinen beeinflusst zahlreiche zelluläre Prozesse, wie die Genexpression, die Proteinstabilität, Enzymaktivitäten, Protein-Protein-Interaktionen sowie Transportprozesse in den oder aus dem Nucleus ([Geiss-Friedlander und](#)

Melchior, 2007; Wang und Dasso, 2009; Flotho und Melchior, 2013). Die SUMOylierung ist daher von zentraler Bedeutung für die Homöostase einer jeden Zelle.

1.6 PML

Hauptbestandteil der PML-Kernkörperchen ist das namensgebende PML(-Protein) (Lallemand-Breitenbach und de The, 2010). PML wurde ursprünglich bei akuter Promyelozytärer Leukämie identifiziert, bei der als häufigste Ursache eine chromosomale t(15;17)-Translokation stattfindet, die zur Fusion des PML-Gens an das Retinolsäurerezeptor- α (RAR α) Gen führt (de The *et al.*, 1991; Kakizuka *et al.*, 1991), hierdurch geht die Fähigkeit der PML-Kernkörperchen zur Aggregation verloren (Dyck *et al.*, 1994; Weis *et al.*, 1994). Immunzytologisch stellt sich PML als eine auffällig mikrogesprenkelte Verteilung von Immunreaktivität im Nucleus dar (Dyck *et al.*, 1994; Koken *et al.*, 1994; Weis *et al.*, 1994).

PML gehört aufgrund seiner N-terminalen RING/B-Box/Coiled-Coil (RBCC)-Domäne, die vor allem Protein-Protein-Interaktionen vermittelt, zur sogenannten RBCC/Trim-Proteinfamilie (Jensen *et al.*, 2001). In menschlichen Zellen werden aufgrund alternativen Spleißens aus dem aus neun Exons aufgebauten PML-Gen mindestens 12 verschiedene Transkripte hergestellt, die hauptsächlich am C-Terminus variieren (Nisole *et al.*, 2013). Während für die Isoformen PML1-6 eine Kernlokalisierung nachgewiesen werden konnte, existieren auch einige PML-Isoformen im Zytoplasma (Nisole *et al.*, 2013). Zumindest PML1 kann zwischen den beiden subzellulären Kompartimenten pendeln.

PML wurde aufgrund seiner Inaktivierung in vielen Fällen der akuten promyelozytären Leukämie zunächst als Tumorsuppressorgen angesehen (Gurrieri *et al.*, 2004), ist jedoch später (ebenso wie PML-Kernkörperchen) mit zahlreichen weiteren Regulationsfunktionen im Zellzyklus, bei der Apoptose, bei der zellulären Stressantwort, bei der DNA-Reparatur und bei antiviralen Zellantworten in Verbindung gebracht worden (Lallemand-Breitenbach und de The, 2010; Guan und Kao, 2015; Hsu und Kao, 2018).

PML kann an drei Ziel-Lysinen (K65, K160 und K490) SUMO-konjugiert sein, wodurch seine katalytischen Aktivitäten moduliert werden (Kamitani *et al.*, 1998). Das PML-Protein gilt als der Schlüsselregulator des Zusammenbaus der PML-NB, da bei Verlust der PML-Expression diese Kernkörperchen nicht mehr ausgebildet werden (Ishov *et*

al., 1999), und nur wenn es SUMOyliert ist, weist PML PML-NB Assemblierungsaktivität auf (Zhong et al., 2000). Die Ausbildung und strukturelle Integrität der PML-NBs beruht laut Hoischen et al. (Hoischen et al., 2018) auf mindestens fünf hintereinander ablaufenden Prozessen (Abb. 6): Die erste Phase wird initiiert durch die Ausbildung von intermolekularen kovalenten Disulfidbindung oxidierter PML-Monomere sowie auf nicht-kovalenten Wechselwirkungen zwischen den RBCC-Domänen in der PML-Primärstruktur, welche die Bildung von PML-Multimeren vorantreiben, die sodann die äußere Hülle des primären Kernkörpers bilden. Der nächste Schritt beinhaltet die Rekrutierung von UBC9, dem einzigen bisher bekannten SUMO-E2-Konjugationsenzym. Die von UBC9 vermittelte (Poly)SUMOylierung von PML reguliert und verstärkt die PML-PML-Interaktionen über intermolekulare SUMO-interagierende Motive ((SIM)-Interaktionen), die für die Bildung reifer PML-NBs wichtig sind. Darüber hinaus treibt SUMOyliertes PML die multivalente Rekrutierung innerer Partnerproteine durch ihre SIM an, wodurch sogenannte „reife“ PML-NBs gebildet werden.

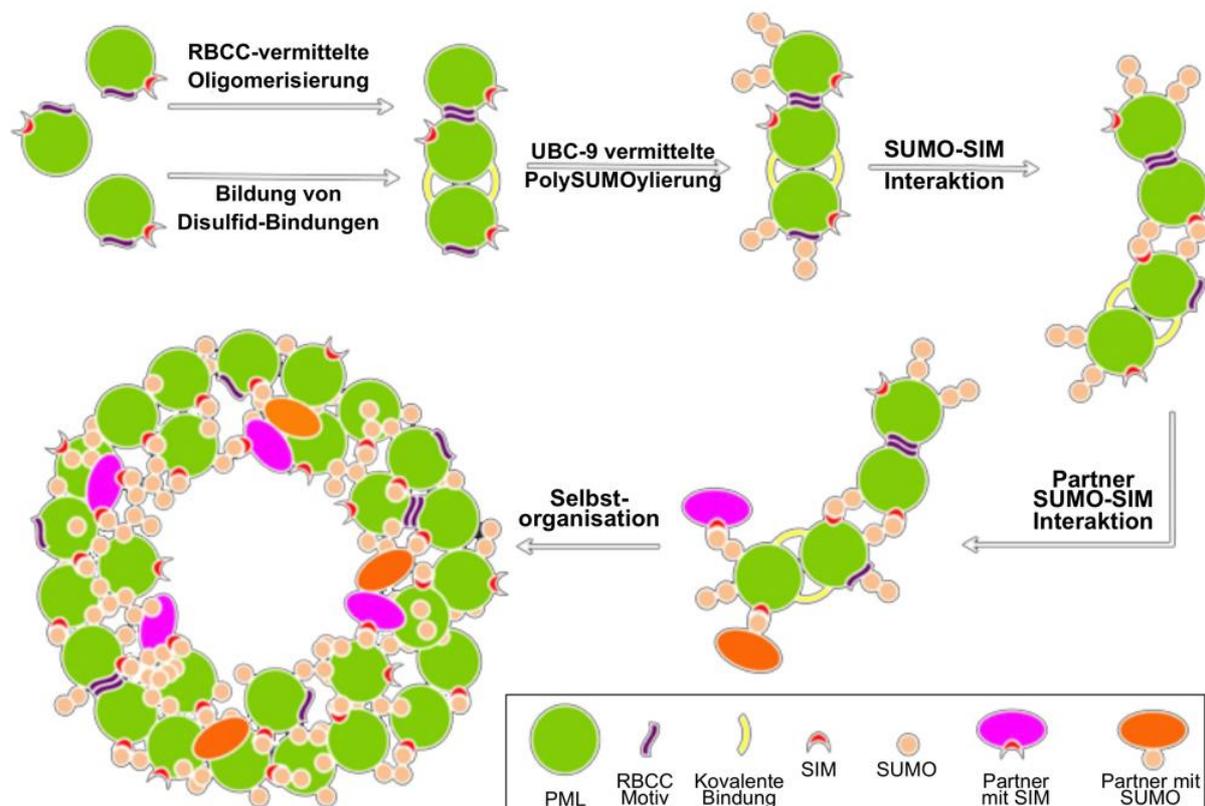


Abb. 6: Schematische Darstellung der PML-NB-Ausbildung. Modifiziert nach (Hoischen et al., 2018)

PML weist zudem eine SUMO E3-Ligase-Aktivität auf ([Chu und Yang, 2011](#); [Guo et al., 2014](#)), durch die nahezu alle Proteine des PML-Interaktoms SUMOyliert werden können. Da PML zudem über sein *SUMO-interacting Motif* (SIM) mit diesen SUMOylierten Proteinen interagiert ([Shen et al., 2006](#)), scheint diese posttranslationale Modifikation auch für die Integrität der PML-NBs notwendig zu sein.

2 Ausgewählte Originalarbeiten

2.1 siRNA-mediated inhibition of skNAC and Smyd1 expression disrupts myofibril organization: Immunofluorescence and electron microscopy study in C2C12 cells

Berkholz J, Eberle R, Boller K, Munz B.

Micron 108: 6-10, 2018

Muskelfasern sind die funktionellen Einheiten der Skelettmuskeln und des Herzens, die als Synzytien durch die Verschmelzung von undifferenzierten Muskelzellen (Myoblasten) zu Myotuben entstehen. Noch ist der molekulare Mechanismus dieser Myoblasten-Verschmelzung (Myogenese) weitgehend unbekannt. Smyd1 ist eine Histon-Methyltransferase, die bekanntermaßen mit dem muskelspezifischen Transkriptionsfaktor skNAC (skeletal and heart muscle-specific variant of the alpha subunit of nascent polypeptide associated complex) bei der Regulation des Sarkomeraufbaus im adulten Skelettmuskel zusammenwirkt. Daher wurde in der vorliegenden Studie die Hypothese untersucht, dass die beiden Proteine an dem Aufbau der Sarkomerarchitektur (Myofibrillogenese) während der Myogenese beteiligt sind.

Zunächst wurde durch den Einsatz spezifischer siRNA die Expression von Smyd1 oder skNAC in undifferenzierten C2C12 Myoblasten unterdrückt. In beiden Fällen differenzierten die Zellen nach Inkubation in einem spezifischen Differenzierungsmedium zu phänotypisch unveränderten Myotuben. In differenzierten Myotuben führte dagegen die Unterdrückung der Smyd1- ebenso wie der skNAC-Expression zu einer intrazellulären Umverteilung von Myosin-heavy-chain (MyHC) und dem Z-Disk-assoziierten Intermediärfilament Desmin. Offensichtlich sind Smyd1 und skNAC vor allem an der Regulation der Ausbildung großer Sarkomerstrukturen in späteren Stadien der Myogenese beteiligt.

Verweis auf Volltext: <https://doi.org/10.1016/j.micron.2018.02.009>

2.2 skNAC and Smyd1 in transcriptional control

Berkholz J, Orgeur M, Stricker S, Munz B.

Exp. Cell Res. 336: 182-191, 2015

Da Smyd1 in Muskelzellen nicht nur mit dem Transkriptionsfaktor skNAC einen Komplex bildet, sondern nachweislich auch eine intrinsische Histon-Methyltransferase (HMT)-Aktivität aufweist und HDACs rekrutieren kann, wurde die Hypothese untersucht, dass die Transkriptionsaktivität von Smyd1 auf diese Chromatin-Remodelling-Prozesse zurückzuführen ist.

Durch cDNA-Mikroarray-Analyse an differenzierten C2C12-Myoblasten, in denen die Expression von Smyd1 bzw. skNAC mittels siRNA unterdrückt worden war, wurde nachgewiesen, dass der Smyd1/skNAC-Transkriptionskomplex die mRNA-Expression der Zielgene Calpain 1 und Serum Response Factor (SRF) beeinflusst, die an Entzündungsreaktionen, Zellstoffwechsel und der Zellmigration beteiligt sind. Nachfolgende Immunblotting- und ELISA-Analysen von Zelllysaten sowie ChIP-Analysen an ausgewählten Promotorregionen belegten, dass diese Kontrolle der Zielgen-Transkription zumindest teilweise durch Histonmethylierung vermittelt wird. Während skNAC das Methylierungsmuster der Histone nicht veränderte, führte die siRNA-vermittelte Hemmung der *Smyd1*-Expression zu einer Reduktion der Zweifach- und Dreifachmethylierung des Lysins 3 im Histon H4 (H4K3me2 und H4K3me3), wobei der Grad der H3K4-Monomethylierung unverändert blieb. Zusätzliche Daten demonstrierten, dass sich die Depletion von *Smyd1* hemmend auf die Gesamt-HDAC-Aktivität in den differenzierten C2C12-Myoblasten auswirkt.

Zusammenfassend belegen die Daten der Studie, dass der skNAC/Smyd1-Komplex sowohl über die Kontrolle der Histonmethylierung als auch der Histon(de)acetylierung an der transkriptionellen Regulation der Genexpression in differenzierten Myoblasten beteiligt ist.

Verweis auf Volltext: <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2015.06.019>

2.3 The methyltransferase Smyd1 mediates LPS-triggered up-regulation of IL-6 in endothelial cells

Shamloul A, Steinemann G, Roos K, Liem CH, Bernd J, Braun T, Zakrzewicz A, Berkholz J.

Cells 10: 3515, 2021

Um die Hypothese zu verifizieren, dass das entzündungsreaktive Smyd1 an der Regulation der IL-6-Expression in Endothelzellen beteiligt ist, untersuchten wir systematisch die Beziehung zwischen LPS, Smyd1 und IL-6 in kultivierten humanen Endothelzellen (HUVECs und EA.hy926-Zellen).

LPS-Stimulation dieser Endothelzellen führte zu einer höheren Smyd1-Expression auf mRNA- und Protein-Ebenen. Wie die molekulare Analyse von EA.hy926-Zellen zeigte, die mit Smyd1-Vektoren oder Smyd1-spezifischen siRNAs transfiziert worden waren, erhöht Smyd1 die LPS-abhängige Expression und Sekretion von IL-6. Weitere molekulare Analysen ergaben, dass dieser Prozess auf die Aktivierung von zwei Signaltransduktionswegen zurückzuführen ist: Smyd1 erhöhte die Aktivität von NF- κ B (einem etablierten Mediator der IL-6-Induktion) und förderte die Trimethylierung des Lysin-4 vom Histon-3 (H3K4me3) innerhalb des IL-6-Promotors, wodurch die IL-6-Expression gesteigert wird, wie durch ChIP-RT-qPCR-Experimente in Kombination mit IL-6-Promotor-getriebenen Luciferase-Reporter-Gen-Assays gezeigt wurde.

Unsere experimentellen Analysen belegen, dass die LPS-Bindung an Endothelzellen zu einer Hochregulation der Smyd1-Expression führt, wodurch vermehrt IL-6 produziert wird. Dieser Prozess wird sowohl über die Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs als auch über Chromatin-Remodelling, namentlich die epigenetische Trimethylierung von H3K4 gesteuert.

Verweis auf Volltext: <https://doi.org/10.3390/cells10123515>

2.4 Stability of Smyd1 in endothelial cells is controlled by PML-dependent SUMOylation upon cytokine stimulation

Becker S, Steinemann G, Karle W, Roos K, Liem CH, Muralikumar S, Volkamer A, Munz B, Zakrzewicz A, Berkholz J.

Biochem. J. 478: 217-234, 2021

Da im Promotorbereich des Smyd1-Gens Interferon-gamma (IFN- γ) regulatorische Sequenzen vorliegen und Smyd1 in vaskulären Endothelzellen exprimiert ist, dient diese Studie der Untersuchung, ob Smyd1 in Endothelzellen bei Entzündungsreaktionen in die IFN- γ -abhängige Signaltransduktion involviert ist.

Smyd1 war in kultivierten humanen Endothelzellen sowohl im Nucleus als auch im Zytoplasma exprimiert, wobei das Protein im Nucleus größtenteils in PML-Kernkörperchen (PML-NBs) lokalisiert war. Durch Transfektion von EA.hy926-Zellen mit Expressionsvektoren, die für Smyd1, PML, SUMO1, die SUMO-Protease SuPr1 (aktive oder mutierte Formen) und/oder das konjugierende E2- Enzyms UBC9 kodieren sowie durch Einsatz von Smyd1- oder PML-spezifischen siRNAs, konnte gezeigt werden, dass Smyd1 in einer PML-abhängigen Weise SUMOyliert und dadurch für den Abbau in Proteasomen adressiert wird. Darüber hinaus führte die Transfektion mit Smyd1-kodierenden Vektoren zu einer Induktion der PML-Transkription bei gleichzeitiger Senkung der Smyd1-Proteinstabilität. Die Inkubation von EA.hy926-Zellen mit dem proinflammatorischen Zytokin TNF- α führte zu einem kontinuierlichen Anstieg der Smyd1-mRNA und des Proteins über 24 Stunden, während die Inkubation mit IFN- γ einen vorübergehenden Anstieg der Smyd1-Expression induzierte, der nach 6 Stunden seinen Höhepunkt erreichte und dann wieder abfiel. Der IFN- γ -induzierte Anstieg von Smyd1 wurde von mehr Smyd1-SUMOylierung und dem Zusammenbau von mehr/größeren PML-NBs begleitet.

Unsere Daten belegen, dass die Smyd1-Expression in Endothelzellen über einen negativen Rückkopplungsmechanismus reguliert wird, der auf SUMOylierung und PML-Verfügbarkeit basiert. Dieser molekulare Mechanismus wird offensichtlich durch Zytokine differentiell beeinflusst.

Verweis auf Volltext: <https://doi.org/10.1042/BCJ20200603>

2.5 Promyelocytic leukemia protein promotes the phenotypic switch of smooth muscle cells in atherosclerotic plaques of human coronary arteries

Karle W, Becker S, Stenzel P, Knosalla C, Siegel G, Baum O, Zakrzewicz A, Berkholz J.

Clin. Sci. (Lond) 35: 887-905, 2021

Da PML sowohl in Entzündungsprozesse involviert ist, als auch Einfluss auf posttranslationale SUMOylierungsreaktionen hat, wurde in der vorliegenden Arbeit die Hypothese untersucht, dass PML eine bisher unbekannte Funktion in der Pathophysiologie der Atherosklerose spielt. Zunächst konnte eine stark erhöhte Konzentration von PML in humanen atherosklerotischen Koronararterien im Vergleich zu nicht-atherosklerotischen Koronararterien nachgewiesen werden. alpha-Actin-2-immunreaktive Zellen im Plaque-Bereich wiesen dabei die höchsten Konzentrationen an PML auf. Nach Transfektion mit dem intakten PML-Gen zeigten sich in differenzierten humanen koronararteriellen glatten Muskelzellen (dHCASMCs) höhere Konzentrationen an SUMOylierten Proteinen, jedoch geringere Konzentrationen an Differenzierungsmarkern für glatte Muskelzellen. Zudem wiesen diese PML-transfizierten Zellen höhere Proliferationsraten und Migrationsaktivitäten auf als Kontroll-dHCASMCs. Dieser Einfluss war nicht nach Transfektion einer SUMOylierungsdefekten-PML-Form nachweisbar. Nach Inkubation der dHCASMCs mit verschiedenen Zytokinen wurden nur nach IFN- γ -Stimulation höhere PML-Konzentrationen beobachtet, während gleichzeitig die Expression von Differenzierungsmarkern abnahm. Diese Veränderungen im Phänotyp wurden jedoch nicht nach Behandlung der dHCASMCs mit PML-siRNA beobachtet. Zusammenfassend deuten unsere Ergebnisse darauf hin, dass PML ein bisher unbekannter Faktor in der molekularen Differenzierungskaskade von vaskulären glatten Muskelzellen ist, der mit der Pathophysiologie der Atherosklerose verbunden ist. Dabei scheint es zwischen der IFN- γ -Aktivierung und nachfolgenden SUMOylierungsprozessen positioniert zu sein.

Verweis auf Volltext: <https://doi.org/10.1042/CS20201399>

3. Diskussion

In der vorliegenden Habilitationsschrift wurden fünf Publikationen zusammengeführt, die in ihrer Gesamtheit zeigen, dass Smyd1 in Wechselwirkung mit PML einen Einfluss auf die Transkriptionsraten ausgewählter Gene in verschiedenen Zelltypen hat. Da die experimentellen Daten belegen, dass dieser Einfluss u.a. über Histon-Methylierungen abläuft, kann die Smyd1-PML-Achse als ein neues molekulares Modul innerhalb des Chromatin-Remodellings interpretiert werden. Zellphysiologische und möglicherweise medizinisch-klinische Bezüge ergeben sich darüber hinaus aus der differentiellen Beeinflussung der Smyd1-PML-Achse durch Entzündungsmediatoren bzw. inflammatorische Zytokine. Im Folgenden sollen die Befunde zusammengefasst und diskutiert werden.

3.1 Smyd1 als Kofaktor der Transkription während der Differenzierung von Myoblasten

In der Publikation 1 wird beschrieben, dass Smyd1 und das Muskel-spezifische skNAC (*skeletal and heart muscle-specific variant of nascent polypeptide-associated complex*) synchron die Myofibrillogenese in kultivierten Myozyten beeinflussen. In Publikation 2 wird darüber hinaus dargestellt, dass Smyd1 und skNAC die mRNA-Expression von einer Reihe von Genen in differenzierenden Myoblasten gleichgerichtet modulieren.

Obwohl zu Studienbeginn bereits im Zebrafischmodell nachgewiesen worden war, dass Smyd1 einen Einfluss auf den korrekten Zusammenbau von Myofibrillen ausübt ([Tan et al., 2006](#); [Just et al., 2011](#); [Li et al., 2013](#)) und in der quergestreiften Muskulatur mit skNAC interagieren kann ([Sims et al., 2002](#)), war noch unbekannt, ob bzw. wie der Einfluss auf die Myofibrillogenese und die Ko-Expression mit skNAC funktionell zusammenhängen.

Unter Myofibrillogenese wird der komplexe Prozess verstanden, in dem Fibrillen aus Aktin, Myosin und weiteren monomeren Proteinen im Herz und in Skelettmuskeln zusammengesetzt werden ([Sanger et al., 2017](#)). An diesem Prozess sind zahlreiche Enzyme beteiligt, die den Aufbau der Tertiär- und Quartärstruktur der Sarkomere und Fibrillen bewirken, aber auch solche, die zum Abbau falschgefalteter Proteine beitragen ([Kim et al., 2008](#); [Willis et al., 2009](#)). Zu den Enzymen dieses ‚Qualitätskontrollsystems der sarkomeren Proteine‘ werden die Gruppe der Chaperone und die

Faktoren des Ubiquitin-Proteasom-Systems gezählt (Sanger *et al.*, 2005; Sanger *et al.*, 2017).

In kultivierten Muskelzellen interagiert Smyd1 über seine MYND-Domäne mit dem Carboxy-terminalen PXLXP-Motiv von skNAC (Sims *et al.*, 2002), das eine muskelspezifische Spleissvariante des α NAC (*Nascent Polypeptide-associated Complex subunit alpha*) darstellt (Yotov und St-Arnaud, 1996). α NAC-Proteine bilden wiederum Untereinheiten des *Nascent Polypeptide-Associated complex* (NAC), der als Protein-Chaperon an der Überprüfung der korrekten Faltung von neusynthetisierten Proteinen beteiligt ist (Wiedmann *et al.*, 1994; Rospert *et al.*, 2002). Für skNAC fehlt allerdings bislang der Beweis dafür, dass es in ein Muskel-spezifisches NAC-Aggregat eingebaut wird und daher in diesem Gewebe eine Chaperon-Funktion aufweist.

Die Primärstruktur des skNAC weist eine DNA-Bindungs-Konsensussequenz auf, mit der es an die Promotorsequenz des Myoglobingens binden kann (Yotov und St-Arnaud, 1996). Hieraus leitete sich die Hypothese ab, dass es sich bei skNAC um einen Muskel-spezifischen Transkriptionsfaktor bzw. Ko-Transkriptionsfaktor handelt, wie es bereits für α NAC in anderen Zellen gezeigt wurde (Yotov *et al.*, 1998; Yoshida *et al.*, 2005).

Während der Differenzierung von kultivierten Myoblasten weisen Smyd1 und skNAC ein ähnliches Expressionsmuster auf: in undifferenzierten Myoblasten sind beide Proteine nicht nachweisbar, während sie in differenzierten Myozyten gleichzeitig exprimiert werden (Gottlieb *et al.*, 2002). Zudem durchlaufen beide Proteine im Verlauf der Differenzierung eine Nucleus-zu-Zytosol Translokation: während skNAC und Smyd1 24 Stunden nach Induktion der Myoblasten-Differenzierung sowohl im Nucleus als auch im Zytoplasma detektiert werden, befinden sich beide Proteine nach 96 Stunden in Differenzierungsmedium fast ausschließlich im Zytoplasma (Gottlieb *et al.*, 2002). Die Rolle dieser Translokation von Smyd1 (und skNAC) vom Nucleus ins Zytoplasma bleibt näher zu charakterisieren, doch deutet die synchrone Lokalisation der beiden Proteine während der Myoblastenentwicklung darauf hin, dass Smyd1 und skNAC funktionell miteinander interagieren.

In Publikation 2 wird gezeigt, dass sowohl Smyd1 als auch skNAC die mRNA-Expression eines gemeinsamen Spektrums an Genen in Muskelzellen beeinflussen, welche vor allem mit Funktionen bei Entzündungsreaktionen (z.B. SRF), des Stoffwechsels (z.B. PPAR1 γ), der Zellmigration (z.B. RasGRF2) sowie der Myofibrillogenese (z.B. die Cysteinproteasen Calpain 1 und 3) assoziiert sind. Da sich

das Histonmethylierungsmuster im Bereich einiger untersuchter Promotoren nach Transfektion der differenzierten Myozyten mit dem Smyd1-Gen deutlich änderte, haben wir geschlossen, dass die Histonmethyltransferase- (HMT)-Aktivität von Smyd1 an der Regulation der Expression dieser Gene beteiligt ist.

Die beiden Publikationen 1 und 2 implizieren, dass Smyd1 als Kofaktor der Transkription mit skNAC während der Differenzierung von Myoblasten interagiert. Diese Funktion soll hier als Modul 1 bezeichnet werden. Der genaue molekulare Mechanismus, wie Smyd1 und skNAC die Transkriptionsraten ihrer Zielgene kooperativ beeinflussen könnten, ist noch nicht aufgeklärt. Prinzipiell gibt es dafür mehrere Möglichkeiten: Smyd1 erhöht die DNA-Bindungsaktivität von skNAC entweder 1. direkt durch eine skNAC-Konformationsänderung, die durch die Wechselwirkung zwischen den beiden Proteinen ausgelöst wird oder 2. indirekt durch die Erhöhung der skNAC-Zugänglichkeit zum Promotor durch die Smyd1-intrinsische HMT-Aktivität. 3. Alternativ wäre es auch möglich, dass die Zugänglichkeit von Smyd1 zu den Promotoren durch die Interaktion mit skNAC erhöht wird, so dass die HMT-Aktivität stärker zum Tragen kommt. Durch die Analyse von differenzierten Myozyten, die mit Domänen-mutierten Smyd1 und skNAC-Genvarianten transfiziert werden, ließe sich der entsprechende Mechanismus charakterisieren bzw. möglicherweise identifizieren.

Smyd1 scheint zudem auch mit anderen Transkriptionsfaktoren interagieren zu können. So formt Smyd1 in 293T-Zellen mit dem Serum-Response-Faktor (SRF) einen Komplex, durch den die DNA-Bindungsaktivität von Smyd1 erhöht wird (Ye *et al.*, 2016). Im Muskel sind allerdings bislang keine weiteren Transkriptionsfaktoren identifiziert worden, die in biochemischem Bezug zu Smyd1 stehen.

3.2 Smyd1 als Histonmethyltransferase

Ausgehend von der Beobachtung, dass Smyd1 u.a. über seine HMT-Aktivität die Transkriptionsraten ausgewählter Gene in differenzierenden Myoblasten beeinflusst (Publikation 2), wollten wir nachfolgend den Einfluss der HMT-Aktivität von Smyd1 auf die Transkription auch in anderen Zellsystemen erforschen. Diese Analyse haben wir zunächst an kultivierten humanen Endothelzellen durchgeführt, in denen signifikante Mengen an Smyd1 exprimiert werden (Ye *et al.*, 2016; Becker *et al.*, 2021).

Endothelzellen kleiden als einschichtiges Blatt das Lumen aller Lymph- und Blutgefäße aus und sind maßgeblich an der Regulation von Gefäßtonus, Hämostase

und Fibrinolyse, Gefäßpermeabilität sowie Angiogenese beteiligt (Grandel und Grimminger, 2003; Pober und Sessa, 2007). Dadurch dass Endothelzellen auch die Rekrutierung von Abwehrzellen aus dem Blut koordinieren und dabei sowohl Zytokine als auch Komplement-regulatorische Proteine sezernieren, spielen sie darüber hinaus eine Schlüsselrolle bei Entzündungsprozessen. Entsprechend sind Funktionsverluste des Endothels potenziell lebensbedrohlich, die bei bestimmten chronischen Erkrankungen wie bei Arteriosklerose, aber auch akut, wie generalisiert im Rahmen einer Sepsis oder lokal bei einem Ischämie-Reperfusionssyndrom (Trepels *et al.*, 2006; Hattori *et al.*, 2010) auftreten können.

In der Publikation 3 werden experimentelle Daten gezeigt, die belegen, dass kultivierte humane Endothelzellen nach Exposition mit Lipopolysacchariden (LPS) vermehrt Symbd1 exprimieren, wodurch diese Zellen in der Folge mehr Interleukin-6 (IL-6) produzieren und sezernieren. Die molekulare Analyse wies nach, dass Symbd1 dabei auf zweifache Weise die LPS-induzierte Signalkaskade beeinflusst: sowohl direkt über die Modulierung der Lysin 4-Trimethylierung des Histons 3 (H3K4me3) im Bereich des IL-6 Promotors als auch indirekt über die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B ohne H3K4me3-Beteiligung. Diese Funktion soll in dieser Schrift als Funktionsmodul 2 bezeichnet werden (Abb. 7).

Der Einfluss von Symbd1 auf immunologische Reaktionen in Endothelzellen wurde mittels eines Reporter-gen-Assays untersucht, bei dem die Expression des IL-6-Gens nach Stimulation mit LPS in einem Zellkultursystem gemessen wurde. LPS sind integrale Bestandteile der äußeren Zellwand überwiegend gramnegativer Bakterien, die während des Wachstums von Bakterienkulturen oder als Folge einer bakteriellen Zellyse als Endotoxine freigesetzt werden (Raetz und Whitfield, 2002). Wenn der Blutkreislauf großen Mengen an LPS ausgesetzt ist, kann eine überaktive Entzündungsreaktion ausgelöst werden (Kumar *et al.*, 2009). Hierbei interagieren LPS auch mit den Endothelzellen der Blutgefäße und stimulieren so die Sekretion verschiedener Entzündungsfaktoren wie Tumor-Nekrose-Faktor alpha (TNF α) und IL-6 (Bozza *et al.*, 2007) aus dem Endothel. LPS gelten daher als einer der wichtigsten Entzündungsstimuli, die eine Schädigung der Endothelzellen mit anschließender Sepsis verursachen können (Dauphinee und Karsan, 2006; Khakpour *et al.*, 2015).

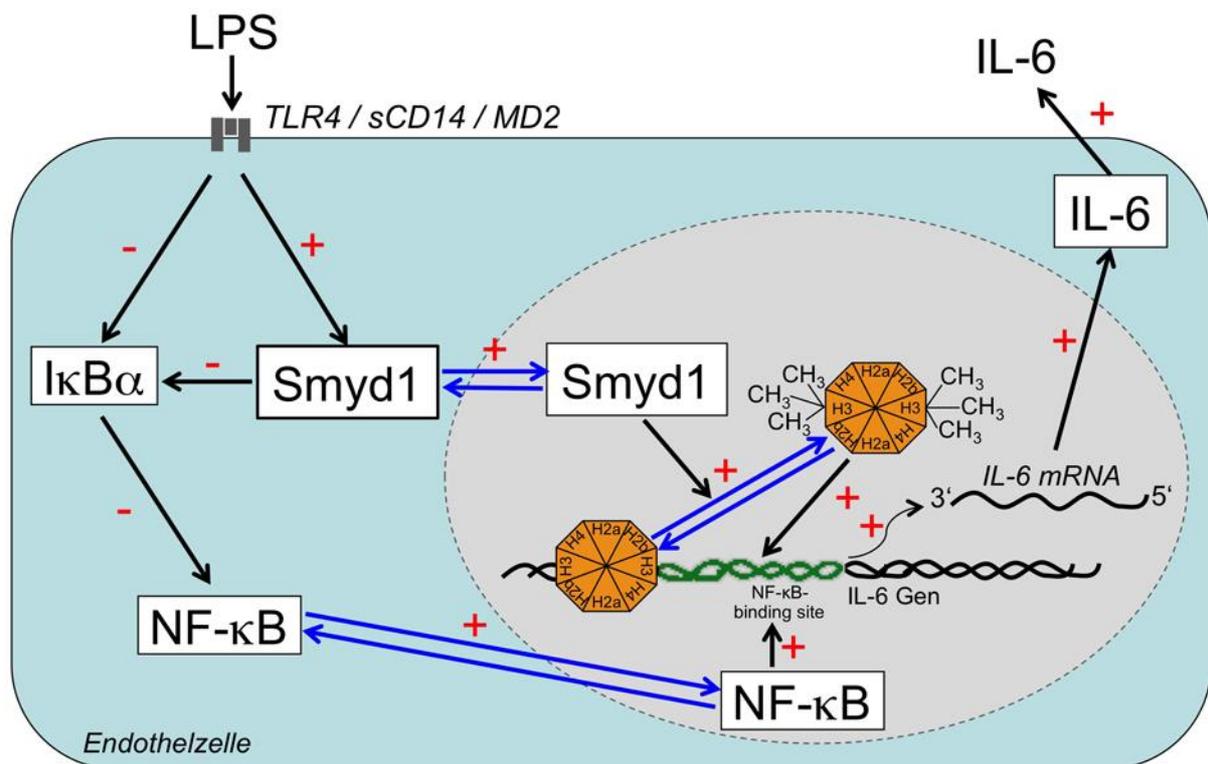


Abb. 7: Die Induktion von Smyd1 führt in ECs auf zwei Wegen zur Aktivierung der Transkription von IL-6: 1. Mehr Smyd1-Präsenz im Zytoplasma verursacht eine häufigere Translokation von Smyd1-Molekülen in den Nucleus. Die Anreicherung der Methyltransferase Smyd1 im Nucleus führt dann zur Trimethylierung von Lysin 4 in Histon 3 (H3K4me3) innerhalb des IL-6-Promotors. Diese posttranslationale Modifikation bedingt eine bessere Zugänglichkeit des Promotors für den RNA-Polymerase-Transkriptionskomplex, so dass die IL-6-Transkriptionsrate steigt. 2. Mehr Smyd1-Präsenz im Zytoplasma, begleitet vom IκBα-Abbau, beschleunigt durch gesteigerten Transport von NF-κB in den Nucleus die IL-6-Transkription sowie die anschließende Translation und Sekretion des IL-6-Proteins, was zu einer höheren IL-6-Bioverfügbarkeit führt. Schwarze Pfeile zeigen die Hochregulierung oder den Abbau an, während blaue Pfeile für den intrazellulären Transport stehen. Erstellt von Autorin.

Dass der Transkriptionsfaktor NF-κB an der Induktion und Sekretion von IL-6 nach LPS-Stimulation von Endothelzellen beteiligt ist, war bereits bei Projektbeginn bekannt (Dauphinee und Karsan, 2006). In einem frühen Aktivierungsprozess induziert die LPS-Bindung an einen integralen Rezeptorkomplex aus Toll-like Rezeptor (TLR) 4, löslichem CD14 und MD2 die Rekrutierung weiterer Adaptermoleküle (TIRAP, IRAK1 und IRAK4), die dann den intrazellulären IKK-Komplex bestehend aus drei Untereinheiten aktivieren, durch den die Mitglieder der NF-κB Inhibitoren (IκB)-Genfamilie abgebaut werden (Chen *et al.*, 1995; Palsson-McDermott und O'Neill, 2004). Fehlen intakte IκB-Proteine z.B. aufgrund von Degradation, wird NF-κB in den Nucleus verlagert und dort angereichert (Brown *et al.*, 1993). Als Ergebnis ist die

transkriptionelle Aktivität von NF- κ B verstärkt, und hohe mRNA-Spiegel von entzündungsfördernden Mediatoren wie IL-6 werden produziert.

Da in unseren Versuchen die I κ B α -Konzentration nach Smyd1-Transfektion reduziert war, wodurch es zu einer Anreicherung von NF- κ B im Nucleus der Endothelzellen kam, haben wir geschlossen, dass der Smyd1-Effekt auf die IL-6 Expression mindestens zum Teil über das NF- κ B-System realisiert wird. Diese Interpretation wird durch die Beobachtung unterstützt, dass etablierte pharmakologische NF- κ B-Inhibitoren die induzierende Wirkung von Smyd1 auf die IL-6 Transkription teilweise hemmten. Ein NF- κ B-abhängiger Mechanismus wurde bereits zuvor für Smyd5 als Teil der LPS-Signalkaskade in Makrophagen identifiziert (Stender *et al.*, 2012). Der molekulare Mechanismus bzw. der genaue Angriffspunkt für den gezeigten Einfluss von Smyd1 auf I κ B α ist jedoch nach wie vor unklar.

Auf der anderen Seite belegten die Experimente mit den NF- κ B-Inhibitoren, bei deren Einsatz die Wirkung von Smyd1 auf die IL-6-Expression nicht vollständig aufgehoben war, dass es noch einen zusätzlichen molekularen Mechanismus in Endothelzellen ohne NF- κ B-Beteiligung geben muss. Mit einer Deletionsmutante von Smyd1, die eine inaktive SET-Domäne exprimiert, konnte in Transfektionsversuchen gezeigt werden, dass Smyd1 die IL-6-Produktion durch Histon-Methylierung im Bereich des IL-6-Promotors in Endothelzellen direkt beeinflusst. Dabei zeigten u.a. ChIP-Analysen mehr H3K4-Trimethylierungsereignisse innerhalb der Promotorregion des IL-6-Gens in Smyd1-überexprimierenden EA.hy926-Zellen als in Zellen, die mit einem HMT-inaktiven Smyd1-Gen transfiziert worden waren.

Der wissenschaftlichen Literatur lässt sich entnehmen, dass einzelne Schritte des hier beschriebenen molekularen Mechanismus zur Smyd1-abhängigen Geninduktion von IL-6 in Endothelzellen etabliert sind. Grundsätzlich wurden Histonmodifikationen durch Smyd1 im Zebrafisch und in der Maus bereits nachgewiesen, wobei in den ersten Studien nicht zwischen Mono-, Di- und Trimethylierung unterschieden wurde (Tan *et al.*, 2006; Sirinupong *et al.*, 2010). Später verdichteten sich die Hinweise, dass Smyd1 vor allem eine H3K4-spezifische Trimethylierungsaktivität aufweist (Warren *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2021). Auch für Smyd3, einem weiteren Mitglied der Smyd-Genfamilie, ist eine H3K4-spezifische Di- und Trimethylierungsaktivität aufgezeigt worden (Hamamoto *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2009a). Interessanterweise gibt es Berichte, die besagen, dass die Ablesehäufigkeit des IL-6 Gens in verschiedenen Zelllinien auch über Histonmethylierung reguliert wird (Dandrea *et al.*, 2009; Xu *et al.*,

2015; Yang *et al.*, 2017). Es ist außerdem beschrieben worden, dass Smyd2 die IL-6 Transkription in Makrophagen epigenetisch mittels Histonacetylierung (Hu *et al.*, 2016) und H3K36-Dimethylierung (Xu *et al.*, 2015) im Bereich des IL-6-Promotors reguliert. Wie die HMT-Aktivität von Smyd1 reguliert wird, muss dagegen noch untersucht werden.

Dass LPS-Stimulation und Histonmethylierung zusammenhängen können, ist ebenfalls bereits etabliert: in zwei In-vitro-Modellen – einem Parodontalligament-Modell (Francis *et al.*, 2020) und einem Makrophagen-Modell (Xu *et al.*, 2015) – zeigte sich, dass LPS die H3K4me3-Histonmethylierung im IL-6 Promotorbereich bei gleichzeitiger Bindung des NF- κ B-Transkriptionsfaktors RelA erhöht.

Diese Liste an bereits bekannten Reaktionen suggeriert, dass der biologische Zusammenhang zwischen LPS-Smyd1-H3K4me3-IL6-Transkription, den wir in Publikation 3 diskutiert haben, schlüssig ist. Dennoch sind noch einige zentrale Fragen in dieser vorgeschlagenen Signalkette nicht ausreichend beantwortet. So ist z.B. noch offen, welcher molekulare Mechanismus dazu führt, dass Histone mit der K4me3-Modifikation im Histonprotein H3 die Erhöhung der IL-6 Transkriptionsrate bedingen. Hierbei könnte eine lokale Freilegung der Promotorregion eine Rolle spielen, wodurch die RNA-Polymerase II oder gemäss der Histoncode-Hypothese andere aktivierende Proteine wie z.B. Methyl-CpG-bindende Proteine vermehrt an diesen DNA-Bereich andocken (Lee *et al.*, 2020).

3.3 Smyd1 steuert als Regulator und Interaktionspartner von PML und PML-NBs über SUMOylierungsreaktionen seinen eigenen Abbau

In der Publikation 4 wird beschrieben, dass eine graduelle Erhöhung der Smyd1-Konzentration in Endothelzellen (die wir mittels Gentransfektion induziert haben) zu einer Zunahme der Expression von PML/PML-NBs führte, wodurch auch Smyd1 SUMOyliert – genauer: durch kovalente Bindung von SUMO1 modifiziert - wurde. Es zeigte sich, dass Smyd1 aufgrund dieser posttranslationalen Modifikation vermehrt ins Zytoplasma transportiert, und dort abgebaut wurde. Durch diese negative Rückkopplung kann Smyd1 mittels PML-abhängiger SUMOylierung die eigene Konzentration in Endothelzellen beeinflussen. Diese Funktion soll in der vorliegenden Schrift als Modul 3 bezeichnet werden (Abb. 8).

Unter Verwendung von mutierten Gensequenzen konnten wir in weiteren Transfektionsversuchen die molekularen Grundlagen dieses Reaktionsablaufs

charakterisieren. Der Prozess beginnt damit, dass aktiviertes Smyd1 die Transkription mehrerer zellulärer Gene einschließlich des PML-Gens induziert. Nach der Translation seiner mRNA wird PML in den Nucleus geschleust und dort SUMOyliert, wo es dann vermutlich als Schlüsselorganisor den Zusammenbau der PML-Kernkörperchen (PML-NB) steuert, so wie es in anderen Zelltypen beobachtet worden ist (Ishov *et al.*, 1999).

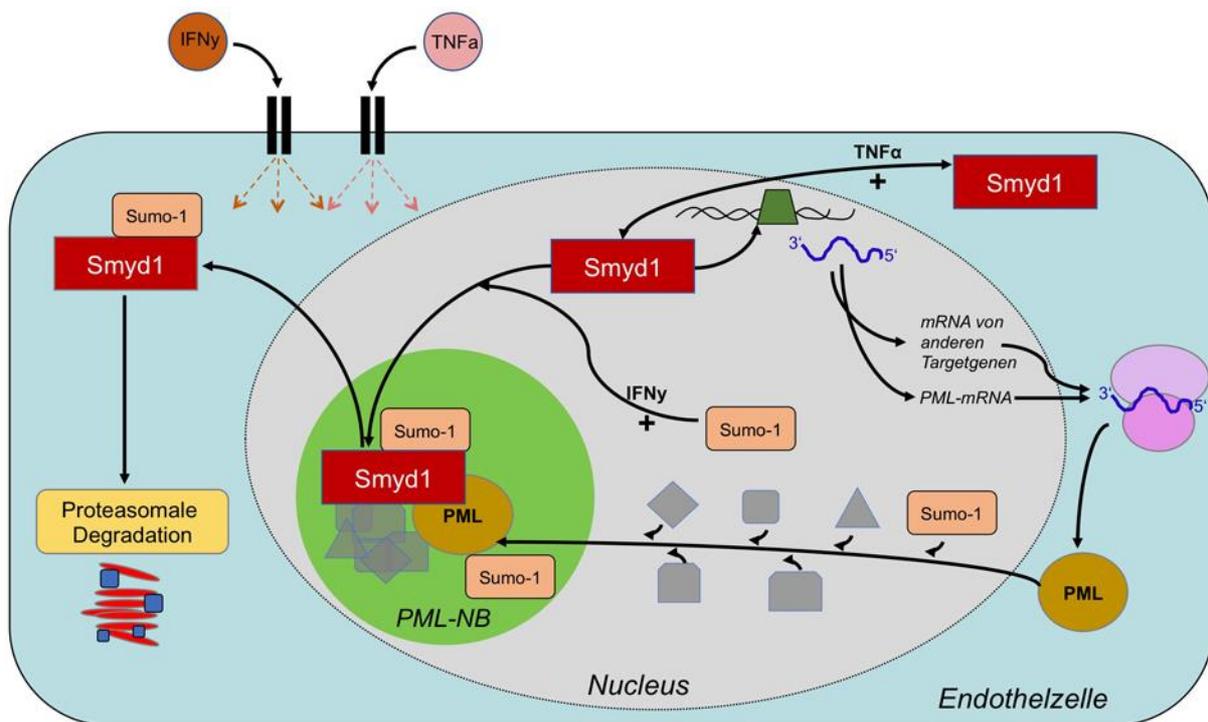


Abb. 8: Schematische Darstellung der Reaktionen, durch die Smyd1 im Wechselspiel mit PML mittels SUMOylierung seine eigene Stabilität in Endothelzellen beeinflusst. Der molekulare Feedbackmechanismus ist im Text detailliert beschrieben. Erstellt von Autorin.

In der Tat haben wir eine höhere Anzahl von PML-NBs in Smyd1-transfizierten als in Kontroll-Endothelzellen beobachtet. Diese Beobachtung lässt darauf schließen, dass die Zunahme der PML-Transkription zu einer Zunahme der PML-Translation und anschließenden PML-Translokation vom Zytoplasma in den Nucleus der Endothelzellen geführt hat, so dass es zu einer Anreicherung von PML in diesem Kompartiment gekommen ist. Offenbar führte eine höhere Konzentration von PML im Nucleus zu einer Zunahme der PML-SUMOylierung sowie zu einer Verstärkung des PML-NB Zusammenbaus.

Da PML-NBs auch als biochemische „Fabriken“ für SUMOylierungsaktivitäten wirken, ist zu vermuten, dass die vermehrte Anzahl von PML-NBs zu der Erhöhung der Smyd1-SUMOylierungsraten in den Smyd1-transfizierten Endothelzellen beigetragen haben. Dass die SUMOylierungsraten von Smyd1 in Abhängigkeit von der PML-NB

Verfügbarkeit variieren können, war bereits in Myozyten nachgewiesen worden ([Berkholz et al., 2014](#)).

Der molekulare Mechanismus der SUMOylierung von Smyd1 ist bislang noch nicht beschrieben worden, dürfte aber ähnlich wie bei anderen Proteinen verlaufen. Es ist bekannt ([Johnson, 2004](#)), dass die SUMOylierung (ebenso wie die Ubiquitylierung) durch eine Kaskade von drei Enzymsystemen katalysiert wird: E1-Enzyme (*SUMO-activating enzyme*), E2-Enzyme (*SUMO-conjugating enzyme*) und E3-Enzyme (*SUMO-Ligase*). Zunächst aktiviert ein E1-Enzym (z.B. SAE1-SAE2) ATP-abhängig das frei vorliegende 12 kDa grosse SUMO-Protein. Hierdurch kann das SUMO-Protein an ein E2-Enzym (z.B. Ubc9) gebunden werden, um dann durch die Katalyse des E3-Enzyms SUMO-Ligase (z.B. RanBP2) auf das Lysin innerhalb des Erkennungsmotivs der Substratproteine übertragen zu werden ([Hay, 2005](#)). Interessanterweise können die SUMO-Proteine nach proteolytischer Freisetzung durch SENPs (Sentrin-spezifische Proteasen, katalysieren die DeSUMOylierung) wiederverwendet werden ([Hay, 2005](#)).

In Säugetierzellen finden sich bis zu fünf SUMO-Paraloge (SUMO1–SUMO5), wobei SUMO1–SUMO3 ubiquitär exprimiert werden ([Pichler et al., 2017](#)). Während die Primärstrukturen von SUMO2 und SUMO3 nahezu identisch sind, weisen SUMO1 und SUMO2/3 weniger als 50% Sequenzidentität auf. Unter physiologischen Bedingungen wird SUMO1 konstitutiv an seine Substratproteine konjugiert, während die anderen SUMO-Paraloge bevorzugt als Reaktion auf Stress konjugiert werden ([Saitoh und Hinchey, 2000](#)).

Ohne dass wir in den Transfektionsversuchen eine Beschleunigung der Smyd1-Transportrate ins Zytoplasma gemessen haben, wurde SUMOyliertes Smyd1 vermehrt in Proteasomen der Endothelzellen (im Vergleich zu einer SUMOylierungs-inaktiven Smyd1-Variante) abgebaut. Interessanterweise wurde in differenzierenden Myoblasten das entgegengesetzte Reaktionsschema beobachtet ([Berkholz et al., 2014](#)): SUMOyliertes Smyd1 wurde in diesen Zellen vermehrt aus dem Nucleus in das Zytoplasma transportiert, aber nicht schneller proteasomal abgebaut. Die molekulare Grundlage für den divergenten Einfluss der SUMOylierung auf diesen Translokations/Degradations-Prozess von Smyd1 in den beiden Zelltypen ist nicht bekannt.

In vielen Zellen werden Proteine durch eine SUMOylierung vor dem proteasomalen Abbau geschützt ([Wilson, 2017](#)). Allerdings gibt es auch andere Beispiele dafür, dass

Proteindegradation durch SUMOylierung z.B. über Querverbindungen zum Ubiquitin-abhängigen Signalweg beschleunigt wird (Sriramachandran und Dohmen, 2014; Chang *et al.*, 2021). Dabei führt die SUMOylierung von Proteinen zur Aktivierung von SUMO-targeted Ubiquitin-Ligasen (STUbL), die die Proteine mit Ubiquitin zur nachfolgenden proteosomalen Degradation markieren (Prudden *et al.*, 2007). Ein wichtiges Beispiel für diese Wechselwirkung zwischen der SUMOylierung und der Ubiquitinylierung ist die Kontrolle der Stabilität vom Hypoxie-induzierten Faktor-1 α (HIF-1 α), dem Modulator der zellulären Antwort auf Hypoxie (Cheng *et al.*, 2007). Hypoxie induziert dabei die SUMOylierung von HIF-1 α mit SUMO1, was dessen Bindung an eine Ubiquitin-Ligase fördert, wodurch HIF-1 α ubiquitiniert, und in der Folge abgebaut wird (Cheng *et al.*, 2007). Ein weiteres Beispiel ist die Aktivierung der SUMO-abhängigen-Ubiquitin-Ligase RNF4 (RING Finger Protein 4) (Galanty *et al.*, 2012), die am proteosomalen Abbau von SUMOylierten Proteinen beteiligt ist, einschließlich des Abbaus von Proteinen, die zuvor von PML als fehlgefaltet erkannt und, katalysiert durch die E3-Ligase-Aktivität von PML, mit SUMO markiert wurden (Guo *et al.*, 2014).

In dem Projekt hat sich auch gezeigt, dass die Verfügbarkeit/Aktivierung von Smyd1 (und davon abhängig von PML) in der untersuchten Endothelzelllinie durch mehrere Zytokine verändert werden kann, indem unterschiedliche Schritte in diesem Reaktionsablauf moduliert werden: IFN γ erhöhte die SUMOylierungsrate von Smyd1, während TNF α den subzellulären Transport von Smyd1 vom Nucleus zum Zytoplasma beschleunigte. Diese Befunde könnten ein Hinweis darauf sein, dass Entzündungen über die Modulation des Wechselspiels von Smyd1 und PML in Endothelzellen beeinflusst werden.

Welche Konsequenz könnte der molekulare Feedbackmechanismus zur Begrenzung der Smyd1-Konzentration in Endothelzellen haben? Offenbar ist es von biologischer Relevanz, dass die Smyd1-Konzentration im Rahmen des „steady state“ des offenen Systems „lebende Zelle“ begrenzt ist, insbesondere weil Smyd1 als intrazelluläres Signalprotein an der Regulation grundlegender, zellulärer Prozesse beteiligt ist (z.B. entweder aufgrund der Wechselwirkung mit anderen Proteinen, über den Einfluss als HMT auf die Transkription verschiedener Gene oder/und als Stellgröße in der SUMOylierungsmaschinerie und dem PML-NB Stoffwechsel).

Trotz der ausführlichen Charakterisierung des negativen Feedbackmechanismus zur Begrenzung der Smyd1-Konzentration in Endothelzellen sind noch einige Fragen

innerhalb des Smyd1-PML-Moduls offen. So ist beispielsweise in diesem Zellmodell nicht untersucht worden, 1. wie die Transkription von PML nach Transfektion mit dem Smyd1-Gen induziert wurde – im Speziellen, ob dabei die HMTase Aktivität von Smyd1 eine Rolle spielt, 2. wie die SUMOylierung die proteasomale Degradation von Smyd1 beschleunigt und 3. ob neben SUMO1 auch SUMO2 oder SUMO3 beteiligt sind. 4. Auch erscheint es möglich, dass Smyd1 in den Endothelzellen über den Feedback-Mechanismus nicht nur die eigene Halbwertszeit kontrolliert, sondern auch indirekt andere physiologische Prozesse zu steuern vermag (z.B. die differentielle Regulierung der Blutgefäßreaktionen auf verschiedene Entzündungsreize hin).

Obwohl gezeigt wurde, dass Smyd1, PML und das SUMOylierungsmuster in diesem Zellmodell strukturell zusammenhängen, wurde in der Studie zur Publikation 4 nicht untersucht, ob PML-abhängige Veränderungen im SUMOylierungsmuster auch zu einer funktionellen Anpassung führen. Ein prägnantes Beispiel, wie eine zellphysiologische Funktion durch PML-bezogene SUMOylierung beeinflusst wird, ist in der Publikation 5 beschrieben (Abb. 9).

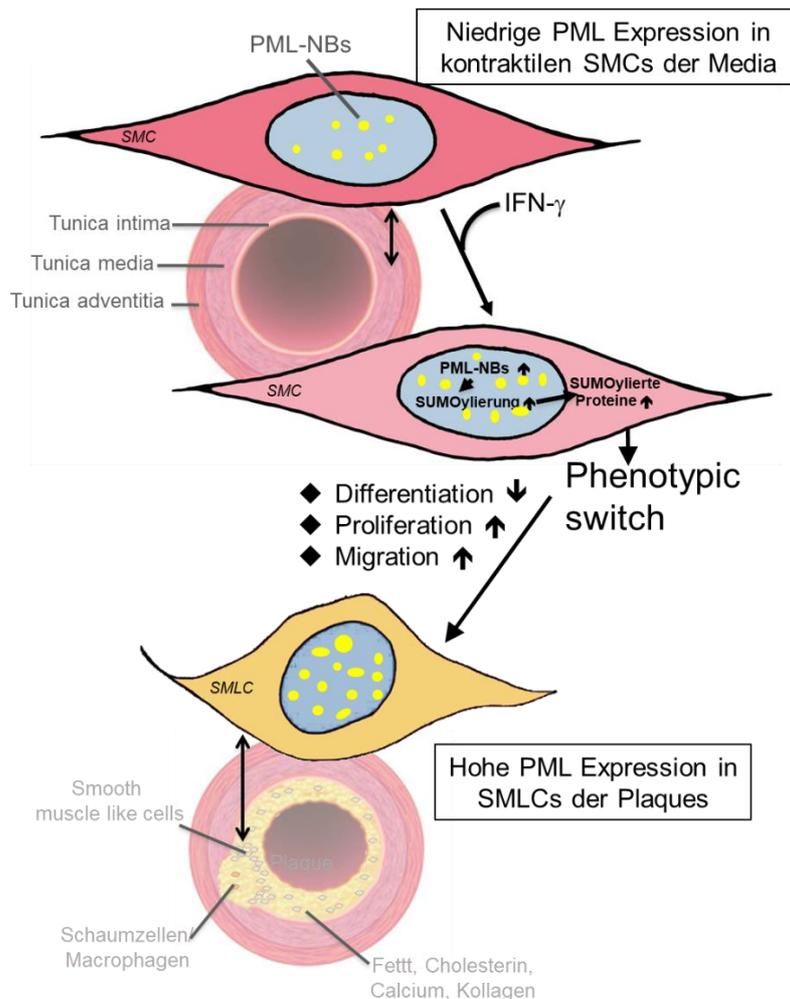


Abb. 9: Schematische Darstellung des Einflusses von PML auf den Phänotyp-Wechsel glatter Muskelzellen in Plaques von Koronararterien-zellen.

Der Ablauf und der molekulare Mechanismus des ‚Phenotypic Switchs‘ ist im Text detailliert beschrieben. Erstellt von Autorin.

Bei der vergleichenden Analyse von atherosklerotischen und nicht-atherosklerotischen Koronararterien beobachteten wir, dass PML bzw. PML-Kernkörperchen (PML-NBs) insbesondere in alpha-SMA-immunreaktiven Zellen in der Schulterregion atherosklerotischer Plaques angereichert ist. Solche Zellen stammen von glatten Muskelzellen (Smooth muscle cells, SMC) ab, deren Funktion und Struktur sich im Rahmen der atherosklerotischen Pathogenese umwandeln (‚Phenotypic Switch‘). Typisch hierfür sind eine Dedifferenzierung der SMC, die vermehrt proliferieren und migrieren (Rensen *et al.*, 2007; Bennett *et al.*, 2016). Um das Phänomen ‚Phenotypic Switch‘ näher zu charakterisieren, haben wir ein Zellkultursystem mit differenzierten humanen SMCs aus Koronararterien (dHCASMCs) aufgebaut. Wurden dHCASMCs mit einem PML-Vektor transfiziert, exprimierten sie höhere Mengen an SUMOylierten Proteinen, aber geringere Mengen an Markern für die Zelldifferenzierung und wiesen mehr Proliferations- und Migrationsaktivitäten auf als Kontroll-transfizierte

dHCASMCs. Wir schlossen daraus, dass PML-abhängige SUMOylierung am Phänotypwechsel in SMC beteiligt ist, die in Plaques von atherosklerotischen Koronararterien zu finden sind.

Ein ähnliches Muster an Modifikationen im Phänotyp wurde auch in dHCASMCs nach Interferon- γ -Stimulation beobachtet. Diese Daten deuten darauf hin, dass PML ein bisher unbekannter Faktor in der molekularen Kaskade ist, die mit der Pathogenese der Atherosklerose assoziiert ist und in SMC zwischen der stromaufwärts gelegenen Interferon- γ -Aktivierung und der stromabwärts gelegenen SUMOylierung positioniert ist.

Auch bei diesem Projekt sind Fragen offen geblieben: 1. Welcher Trigger (der IFN- γ aktivierbar sein sollte) sorgt für die PML-Induktion und die nachfolgende Anreicherung von PML-NBs in den glatten Muskelzellen? 2. Über welche molekularen Signalwege trägt die SUMOylierung zum ‚Phenotypic Switch‘ der SMC bei? 3. Ist auch Smyd1 am ‚Phenotypic Switch‘ der SMCs involviert? 4. Könnte der beschriebene Signalweg nicht nur bei der Atherosklerose, sondern auch bei anderen systemischen Entzündungsprozessen eine Rolle spielen?

3.4 Smyd1 als multifunktionales Signalprotein

Die bisherige Darstellung hat gezeigt, dass Smyd1 in verschiedenen Zelltypen intrazelluläre Prozesse innerhalb von drei Funktionsmodulen beeinflussen kann (Abb. 10). 1. In differenzierten (bzw. differenzierenden) Myoblasten wirkt Smyd1 als Kofaktor der Transkription, und wirkt so in Kooperation mit dem Muskel-spezifischen skNAC an der Induktion der Expression von zahlreichen Genen mit. 2. In Endothelzellen katalysiert Smyd1 als Histonmethyltransferase die Trimethylierung des Histons 3 (H3K4me3) und wirkt durch diese HMT-Aktivität an der Induktion der Transkription zu mindestens von IL-6 mit. 3. Außerdem wird Smyd1 in diesen Zellen SUMOyliert und vermag selbst die Ausbildung der SUMOylierungs-Fabriken – der PML-NBs - zu modulieren. Smyd1 ist somit ein intrazelluläres Signalprotein, das eine multifunktionale Wirkungsweise aufweist.

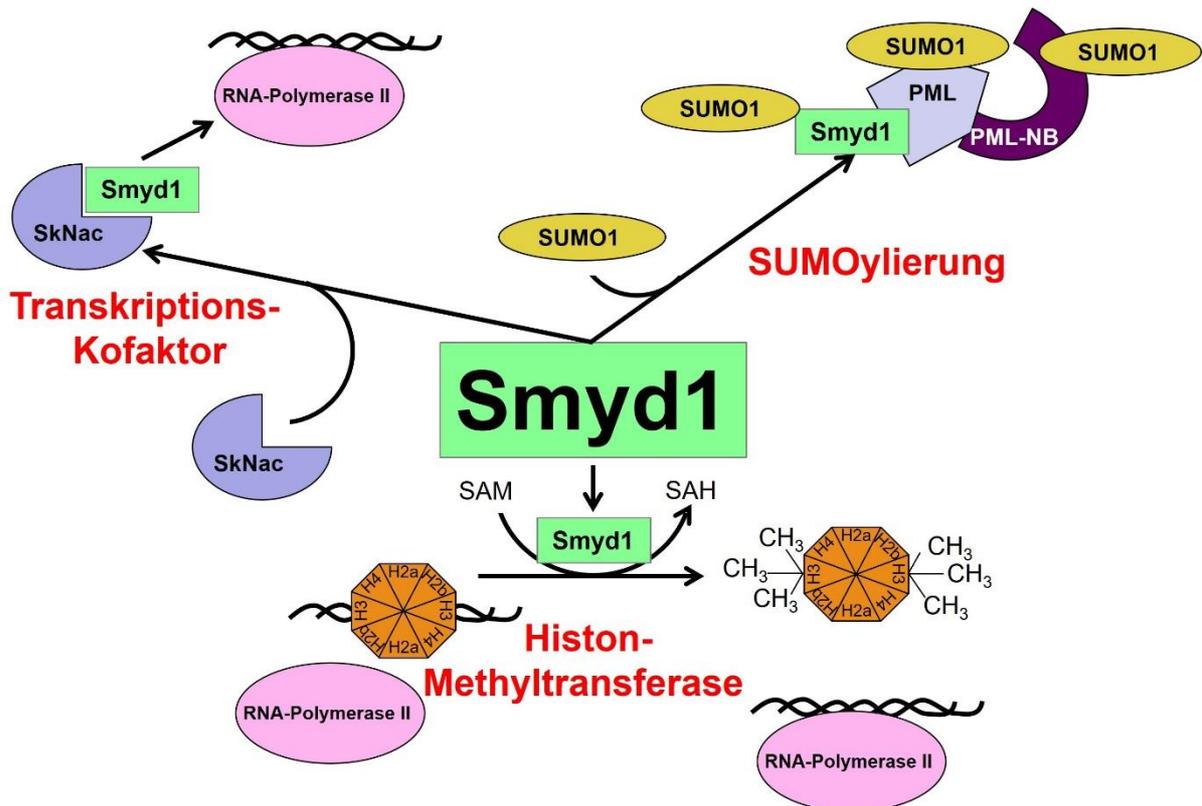


Abb. 10: Schematische Zusammenfassung der drei zellulären Funktionsmodule, an denen Smyd1 beteiligt ist. Dargestellt sind die Ergebnisse der molekularen Charakterisierung der Smyd1-Aktivitäten in verschiedenen Zelltypen, die in den Publikationen beschrieben sind, die dieser Schrift zugrunde liegen. Erstellt von Autorin.

Ob bzw. wie es intermodulare Wechselwirkungen gibt, könnte anhand folgender Fragestellungen untersucht werden:

1. Es ist im Moment ungeklärt, ob bzw. wie diese zellulären Prozesse mit der Beteiligung von Smyd1- strukturell bzw. molekular zusammenhängen. Es ist denkbar, dass die Methyltransferase (MT)-Aktivität an der Etablierung der Interaktion mit skNAC beteiligt ist, indem Smyd1 entweder skNAC oder andere Proteine methyliert und somit aktiviert. Eine unveröffentlichte Studie (H. Tucker, persönliche Mitteilung) deutet darauf hin, dass Smyd1 skNAC tatsächlich methyliert, wodurch die Transkriptionsaktivität am Myoglobin-Promotor erhöht wird. Eine entsprechende MT-Aktivität für Nicht-Histonproteine ist bereits für Smyd1 und andere Mitglieder der Smyd-Familie (Tracy *et al.*, 2018) nachgewiesen worden. Im Fall von Smyd1 konnte bislang neben skNAC (H. Tucker, persönliche Mitteilung) nur ein weiteres Nicht-Histonprotein identifiziert werden, der Stress-sensitive Faktor TRB3, der methyliert als Co-Repressor von Smyd1 fungiert (Rasmussen *et al.*, 2015). Auch ist es möglich, dass die Transkriptionsaktivität von Smyd1 auf die HMT-Aktivität zurückgeht und/oder dass die SUMOylierung Einfluss auf die MT/HMT-Aktivität von Smyd1 hat.

2. Es ist bislang nicht untersucht worden, ob die ganze Bandbreite der multifunktionalen Reaktionen gemeinsam in einer Zelle stattfindet. Da skNAC nur im Muskelgewebe exprimiert wird ([Yotov und St-Arnaud, 1996](#); [Munz *et al.*, 1999](#)), ist es z.B. nicht möglich, dass Smyd1 in anderen Zellen als in Myoblasten/Myozyten mit skNAC als Transkriptionskomplex wechselwirkt, aber es könnte ein anderes Mitglied der aNAC-Genfamilie als Interaktionspartner für Smyd1 in anderen Zelltypen zur Verfügung stehen.
3. Für die Interaktion von Smyd1 und PML spielt offensichtlich die SUMOylierung von Smyd1 eine entscheidende Rolle. Da PML durch seine Rolle als Organisator der PML-NB Aggregation eine zentrale Rolle in der Zellphysiologie ausübt, könnte Smyd1 indirekt nach seiner eigenen posttranslationalen Modifikation auf eine noch nicht erkannte Art und Weise auf weitere zelluläre Prozesse einwirken. Das PML-Interaktom enthält etwa 160 Proteine, die konstitutiv oder transient an PML-Kernkörperchen gebunden sind ([Guan und Kao, 2015](#)). Darunter befinden sich zahlreiche Histon-modifizierende Enzyme und Komponenten von Chromatin-Remodelling-Komplexen. Ob und wie die Aktivität dieser Faktoren innerhalb der PML-NB reguliert wird bzw. wie sie epigenetische Vorgänge beeinflussen, ist bislang nur wenig untersucht worden.
4. Sowohl Immunfluoreszenzuntersuchungen als auch biochemische Analysen (nach Kompartimentisolierung) haben gezeigt, dass Smyd1 im Zytoplasma und im Nucleus zu finden ist. Darüber hinaus wurden Smyd1-Translokationen vom Nucleus-zum-Zytoplasma im Verlauf der Myogenese nachgewiesen. Es stellt sich daher die Frage, welche physiologische Bedeutung es hat, wenn sich das Protein in beiden oder bevorzugt in je einem der beiden Kompartimente befindet. Außerdem ist es offen, ob SUMOylierung die Smyd1-Translokation nur in differenzierten Myozyten, oder auch in anderen Zelltypen ermöglicht.
5. Sowohl LPS als auch die Entzündungsmediatoren Interferon- γ und TNF- α steigerten die Transkriptionsrate von Smyd1 in Endothelzellen. Offensichtlich stellt Smyd1 ein wichtiges Molekül downstream des LPS-Rezeptorkomplexes dar, das bei immunologischen Reaktionen in Endothelzellen eine Signal-verstärkende Rolle spielt. Ob auch die Interaktion von Smyd1 und skNAC im Verlauf der Myogenese durch Entzündungsmediatoren beeinflusst wird, sollte untersucht werden.

3.5 Einschränkungen der Forschungsergebnisse und ihrer Interpretationen sowie weitergehende Fragestellungen

Neben den Modul-spezifischen (intramodular; in den ersten drei Kapiteln der Diskussion beschrieben) und den Modul-übergreifenden (intermodular; in dem vorhergehenden Kapitel diskutiert) offenen Fragestellungen schränken noch weitere bislang unbekannte (systemische) Aspekte die bisherigen Interpretationen der Forschung zur zellphysiologischen Wirkung von Smyd1 ein:

1. Die Ergebnisse sind bislang überwiegend in Zellkulturen erzielt worden, so dass nun mittels *in vivo*-Systemen untersucht werden sollte, inwieweit sich die Befunde auf die komplexere Situation in Organen und Organismen übertragen lassen.
2. Die hier vorgestellten molekulare Module zur Beschreibung der Funktionen von Smyd1 als Signalprotein sind nicht autonom zu betrachten. Vielmehr ist es wahrscheinlich, dass die Module ein Teil zellulärer Signalnetzwerke sind. Um dieses systemische Wirkungsspektrum zu identifizieren, sollten die Untersuchungen auf mehreren Ebenen erweitert werden:
 - a. Da der Proteinkomplex von Smyd1 mit skNAC wegen der limitierten Expression von skNAC auf die quergestreifte Muskulatur und das Herz beschränkt ist, sollte überprüft werden, ob Smyd1 mit anderen Mitgliedern der (α)NAC-Genfamilie oder anderen Transkriptionsfaktoren interagieren kann, um Einfluss auf die Geninduktion in anderen Zelltypen auszuüben.
 - b. Da Smyd1 und andere Mitglieder der Smyd-Genfamilie ([Tracy et al., 2018](#)) auch einige Nicht-Histonproteine methylieren (z.B. Myosin, TRB3, Hsp90, p53), sollte diese MT-Aktivität näher charakterisiert werden.
 - c. Es gibt Hinweise, dass Smyd1 in Myozyten auf die Myofibrillogenese durch das Zusammenwirken mit Myosin-spezifischen Chaperonen einwirkt ([Just et al., 2011](#); [Li et al., 2013](#)). Diese Protein-Protein-Interaktion sollte näher charakterisiert werden
 - d. Die HMT-Aktivität von Smyd1 muss nicht spezifisch für H3K4me3 sein, sondern könnte auch andere Histonproteine oder andere Lysinreste innerhalb des Histons H3 betreffen, was zu untersuchen wäre.
 - e. Da einige Enzyme des Chromatin-Remodellings funktionell mit anderen Enzymen in Wechselwirkung stehen ([Suganuma und Workman, 2011](#)), sollte systematisch untersucht werden, ob bzw. wie Smyd1 mit anderen Enzymen des Chromatin-Remodellings interagiert. So wird seit langem postuliert, dass Smyd1

Histoneacetylase (HDACs) rekrutieren kann (Gottlieb *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2021), wodurch die Expression von Zielgenen unterdrückt wird.

f. Da mittlerweile auch eine direkte Bindung von Smyd1 an spezifische DNA-Sequenzen von Promotorregionen nachgewiesen wurde (Wang *et al.*, 2021), sollte auch dieser molekulare Wirkmechanismus von Smyd1 genauer untersucht werden.

Die hier vorgestellten intramodularen, intermodularen und systemischen Fragestellungen zeigen, dass die funktionellen Rollen der drei vorgestellten Module zu Smyd1, PML und der SUMOylierung noch nicht abschließend geklärt sind, so dass sie nicht als Endpunkt, sondern eher als Ausgangspunkt für die weitere zellphysiologische Charakterisierung dieser molekularen Achse im Rahmen des Chromatin-Remodellings zu betrachten sind.

In dieser Arbeit soll auch eine kurze Aussicht auf mögliche klinische Aspekte der Befunde gegeben werden. Dabei fallen zwei Gebiete ins Auge, die Differenzierung aller Arten von Muskelzellen und lokale ebenso wie systemische Entzündungsreaktionen.

Neben der bereits gut beschriebenen Rolle von Smyd1 bei der physiologisch verlaufenden Myogenese, könnte die Smyd-PML-SUMO1-Achse auch im Kontext von Muskelerkrankungen sowohl im Herzen als auch im Skelettmuskel von Bedeutung sein. Darüber hinaus wird eine Beteiligung an der Entdifferenzierung glatter Gefäßmuskelzellen im Zusammenhang mit der Arteriosklerose durch erste Daten gestützt.

Erhöhte Spiegel an IL-6, als genereller Marker für systemische Entzündungsprozesse, treten bei einer Vielzahl von Erkrankungen auf. Immer sind Blutgefäße davon betroffen und am Entzündungsgeschehen beteiligt. Im Zusammenhang mit dem vorliegenden Projekt können als wichtige Erkrankungen insbesondere Arteriosklerose und Sepsis genannt werden. Durch den in dieser Arbeit untersuchten Zusammenhang zwischen Smyd1, der PML abhängigen SUMOylierung von Smyd1 und dem Einfluss von Smyd1 auf die Expression von IL-6 in ECs, konnte eine neue regulatorische Ebene, wie sie beispielsweise bei akuten septischen Krankheitsbildern von Bedeutung sein kann, gezeigt werden. So ist der Verlauf einer Sepsis oft gekennzeichnet durch einen Zytokinsturm auf den eine Phase der Immunparalyse (Immunsuppression) folgen kann. Nun beinhaltet das hier vorgestellte Modell einen Zeitgang, bei dem auf eine Phase der vermehrten Smyd1 Expression, wodurch die IL-6 Expression und Sekretion

der Zellen verstärkt wird, die Phase einer selbstregulierten, verminderten Smyd1-Expression folgt, womit die IL-6 Freisetzung beendet wird. Über solche Abschaltmechanismen und ihre spezifischen Zeitgänge ist auf molekular-kausaler Ebene bisher sehr wenig bekannt. Hier könnte eine besondere Relevanz der Smyd-PML-SUMO-Achse liegen.

4. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit hat das Ziel, das zellphysiologische Wirkungsspektrum der molekularen Smyd1-PML-SUMO1-Achse im Rahmen des Chromatin-Remodellings zu beschreiben, die in meiner Forschung u.a. mittels umfangreicher Transfektionsversuche mit Vektoren bzw. siRNA sowie ChIP-Analysen und biologischen Assays identifiziert wurden. Im Mittelpunkt der Darstellung steht dabei die molekulare Charakterisierung von drei Funktionsmodulen, an denen Smyd1 in kultivierten Myoblasten, Endothelzellen oder Glattmuskelzellen sowie in Gefäßabschnitten von Arteriosklerose- und Nicht-Arteriosklerose-Patienten beteiligt ist: 1. Smyd1 als Kofaktor der Transkription, 2. Smyd1 als Histonmethyltransferase (HMT) und 3. Smyd1 in Interaktion mit PML zur Organisation der SUMOylierungsfabriken PML-NB.

Dabei wurde herausgefunden, dass

1. Smyd1 im Komplex mit dem Muskel-spezifischen Transkriptionsfaktor skNAC die Transkription ausgewählter Gene in differenzierten Myoblasten induziert, die zur Myofibrillogenese, zu Entzündungsvorgängen und zum Zellstoffwechsel beitragen.
2. Smyd1 in humanen Endothelzellen nach Exposition mit Lipopolysacchariden (LPS) die Produktion und Sekretion von IL-6 erhöht. Die Umsetzung erfolgt entweder über Trimethylierung des Lysin 4 des Histons 3 im Bereich des IL-6 Promotors als auch indirekt über die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B.
3. Smyd1 die eigene Konzentration in Endothelzellen durch einen negativen Feedbackmechanismus mit negativer Rückkopplung beeinflusst. Dieser Mechanismus umfasst die Induktion der PML-Expression auf mRNA- und Proteinebene, den Transport des PML in den Nucleus und den vermehrten Zusammenbau von PML-NBs, wodurch zunächst PML und dann Smyd1 SUMOyliert werden. Hierdurch wiederum wird Smyd1 für den Transport ins Zytoplasma und den abschließenden proteosomalen Abbau markiert. Dass die SUMOylierung nicht nur ein Degradationssignal ist, sondern auch funktionell relevant sein kann, wird in Koronargefäßen von Arteriosklerose-Patienten gezeigt, in denen SUMOyliertes PML zum Phänotypwechsel („Phenotypic Switch“) von glatten Muskelzellen beiträgt, so wie sie typisch für diese Zellen in arteriosklerotischen Plaques ist.

Es wurden Faktoren identifiziert (IFN γ , TNF α , LPS), die an unterschiedlichen Schnittstellen zur Regulation der Smyd1-Konzentration in der untersuchten Endothelzelllinie einwirken. Die experimentellen Daten belegen, dass Smyd1 ein

multifunktionales Molekül ist, das an verschiedenen molekularen funktionellen Modulen beteiligt ist und dabei über SUMOylierung und HMT-Aktivität wirkt.

Summary

It is the aim of the present work to describe the spectrum of cell-physiological effects of the molecular Smyd1-PML-SUMO1 axis in the context of chromatin remodeling. The findings had been identified in my research, which is based, among others, on transfection experiments with vectors or siRNAs as well as ChIP analyzes and biological assays. The focus of the presentation is the characterization of three molecular modules in which Smyd1 is involved in cultured myoblasts, endothelial cells or smooth muscle cells as well as in vascular sections of arteriosclerosis and non-arteriosclerosis patients: 1. Smyd1 as a cofactor of transcription, 2. Smyd1 as a histone methyltransferase (HMT) and 3. Smyd1 regulating PML expression to organize the SUMOylation factories PML-NB.

Specifically, it was found out that

1. Smyd1 in complex with the muscle-specific transcription factor skNAC induces the transcription of selected genes in differentiated myoblasts that contribute to myofibrillogenesis, inflammatory processes and cell metabolism.
2. Smyd1 leads to higher IL-6 production and secretion in human endothelial cells after exposure to lipopolysaccharides (LPS). The cellular reaction is realized either via trimethylation of lysine 4 of histone 3 in the area of the IL-6 promoter or indirectly via activation of the transcription factor NF- κ B.
3. Smyd1 affects its own concentration in endothelial cells through a negative feedback loop. This feedback loop involves induction of PML expression at mRNA and protein levels, transport of PML into the nucleus, and increased assembly of PML-NBs, resulting in SUMOylation of first PML and then Smyd1. This SUMOylation modification labels Smyd1 for the transport to the cytoplasm and subsequent proteosomal degradation. That SUMOylation is not only a degradation signal but can also be functionally relevant is shown in coronary vessels of arteriosclerosis patients, in which SUMOylated PML contributes to the 'phenotypic switch' of smooth muscle cells as is typical for these cells in atherosclerotic plaques.

Various factors were also identified (IFN γ , TNF α , LPS) that act on different steps of the regulatory circuit for autoregulating the Smyd1 concentration in the endothelial cell line evaluated. The experimental data demonstrate that Smyd1 is a multifunctional

signaling molecule involved in different molecular modules and acts through SUMOylation and HMT activity.

5. Literaturverzeichnis

- Adam, S.A. (2017). The Nucleoskeleton. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 9.
- Adewumi, I., Lopez, C., and Davie, J.R. (2019). Mitogen and stress- activated protein kinase regulated gene expression in cancer cells. *Adv Biol Regul* 71, 147-155.
- Alam, H., Gu, B., and Lee, M.G. (2015). Histone methylation modifiers in cellular signaling pathways. *Cell Mol Life Sci* 72, 4577-4592.
- Alber, F., Dokudovskaya, S., Veenhoff, L.M., Zhang, W., Kipper, J., Devos, D., Suprpto, A., Karni-Schmidt, O., Williams, R., Chait, B.T., Sali, A., and Rout, M.P. (2007). The molecular architecture of the nuclear pore complex. *Nature* 450, 695-701.
- Alberts, B., Johnson, A.D., Lewis, J., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K., and Walter, P. (2017). *Molecular biology of the cell*. New York, NY, USA: Garland Science.
- Ascoli, C.A., and Maul, G.G. (1991). Identification of a novel nuclear domain. *J Cell Biol* 112, 785-795.
- Bannister, A.J., and Kouzarides, T. (2011). Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res* 21, 381-395.
- Barski, A., Cuddapah, S., Cui, K., Roh, T.Y., Schones, D.E., Wang, Z., Wei, G., Chepelev, I., and Zhao, K. (2007). High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. *Cell* 129, 823-837.
- Becker, S., Steinemann, G., Karle, W., Roos, K., Liem, C.H., Muralikumar, S., Volkamer, A., Munz, B., Zakrzewicz, A., and Berkholz, J. (2021). Stability of Smyd1 in endothelial cells is controlled by PML-dependent SUMOylation upon cytokine stimulation. *Biochem J* 478, 217-234.
- Bennett, M.R., Sinha, S., and Owens, G.K. (2016). Vascular Smooth Muscle Cells in Atherosclerosis. *Circ Res* 118, 692-702.
- Berkholz, J., Michalick, L., and Munz, B. (2014). The E3 SUMO ligase Nse2 regulates sumoylation and nuclear-to-cytoplasmic translocation of skNAC-Smyd1 in myogenesis. *J Cell Sci* 127, 3794-3804.
- Biamonti, G., and Vourc'h, C. (2010). Nuclear stress bodies. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2, a000695.
- Boisvert, F.M., Van Koningsbruggen, S., Navascues, J., and Lamond, A.I. (2007). The multifunctional nucleolus. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 574-585.
- Borden, K.L. (2002). Pondering the promyelocytic leukemia protein (PML) puzzle: possible functions for PML nuclear bodies. *Mol Cell Biol* 22, 5259-5269.
- Boriack-Sjodin, P.A., and Swinger, K.K. (2016). Protein Methyltransferases: A Distinct, Diverse, and Dynamic Family of Enzymes. *Biochemistry* 55, 1557-1569.
- Bottino, C., Peserico, A., Simone, C., and Caretti, G. (2020). SMYD3: An Oncogenic Driver Targeting Epigenetic Regulation and Signaling Pathways. *Cancers (Basel)* 12.
- Bozza, F.A., Salluh, J.I., Japiassu, A.M., Soares, M., Assis, E.F., Gomes, R.N., Bozza, M.T., Castro-Faria-Neto, H.C., and Bozza, P.T. (2007). Cytokine profiles as markers of disease severity in sepsis: a multiplex analysis. *Crit Care* 11, R49.
- Brown, K., Park, S., Kanno, T., Franzoso, G., and Siebenlist, U. (1993). Mutual regulation of the transcriptional activator NF-kappa B and its inhibitor, I kappa B-alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 2532-2536.
- Brown, M.A., Foreman, K., Harriss, J., Das, C., Zhu, L., Edwards, M., Shaaban, S., and Tucker, H. (2015). C-terminal domain of SMYD3 serves as a unique HSP90-regulated motif in oncogenesis. *Oncotarget* 6, 4005-4019.
- Brown, M.A., Sims, R.J., 3rd, Gottlieb, P.D., and Tucker, P.W. (2006). Identification and characterization of Smyd2: a split SET/MYND domain-containing histone

- H3 lysine 36-specific methyltransferase that interacts with the Sin3 histone deacetylase complex. *Mol Cancer* 5, 26.
- Carmo-Fonseca, M., Berciano, M.T., and Lafarga, M. (2010). Orphan nuclear bodies. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2, a000703.
- Cedar, H., and Bergman, Y. (2009). Linking DNA methylation and histone modification: patterns and paradigms. *Nat Rev Genet* 10, 295-304.
- Chang, Y.C., Oram, M.K., and Bielinsky, A.K. (2021). SUMO-Targeted Ubiquitin Ligases and Their Functions in Maintaining Genome Stability. *Int J Mol Sci* 22.
- Chen, Z., Hagler, J., Palombella, V.J., Melandri, F., Scherer, D., Ballard, D., and Maniatis, T. (1995). Signal-induced site-specific phosphorylation targets I kappa B alpha to the ubiquitin-proteasome pathway. *Genes Dev* 9, 1586-1597.
- Cheng, J., Kang, X., Zhang, S., and Yeh, E.T. (2007). SUMO-specific protease 1 is essential for stabilization of HIF1alpha during hypoxia. *Cell* 131, 584-595.
- Chu, Y., and Yang, X. (2011). SUMO E3 ligase activity of TRIM proteins. *Oncogene* 30, 1108-1116.
- Cremer, T., Cremer, M., Hubner, B., Silaharoglu, A., Hendzel, M., Lanctot, C., Strickfaden, H., and Cremer, C. (2020). The Interchromatin Compartment Participates in the Structural and Functional Organization of the Cell Nucleus. *Bioessays* 42, e1900132.
- Crump, N.T., and Milne, T.A. (2019). Why are so many MLL lysine methyltransferases required for normal mammalian development? *Cell Mol Life Sci* 76, 2885-2898.
- Dandrea, M., Donadelli, M., Costanzo, C., Scarpa, A., and Palmieri, M. (2009). MeCP2/H3meK9 are involved in IL-6 gene silencing in pancreatic adenocarcinoma cell lines. *Nucleic Acids Res* 37, 6681-6690.
- Dauphinee, S.M., and Karsan, A. (2006). Lipopolysaccharide signaling in endothelial cells. *Lab Invest* 86, 9-22.
- De, The., Riviere, M., and Bernhard, W. (1960). [Examination by electron microscope of the VX2 tumor of the domestic rabbit derived from the Shope papilloma]. *Bull Assoc Fr Etud Cancer* 47, 570-584.
- De The, H., Lavau, C., Marchio, A., Chomienne, C., Degos, L., and Dejean, A. (1991). The PML-RAR alpha fusion mRNA generated by the t(15;17) translocation in acute promyelocytic leukemia encodes a functionally altered RAR. *Cell* 66, 675-684.
- Dillon, S.C., Zhang, X., Trievel, R.C., and Cheng, X. (2005). The SET-domain protein superfamily: protein lysine methyltransferases. *Genome Biol* 6, 227.
- Doughan, M., Spellmon, N., Li, C., and Yang, Z. (2016). SMYD proteins in immunity: dawning of a new era. *AIMS Biophys* 3, 450-455.
- Draizen, E.J., Shaytan, A.K., Marino-Ramirez, L., Talbert, P.B., Landsman, D., and Panchenko, A.R. (2016). HistoneDB 2.0: a histone database with variants--an integrated resource to explore histones and their variants. *Database (Oxford)* 2016.
- Dreyfuss, G., Philipson, L., and Mattaj, I.W. (1988). Ribonucleoprotein particles in cellular processes. *J Cell Biol* 106, 1419-1425.
- Du, S.J., Tan, X., and Zhang, J. (2014). SMYD proteins: key regulators in skeletal and cardiac muscle development and function. *Anat Rec (Hoboken)* 297, 1650-1662.
- Dundr, M., and Misteli, T. (2010). Biogenesis of nuclear bodies. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2, a000711.
- Dyck, J.A., Maul, G.G., Miller, W.H., Jr., Chen, J.D., Kakizuka, A., and Evans, R.M. (1994). A novel macromolecular structure is a target of the promyelocyte-retinoic acid receptor oncoprotein. *Cell* 76, 333-343.

- Ernst, P., and Vakoc, C.R. (2012). WRAD: enabler of the SET1-family of H3K4 methyltransferases. *Brief Funct Genomics* 11, 217-226.
- Everett, R.D., and Chelbi-Alix, M.K. (2007). PML and PML nuclear bodies: implications in antiviral defence. *Biochimie* 89, 819-830.
- Feldherr, C.M., and Akin, D. (1990). EM visualization of nucleocytoplasmic transport processes. *Electron Microsc Rev* 3, 73-86.
- Feng, Q., Wang, H., Ng, H.H., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Struhl, K., and Zhang, Y. (2002). Methylation of H3-lysine 79 is mediated by a new family of HMTases without a SET domain. *Curr Biol* 12, 1052-1058.
- Flotho, A., and Melchior, F. (2013). Sumoylation: a regulatory protein modification in health and disease. *Annu Rev Biochem* 82, 357-385.
- Fox, A.H., Nakagawa, S., Hirose, T., and Bond, C.S. (2018). Paraspeckles: Where Long Noncoding RNA Meets Phase Separation. *Trends Biochem Sci* 43, 124-135.
- Francis, M., Gopinathan, G., Salapatas, A., Nares, S., Gonzalez, M., Diekwisch, T.G.H., and Luan, X. (2020). SETD1 and NF-kappaB Regulate Periodontal Inflammation through H3K4 Trimethylation. *J Dent Res* 99, 1486-1493.
- Franklin, S., Kimball, T., Rasmussen, T.L., Rosa-Garrido, M., Chen, H., Tran, T., Miller, M.R., Gray, R., Jiang, S., Ren, S., Wang, Y., Tucker, H.O., and Vondriska, T.M. (2016). The chromatin-binding protein Smyd1 restricts adult mammalian heart growth. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 311, H1234-H1247.
- Galanty, Y., Belotserkovskaya, R., Coates, J., and Jackson, S.P. (2012). RNF4, a SUMO-targeted ubiquitin E3 ligase, promotes DNA double-strand break repair. *Genes Dev* 26, 1179-1195.
- Galganski, L., Urbanek, M.O., and Krzyzosiak, W.J. (2017). Nuclear speckles: molecular organization, biological function and role in disease. *Nucleic Acids Res* 45, 10350-10368.
- Geiss-Friedlander, R., and Melchior, F. (2007). Concepts in sumoylation: a decade on. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 947-956.
- Goenka, A., Sengupta, S., Pandey, R., Parihar, R., Mohanta, G.C., Mukerji, M., and Ganesh, S. (2016). Human satellite-III non-coding RNAs modulate heat-shock-induced transcriptional repression. *J Cell Sci* 129, 3541-3552.
- Gottlieb, P.D., Pierce, S.A., Sims, R.J., Yamagishi, H., Weihe, E.K., Harriss, J.V., Maika, S.D., Kuziel, W.A., King, H.L., Olson, E.N., Nakagawa, O., and Srivastava, D. (2002). Bop encodes a muscle-restricted protein containing MYND and SET domains and is essential for cardiac differentiation and morphogenesis. *Nat Genet* 31, 25-32.
- Grandel, U., and Grimminger, F. (2003). Endothelial responses to bacterial toxins in sepsis. *Crit Rev Immunol* 23, 267-299.
- Grunstein, M. (1997). Histone acetylation in chromatin structure and transcription. *Nature* 389, 349-352.
- Guan, D., and Kao, H.Y. (2015). The function, regulation and therapeutic implications of the tumor suppressor protein, PML. *Cell Biosci* 5, 60.
- Guo, L., Giasson, B.I., Glavis-Bloom, A., Brewer, M.D., Shorter, J., Gitler, A.D., and Yang, X. (2014). A cellular system that degrades misfolded proteins and protects against neurodegeneration. *Mol Cell* 55, 15-30.
- Gurrieri, C., Capodiecici, P., Bernardi, R., Scaglioni, P.P., Nafa, K., Rush, L.J., Verbel, D.A., Cordon-Cardo, C., and Pandolfi, P.P. (2004). Loss of the tumor suppressor PML in human cancers of multiple histologic origins. *J Natl Cancer Inst* 96, 269-279.

- Hamamoto, R., Furukawa, Y., Morita, M., Iimura, Y., Silva, F.P., Li, M., Yagyū, R., and Nakamura, Y. (2004). SMYD3 encodes a histone methyltransferase involved in the proliferation of cancer cells. *Nat Cell Biol* 6, 731-740.
- Hattori, Y., Takano, K., Teramae, H., Yamamoto, S., Yokoo, H., and Matsuda, N. (2010). Insights into sepsis therapeutic design based on the apoptotic death pathway. *J Pharmacol Sci* 114, 354-365.
- Hay, R.T. (2005). SUMO: a history of modification. *Mol Cell* 18, 1-12.
- Hernandez-Verdun, D. (2006). The nucleolus: a model for the organization of nuclear functions. *Histochem Cell Biol* 126, 135-148.
- Hoischen, C., Monajembashi, S., Weisshart, K., and Hemmerich, P. (2018). Multimodal Light Microscopy Approaches to Reveal Structural and Functional Properties of Promyelocytic Leukemia Nuclear Bodies. *Front Oncol* 8, 125.
- Hsu, K.S., and Kao, H.Y. (2018). PML: Regulation and multifaceted function beyond tumor suppression. *Cell Biosci* 8, 5.
- Hu, L., Yu, Y., Huang, H., Fan, H., Hu, L., Yin, C., Li, K., Fulton, D.J., and Chen, F. (2016). Epigenetic Regulation of Interleukin 6 by Histone Acetylation in Macrophages and Its Role in Paraquat-Induced Pulmonary Fibrosis. *Front Immunol* 7, 696.
- Huang, L., and Xu, A.M. (2017). SET and MYND domain containing protein 3 in cancer. *Am J Transl Res* 9, 1-14.
- Hwang, J.W., Cho, Y., Bae, G.U., Kim, S.N., and Kim, Y.K. (2021). Protein arginine methyltransferases: promising targets for cancer therapy. *Exp Mol Med* 53, 788-808.
- Hyun, K., Jeon, J., Park, K., and Kim, J. (2017). Writing, erasing and reading histone lysine methylations. *Exp Mol Med* 49, e324.
- Ishov, A.M., Sotnikov, A.G., Negorev, D., Vladimirova, O.V., Neff, N., Kamitani, T., Yeh, E.T., Strauss, J.F., 3rd, and Maul, G.G. (1999). PML is critical for ND10 formation and recruits the PML-interacting protein daxx to this nuclear structure when modified by SUMO-1. *J Cell Biol* 147, 221-234.
- Jensen, K., Shiels, C., and Freemont, P.S. (2001). PML protein isoforms and the RBCC/TRIM motif. *Oncogene* 20, 7223-7233.
- Jenuwein, T., and Allis, C.D. (2001). Translating the histone code. *Science* 293, 1074-1080.
- Ji, C., Bader, J., Ramanathan, P., Hennlein, L., Meissner, F., Jablonka, S., Mann, M., Fischer, U., Sendtner, M., and Briese, M. (2021). Interaction of 7SK with the Smn complex modulates snRNP production. *Nat Commun* 12, 1278.
- Jiang, Y., Sirinpong, N., Brunzelle, J., and Yang, Z. (2011). Crystal structures of histone and p53 methyltransferase SmyD2 reveal a conformational flexibility of the autoinhibitory C-terminal domain. *PLoS One* 6, e21640.
- Johnson, E.S. (2004). Protein modification by SUMO. *Annu Rev Biochem* 73, 355-382.
- Just, S., Meder, B., Berger, I.M., Etard, C., Trano, N., Patzel, E., Hassel, D., Marquart, S., Dahme, T., Vogel, B., Fishman, M.C., Katus, H.A., Strahle, U., and Rottbauer, W. (2011). The myosin-interacting protein SMYD1 is essential for sarcomere organization. *J Cell Sci* 124, 3127-3136.
- Kaiser, T.E., Intine, R.V., and Dundr, M. (2008). De novo formation of a subnuclear body. *Science* 322, 1713-1717.
- Kakizuka, A., Miller, W.H., Jr., Umesono, K., Warrell, R.P., Jr., Frankel, S.R., Murty, V.V., Dmitrovsky, E., and Evans, R.M. (1991). Chromosomal translocation t(15;17) in human acute promyelocytic leukemia fuses RAR alpha with a novel putative transcription factor, PML. *Cell* 66, 663-674.

- Kamitani, T., Kito, K., Nguyen, H.P., Wada, H., Fukuda-Kamitani, T., and Yeh, E.T. (1998). Identification of three major sctrinization sites in PML. *J Biol Chem* 273, 26675-26682.
- Kean, E.L., Munster-Kuhnel, A.K., and Gerardy-Schahn, R. (2004). CMP-sialic acid synthetase of the nucleus. *Biochim Biophys Acta* 1673, 56-65.
- Khakpour, S., Wilhelmsen, K., and Hellman, J. (2015). Vascular endothelial cell Toll-like receptor pathways in sepsis. *Innate Immun* 21, 827-846.
- Kim, H., Heo, K., Kim, J.H., Kim, K., Choi, J., and An, W. (2009a). Requirement of histone methyltransferase SMYD3 for estrogen receptor-mediated transcription. *J Biol Chem* 284, 19867-19877.
- Kim, J., Lowe, T., and Hoppe, T. (2008). Protein quality control gets muscle into shape. *Trends Cell Biol* 18, 264-272.
- Kim, J., Venkata, N.C., Hernandez Gonzalez, G.A., Khanna, N., and Belmont, A.S. (2020). Gene expression amplification by nuclear speckle association. *J Cell Biol* 219.
- Kim, M.S., Pinto, S.M., Getnet, D., Nirujogi, R.S., Manda, S.S., Chaerkady, R., Madugundu, A.K., Kelkar, D.S., Isserlin, R., Jain, S., Thomas, J.K., Muthusamy, B., Leal-Rojas, P., Kumar, P., Sahasrabudde, N.A., Balakrishnan, L., Advani, J., George, B., Renuse, S., Selvan, L.D., Patil, A.H., Nanjappa, V., Radhakrishnan, A., Prasad, S., Subbannayya, T., Raju, R., Kumar, M., Sreenivasamurthy, S.K., Marimuthu, A., Sathe, G.J., Chavan, S., Datta, K.K., Subbannayya, Y., Sahu, A., Yelamanchi, S.D., Jayaram, S., Rajagopalan, P., Sharma, J., Murthy, K.R., Syed, N., Goel, R., Khan, A.A., Ahmad, S., Dey, G., Mudgal, K., Chatterjee, A., Huang, T.C., Zhong, J., Wu, X., Shaw, P.G., Freed, D., Zahari, M.S., Mukherjee, K.K., Shankar, S., Mahadevan, A., Lam, H., Mitchell, C.J., Shankar, S.K., Satishchandra, P., Schroeder, J.T., Sirdeshmukh, R., Maitra, A., Leach, S.D., Drake, C.G., Halushka, M.K., Prasad, T.S., Hruban, R.H., Kerr, C.L., Bader, G.D., Iacobuzio-Donahue, C.A., Gowda, H., and Pandey, A. (2014). A draft map of the human proteome. *Nature* 509, 575-581.
- Kim, V.N., Han, J., and Siomi, M.C. (2009b). Biogenesis of small RNAs in animals. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10, 126-139.
- Kiss, T. (2004). Biogenesis of small nuclear RNPs. *J Cell Sci* 117, 5949-5951.
- Kouzarides, T. (2007). Chromatin modifications and their function. *Cell* 128, 693-705.
- Kumar, H., Kawai, T., and Akira, S. (2009). Toll-like receptors and innate immunity. *Biochem Biophys Res Commun* 388, 621-625.
- Lallemand-Breitenbach, V., and De The, H. (2010). PML nuclear bodies. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2, a000661.
- Lallemand-Breitenbach, V., and De The, H. (2018). PML nuclear bodies: from architecture to function. *Curr Opin Cell Biol* 52, 154-161.
- Lee, W., Kim, J., Yun, J.M., Ohn, T., and Gong, Q. (2020). MeCP2 regulates gene expression through recognition of H3K27me3. *Nat Commun* 11, 3140.
- Leinhart, K., and Brown, M. (2011). SET/MYND Lysine Methyltransferases Regulate Gene Transcription and Protein Activity. *Genes (Basel)* 2, 210-218.
- Lenser, T., Weissart, K., Ulbricht, T., Klement, K., and Hemmerich, P. (2010). Fluorescence fluctuation microscopy to reveal 3D architecture and function in the cell nucleus. *Methods Cell Biol* 98, 2-33.
- Levy, D., Kuo, A.J., Chang, Y., Schaefer, U., Kitson, C., Cheung, P., Espejo, A., Zee, B.M., Liu, C.L., Tangsombatvisit, S., Tennen, R.I., Kuo, A.Y., Tanjing, S., Cheung, R., Chua, K.F., Utz, P.J., Shi, X., Prinjha, R.K., Lee, K., Garcia, B.A., Bedford, M.T., Tarakhovsky, A., Cheng, X., and Gozani, O. (2011). Lysine methylation of the NF-kappaB subunit RelA by SETD6 couples activity of the

- histone methyltransferase GLP at chromatin to tonic repression of NF-kappaB signaling. *Nat Immunol* 12, 29-36.
- Li, H., Zhong, Y., Wang, Z., Gao, J., Xu, J., Chu, W., Zhang, J., Fang, S., and Du, S.J. (2013). Smyd1b is required for skeletal and cardiac muscle function in zebrafish. *Mol Biol Cell* 24, 3511-3521.
- Lin, D.H., Stuwe, T., Schilbach, S., Rundlet, E.J., Perriches, T., Mobbs, G., Fan, Y., Thierbach, K., Huber, F.M., Collins, L.N., Davenport, A.M., Jeon, Y.E., and Hoelz, A. (2016). Architecture of the symmetric core of the nuclear pore. *Science* 352, aaf1015.
- Mao, Y.S., Zhang, B., and Spector, D.L. (2011). Biogenesis and function of nuclear bodies. *Trends Genet* 27, 295-306.
- Marzluff, W.F., and Koreski, K.P. (2017). Birth and Death of Histone mRNAs. *Trends Genet* 33, 745-759.
- Matera, A.G., Terns, R.M., and Terns, M.P. (2007). Non-coding RNAs: lessons from the small nuclear and small nucleolar RNAs. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 209-220.
- Mattioli, F., and Penengo, L. (2021). Histone Ubiquitination: An Integrative Signaling Platform in Genome Stability. *Trends Genet* 37, 566-581.
- Mikolajczyk, J., Drag, M., Bekes, M., Cao, J.T., Ronai, Z., and Salvesen, G.S. (2007). Small ubiquitin-related modifier (SUMO)-specific proteases: profiling the specificities and activities of human SENPs. *J Biol Chem* 282, 26217-26224.
- Moreno, F., Ahuatz, D., Riera, A., Palomino, C.A., and Herrero, P. (2005). Glucose sensing through the Hxk2-dependent signalling pathway. *Biochem Soc Trans* 33, 265-268.
- Munz, B., Wiedmann, M., Lochmuller, H., and Werner, S. (1999). Cloning of novel injury-regulated genes. Implications for an important role of the muscle-specific protein skNAC in muscle repair. *J Biol Chem* 274, 13305-13310.
- Nakagawa, S., Naganuma, T., Shioi, G., and Hirose, T. (2011). Paraspeckles are subpopulation-specific nuclear bodies that are not essential in mice. *J Cell Biol* 193, 31-39.
- Nakagawa, S., Yamazaki, T., and Hirose, T. (2018). Molecular dissection of nuclear paraspeckles: towards understanding the emerging world of the RNP milieu. *Open Biol* 8.
- Nakayama, J., Rice, J.C., Strahl, B.D., Allis, C.D., and Grewal, S.I. (2001). Role of histone H3 lysine 9 methylation in epigenetic control of heterochromatin assembly. *Science* 292, 110-113.
- Nisole, S., Maroui, M.A., Mascle, X.H., Aubry, M., and Chelbi-Alix, M.K. (2013). Differential Roles of PML Isoforms. *Front Oncol* 3, 125.
- Nizami, Z., Deryusheva, S., and Gall, J.G. (2010). The Cajal body and histone locus body. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2, a000653.
- Norton, J.T., Pollock, C.B., Wang, C., Schink, J.C., Kim, J.J., and Huang, S. (2008). Perinucleolar compartment prevalence is a phenotypic pancancer marker of malignancy. *Cancer* 113, 861-869.
- Palsson-Mcdermott, E.M., and O'Neill, L.A. (2004). Signal transduction by the lipopolysaccharide receptor, Toll-like receptor-4. *Immunology* 113, 153-162.
- Pichler, A., Fatouros, C., Lee, H., and Eisenhardt, N. (2017). SUMO conjugation - a mechanistic view. *Biomol Concepts* 8, 13-36.
- Pober, J.S., and Sessa, W.C. (2007). Evolving functions of endothelial cells in inflammation. *Nat Rev Immunol* 7, 803-815.
- Pollock, C., and Huang, S. (2010). The perinucleolar compartment. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2, a000679.

- Portela, A., and Esteller, M. (2010). Epigenetic modifications and human disease. *Nat Biotechnol* 28, 1057-1068.
- Prudden, J., Pebernard, S., Raffa, G., Slavin, D.A., Perry, J.J., Tainer, J.A., MCGowan, C.H., and Boddy, M.N. (2007). SUMO-targeted ubiquitin ligases in genome stability. *EMBO J* 26, 4089-4101.
- Qian, C., and Zhou, M.M. (2006). SET domain protein lysine methyltransferases: Structure, specificity and catalysis. *Cell Mol Life Sci* 63, 2755-2763.
- Quinn, J.J., and Chang, H.Y. (2016). Unique features of long non-coding RNA biogenesis and function. *Nat Rev Genet* 17, 47-62.
- Raetz, C.R., and Whitfield, C. (2002). Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu Rev Biochem* 71, 635-700.
- Rasmussen, T.L., Ma, Y., Park, C.Y., Harriss, J., Pierce, S.A., Dekker, J.D., Valenzuela, N., Srivastava, D., Schwartz, R.J., Stewart, M.D., and Tucker, H.O. (2015). Smyd1 facilitates heart development by antagonizing oxidative and ER stress responses. *PLoS One* 10, e0121765.
- Rea, S., Eisenhaber, F., O'carroll, D., Strahl, B.D., Sun, Z.W., Schmid, M., Opravil, S., Mechtler, K., Ponting, C.P., Allis, C.D., and Jenuwein, T. (2000). Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. *Nature* 406, 593-599.
- Rensen, S.S., Doevendans, P.A., and Van Eys, G.J. (2007). Regulation and characteristics of vascular smooth muscle cell phenotypic diversity. *Neth Heart J* 15, 100-108.
- Rospert, S., Dubaquié, Y., and Gautschi, M. (2002). Nascent-polypeptide-associated complex. *Cell Mol Life Sci* 59, 1632-1639.
- Rossetto, D., Avvakumov, N., and Cote, J. (2012). Histone phosphorylation: a chromatin modification involved in diverse nuclear events. *Epigenetics* 7, 1098-1108.
- Roth, S.Y., Denu, J.M., and Allis, C.D. (2001). Histone acetyltransferases. *Annu Rev Biochem* 70, 81-120.
- Rubio-Tomas, T. (2021). The SMYD family proteins in immunology: An update of their obvious and non-obvious relations with the immune system. *Heliyon* 7, e07387.
- Rueda-Robles, A., Audano, M., Alvarez-Mercado, A.I., and Rubio-Tomas, T. (2021). Functions of SMYD proteins in biological processes: What do we know? An updated review. *Arch Biochem Biophys* 712, 109040.
- Ryu, H.Y., and Hochstrasser, M. (2021). Histone sumoylation and chromatin dynamics. *Nucleic Acids Res* 49, 6043-6052.
- Sabari, B.R., Dall'agnese, A., and Young, R.A. (2020). Biomolecular Condensates in the Nucleus. *Trends Biochem Sci* 45, 961-977.
- Saitoh, H., and Hinchey, J. (2000). Functional heterogeneity of small ubiquitin-related protein modifiers SUMO-1 versus SUMO-2/3. *J Biol Chem* 275, 6252-6258.
- Sanger, J.W., Kang, S., Siebrands, C.C., Freeman, N., Du, A., Wang, J., Stout, A.L., and Sanger, J.M. (2005). How to build a myofibril. *J Muscle Res Cell Motil* 26, 343-354.
- Sanger, J.W., Wang, J., Fan, Y., White, J., Mi-Mi, L., Dube, D.K., Sanger, J.M., and Pruyn, D. (2017). Assembly and Maintenance of Myofibrils in Striated Muscle. *Handb Exp Pharmacol* 235, 39-75.
- Scheer, U., and Hock, R. (1999). Structure and function of the nucleolus. *Curr Opin Cell Biol* 11, 385-390.
- Scherer, M., and Stamminger, T. (2016). Emerging Role of PML Nuclear Bodies in Innate Immune Signaling. *J Virol* 90, 5850-5854.

- Shen, T.H., Lin, H.K., Scaglioni, P.P., Yung, T.M., and Pandolfi, P.P. (2006). The mechanisms of PML-nuclear body formation. *Mol Cell* 24, 331-339.
- Sims, R.J., 3rd, Weihe, E.K., Zhu, L., O'malley, S., Harriss, J.V., and Gottlieb, P.D. (2002). m-Bop, a repressor protein essential for cardiogenesis, interacts with skNAC, a heart- and muscle-specific transcription factor. *J Biol Chem* 277, 26524-26529.
- Sirinupong, N., Brunzelle, J., Doko, E., and Yang, Z. (2011). Structural insights into the autoinhibition and posttranslational activation of histone methyltransferase SmyD3. *J Mol Biol* 406, 149-159.
- Sirinupong, N., Brunzelle, J., Ye, J., Pirezada, A., Nico, L., and Yang, Z. (2010). Crystal structure of cardiac-specific histone methyltransferase SmyD1 reveals unusual active site architecture. *J Biol Chem* 285, 40635-40644.
- Sleeman, J.E., and Lamond, A.I. (1999). Newly assembled snRNPs associate with coiled bodies before speckles, suggesting a nuclear snRNP maturation pathway. *Curr Biol* 9, 1065-1074.
- Spellmon, N., Holcomb, J., Trescott, L., Sirinupong, N., and Yang, Z. (2015). Structure and function of SET and MYND domain-containing proteins. *Int J Mol Sci* 16, 1406-1428.
- Sriramachandran, A.M., and Dohmen, R.J. (2014). SUMO-targeted ubiquitin ligases. *Biochim Biophys Acta* 1843, 75-85.
- Stanek, D. (2017). Cajal bodies and snRNPs - friends with benefits. *RNA Biol* 14, 671-679.
- Stanek, D., and Fox, A.H. (2017). Nuclear bodies: news insights into structure and function. *Curr Opin Cell Biol* 46, 94-101.
- Stender, J.D., Pascual, G., Liu, W., Kaikkonen, M.U., Do, K., Spann, N.J., Boutros, M., Perrimon, N., Rosenfeld, M.G., and Glass, C.K. (2012). Control of proinflammatory gene programs by regulated trimethylation and demethylation of histone H4K20. *Mol Cell* 48, 28-38.
- Strahl, B.D., and Allis, C.D. (2000). The language of covalent histone modifications. *Nature* 403, 41-45.
- Suganuma, T., and Workman, J.L. (2011). Signals and combinatorial functions of histone modifications. *Annu Rev Biochem* 80, 473-499.
- Tan, X., Rotllant, J., Li, H., De Deyne, P., and Du, S.J. (2006). SmyD1, a histone methyltransferase, is required for myofibril organization and muscle contraction in zebrafish embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 2713-2718.
- Tatomer, D.C., Terzo, E., Curry, K.P., Salzler, H., Sabath, I., Zapotoczny, G., McKay, D.J., Dominski, Z., Marzluff, W.F., and Duronio, R.J. (2016). Concentrating pre-mRNA processing factors in the histone locus body facilitates efficient histone mRNA biogenesis. *J Cell Biol* 213, 557-570.
- Teif, V.B., and Rippe, K. (2009). Predicting nucleosome positions on the DNA: combining intrinsic sequence preferences and remodeler activities. *Nucleic Acids Res* 37, 5641-5655.
- Thompson, E.C., and Travers, A.A. (2008). A Drosophila Smyd4 homologue is a muscle-specific transcriptional modulator involved in development. *PLoS One* 3, e3008.
- Tracy, C., Warren, J.S., Szulik, M., Wang, L., Garcia, J., Makaju, A., Russell, K., Miller, M., and Franklin, S. (2018). The Smyd Family of Methyltransferases: Role in Cardiac and Skeletal Muscle Physiology and Pathology. *Curr Opin Physiol* 1, 140-152.
- Trepels, T., Zeiher, A.M., and Fichtlscherer, S. (2006). The endothelium and inflammation. *Endothelium* 13, 423-429.

- Van Damme, E., Laukens, K., Dang, T.H., and Van Ostade, X. (2010). A manually curated network of the PML nuclear body interactome reveals an important role for PML-NBs in SUMOylation dynamics. *Int J Biol Sci* 6, 51-67.
- Van Zon, A., Mossink, M.H., Scheper, R.J., Sonneveld, P., and Wiemer, E.A. (2003). The vault complex. *Cell Mol Life Sci* 60, 1828-1837.
- Voelkel, T., Andresen, C., Unger, A., Just, S., Rottbauer, W., and Linke, W.A. (2013). Lysine methyltransferase Smyd2 regulates Hsp90-mediated protection of the sarcomeric titin springs and cardiac function. *Biochim Biophys Acta* 1833, 812-822.
- Wang, Q., Sawyer, I.A., Sung, M.H., Sturgill, D., Shevtsov, S.P., Pegoraro, G., Hakim, O., Baek, S., Hager, G.L., and Dundr, M. (2016). Cajal bodies are linked to genome conformation. *Nat Commun* 7, 10966.
- Wang, Y., and Dasso, M. (2009). SUMOylation and deSUMOylation at a glance. *J Cell Sci* 122, 4249-4252.
- Wang, Z., Schwartz, R.J., Liu, J., Sun, F., Li, Q., and Ma, Y. (2021). Smyd1 Orchestrates Early Heart Development Through Positive and Negative Gene Regulation. *Front Cell Dev Biol* 9, 654682.
- Warren, J.S., Tracy, C.M., Miller, M.R., Makaju, A., Szulik, M.W., Oka, S.I., Yuzyuk, T.N., Cox, J.E., Kumar, A., Lozier, B.K., Wang, L., Llana, J.G., Sabry, A.D., Cawley, K.M., Barton, D.W., Han, Y.H., Boudina, S., Fiehn, O., Tucker, H.O., Zaitsev, A.V., and Franklin, S. (2018). Histone methyltransferase Smyd1 regulates mitochondrial energetics in the heart. *Proc Natl Acad Sci U S A* 115, E7871-E7880.
- Weighardt, F., Cobianchi, F., Cartegni, L., Chiodi, I., Villa, A., Riva, S., and Biamonti, G. (1999). A novel hnRNP protein (HAP/SAF-B) enters a subset of hnRNP complexes and relocates in nuclear granules in response to heat shock. *J Cell Sci* 112 (Pt 10), 1465-1476.
- Weis, K., Rambaud, S., Lavau, C., Jansen, J., Carvalho, T., Carmo-Fonseca, M., Lamond, A., and Dejean, A. (1994). Retinoic acid regulates aberrant nuclear localization of PML-RAR alpha in acute promyelocytic leukemia cells. *Cell* 76, 345-356.
- Wiedmann, B., Sakai, H., Davis, T.A., and Wiedmann, M. (1994). A protein complex required for signal-sequence-specific sorting and translocation. *Nature* 370, 434-440.
- Willis, M.S., Schisler, J.C., Portbury, A.L., and Patterson, C. (2009). Build it up-Tear it down: protein quality control in the cardiac sarcomere. *Cardiovasc Res* 81, 439-448.
- Wilson, V.G. (2017). Introduction to Sumoylation. *Adv Exp Med Biol* 963, 1-12.
- Xu, G., Liu, G., Xiong, S., Liu, H., Chen, X., and Zheng, B. (2015). The histone methyltransferase Smyd2 is a negative regulator of macrophage activation by suppressing interleukin 6 (IL-6) and tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) production. *J Biol Chem* 290, 5414-5423.
- Xu, S., Wu, J., Sun, B., Zhong, C., and Ding, J. (2011). Structural and biochemical studies of human lysine methyltransferase Smyd3 reveal the important functional roles of its post-SET and TPR domains and the regulation of its activity by DNA binding. *Nucleic Acids Res* 39, 4438-4449.
- Yang, F., Zhou, S., Wang, C., Huang, Y., Li, H., Wang, Y., Zhu, Z., Tang, J., and Yan, M. (2017). Epigenetic modifications of interleukin-6 in synovial fibroblasts from osteoarthritis patients. *Sci Rep* 7, 43592.
- Yao, R.W., Wang, Y., and Chen, L.L. (2019). Cellular functions of long noncoding RNAs. *Nat Cell Biol* 21, 542-551.

- Ye, X., Qian, Y., Wang, Q., Yuan, W., Mo, X., Li, Y., Jiang, Z., Xu, W., Deng, Y., Wan, Y., Fan, X., Wu, X., and Wang, Y. (2016). SMYD1, an SRF-Interacting Partner, Is Involved in Angiogenesis. *PLoS One* 11, e0146468.
- Yi, X., Jiang, X.J., and Fang, Z.M. (2019). Histone methyltransferase SMYD2: ubiquitous regulator of disease. *Clin Epigenetics* 11, 112.
- Yoshida, K., Nogami, S., Satoh, S., Tanaka-Nakadate, S., Hiraishi, H., Terano, A., and Shirataki, H. (2005). Interaction of the taxilin family with the nascent polypeptide-associated complex that is involved in the transcriptional and translational processes. *Genes Cells* 10, 465-476.
- Yotov, W.V., Moreau, A., and St-Arnaud, R. (1998). The alpha chain of the nascent polypeptide-associated complex functions as a transcriptional coactivator. *Mol Cell Biol* 18, 1303-1311.
- Yotov, W.V., and St-Arnaud, R. (1996). Differential splicing-in of a proline-rich exon converts alphaNAC into a muscle-specific transcription factor. *Genes Dev* 10, 1763-1772.
- Yuan, H., and Marmorstein, R. (2013). Histone acetyltransferases: Rising ancient counterparts to protein kinases. *Biopolymers* 99, 98-111.
- Zhang, X., Hamblin, M.H., and Yin, K.J. (2017). The long noncoding RNA Malat1: Its physiological and pathophysiological functions. *RNA Biol* 14, 1705-1714.
- Zhang, X., Yang, Z., Khan, S.I., Horton, J.R., Tamaru, H., Selker, E.U., and Cheng, X. (2003). Structural basis for the product specificity of histone lysine methyltransferases. *Mol Cell* 12, 177-185.

6. Danksagung

7. Eidesstattliche Erklärung

§ 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, dass - weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde, - die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden, - mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist. Ich erkläre ferner, dass mir die Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis bekannt ist und ich mich zur Einhaltung dieser Satzung verpflichte.

Berlin, den 15.11.22

Dr. rer.nat. Janine Berkholz