

Aus dem Institut für Physiologie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**PML und Smyd1: potentielle Mediatoren chronischer Gefäßerkrankungen**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Samuel Becker  
.....

Datum der Promotion: 26.06.2022

# Inhaltsverzeichnis

1.1 Zusammenfassung .....	4
1.2 Abstract.....	5
2. Einführung/Forschungsstand.....	6
2.1. Pathomechanismen chronischer Gefäßerkrankungen .....	6
2.2. Smyd1.....	6
2.3. SUMOylierung .....	7
2.4. PML und PML-NBs.....	8
2.5. Ziele der Arbeit .....	8
3. Material und Methodik .....	9
3.1. Morphometrische Analyse elektronenmikroskopischer Aufnahmen .....	9
3.2. Zellkultur .....	10
3.3. Zellstimulierung mit Zytokinen.....	10
3.4. Zellexperimente mit MG132 oder Cycloheximid.....	10
3.5. Transfektion mit Expressionsvektoren .....	10
3.6. Transfektion spezifischer siRNA .....	11
3.7. Immunblotting .....	11
3.8. Immunzytochemie .....	11
3.9. Statistische Analyse .....	12
4. Ergebnisse .....	12
4.1 Diabetes Mellitus und arterielle Hypertonie äußern sich in phänotypischer Veränderung der perikapillären Basalmembran im Skelettmuskel .....	12
4.2. PML wird vermehrt in atherosklerotischen Plaques exprimiert .....	13
4.3. Smyd1 ko-lokalisiert mit PML in menschlichen Endothelzellen. ....	14
4.4. SUMOyliertes Smyd1 wird in Endothelzellen vermehrt proteasomalem Abbau zugeführt.....	15
4.5. Wechselwirkung von Smyd1 und PML in menschlichen Endothelzellen.....	17
4.6. TNF- $\alpha$ oder IFN- $\gamma$ regulieren die Smyd1 Konzentration in Endothelzellen .....	18
5. Diskussion.....	19
6. Literaturverzeichnis.....	23
7. Eidesstattliche Versicherung .....	29
8. Anteilserklärung an den erfolgten Publikationen.....	30
9. Druckversion der ersten Publikation.....	32

10. Druckversion der zweiten Publikation .....	47
11. Druckversion der dritten Publikation.....	65
12. Lebenslauf .....	84
13. Liste aller Publikationen.....	86
14. Danksagung.....	87

# 1.1 Zusammenfassung

Die meisten Todesfälle weltweit sind auf chronische Herz-Kreislaufkrankungen, insbesondere die Arteriosklerose zurückzuführen. Funktionseinschränkungen des Endothels spielen im Rahmen systemischer Erkrankungen wie Diabetes Mellitus Typ 2 und arterielle Hypertonie für Entstehen und Fortschreiten atherosklerotischer Veränderungen eine zentrale Rolle. Davon sind nicht nur die Endothelzellen selbst, sondern ebenso die Interaktion mit ihrer unmittelbaren Umgebung betroffen. In der vorliegenden Arbeit wurden endotheliale Funktionseinschränkungen unter Verwendung struktureller und molekularer Methoden in drei Teilprojekten charakterisiert:

1. Durch morphometrische Analyse elektronenmikroskopischer Bilder wurde gezeigt, dass Kapillaren der Skelettmuskulatur eine diskontinuierliche proteolytische Auflösung der Basalmembran zwischen Endothel und Perizyten bei Patienten mit Diabetes Mellitus aufweisen.
2. Mittels vergleichendem Immunblotting wurde nachgewiesen, dass das PML-Protein in Plaque-haltigen Segmenten humaner Koronararterien deutlich höher konzentriert ist als in nicht-Plaque-haltigen Segmenten.
3. In Endothelzellen wurde mit einander ergänzenden Methoden eine molekulare Interaktion zwischen Smyd1 und PML belegt. Diese Wechselwirkung basierte auf einer PML-vermittelten posttranslationalen Modifikation, der SUMOylierung von Smyd1. Die SUMOylierte Form von Smyd1 wurde vermehrt dem proteasomalen Abbau zugeführt. Umgekehrt kam es in Smyd1-überexprimierenden Endothelzellen zu erhöhten PML-Konzentrationen und größeren sowie zahlreicheren PML-Kernkörperchen (PML-NBs). Folglich bestand ein selbstregulierendes Gleichgewicht zwischen Smyd1-induzierter PML-Expression und PML-vermitteltem Abbau von Smyd1. Dieses Gleichgewicht konnte durch Inkubation der Endothelzellen mit TNF- $\alpha$  oder IFN- $\gamma$  in spezifischer Weise verschoben werden: Mit TNF- $\alpha$ -stimulierte Zellen enthielten mehr Smyd1 und weniger PML, während IFN- $\gamma$  in den Endothelzellen (ECs) mehr und größere PML-NBs induzierte, wodurch SUMOyliertes Smyd1 vermehrt dem proteasomalen Abbau zugeführt wurde. Das PML-Smyd1-Modul ist folglich auf der Ebene der posttranslationalen und der epigenetischen Regulationsmechanismen in die Reaktion des Endothels auf Entzündungsmediatoren einbezogen.

## 1.2 Abstract

Most deaths worldwide are due to chronic cardiovascular disease, especially arteriosclerosis. Functional restrictions of the endothelium play a central role in the development and progression of atherosclerotic changes in the context of systemic diseases such as type 2 diabetes mellitus and arterial hypertension. This affects not only the endothelial cells themselves, but also the interaction with their immediate environment. In the present work, endothelial functional restrictions were characterized using structural and molecular methods in three sub-projects:

1. By morphometric analysis of electron microscopic images it was shown that capillaries of the skeletal muscles exhibit a discontinuous proteolytic dissolution of the basement membrane between the endothelium and pericytes in patients with diabetes mellitus.
2. Using comparative immunoblotting it was demonstrated that the PML protein is significantly more concentrated in plaque-containing segments of human coronary arteries than in non-plaque-containing segments.
3. A molecular interaction between Smyd1 and PML was demonstrated in endothelial cells using complementary methods. This interaction was based on a PML-mediated post-translational modification, the SUMOylation of Smyd1. The SUMOylated form of Smyd1 was increasingly used for proteasomal degradation. Conversely, in Smyd1-overexpressing endothelial cells PML concentrations were increased accompanied by larger and more numerous PML nuclear bodies (PML-NBs). Consequently, there was a self-regulating balance between Smyd1-induced PML expression and PML-mediated degradation of Smyd1. This equilibrium could be shifted in a specific way by incubating the endothelial cells with TNF- $\alpha$  or IFN- $\gamma$ : cells stimulated with TNF- $\alpha$  contained more Smyd1 and less PML, while IFN- $\gamma$  induced more and larger PML-NBs in endothelial cells (ECs), resulting in enhanced SUMOylation of Smyd1, which lowered the total Smyd1 Concentration due to its increased proteasomal degradation. The PML-Smyd1 module is therefore involved in the reaction of the endothelium to inflammatory mediators at the level of post-translational and epigenetic regulatory mechanisms.

## 2. Einführung/Forschungsstand

### 2.1. Pathomechanismen chronischer Gefäßerkrankungen

Ischämische Komplikationen chronischer Blutgefäßerkrankungen stellen weltweit mit Abstand die häufigste Todesursache dar [1]. Das physiologische Zusammenspiel des Endothels mit der abluminalen kontraktiven glatten Muskulatur beziehungsweise den Perizyten bildet die Grundlage einer bedarfsadaptierten Perfusion der einzelnen Gewebe. Endothelzellen stellen nicht nur ein Interface für die Nährstoffversorgung und den Gasaustausch zwischen Blut und Gewebe dar, sie sind auch entscheidend an der Vermittlung von immunologischen und regenerativen Prozessen beteiligt [2].

Ausbleibende oder überschießende Anpassungsmechanismen der Endothelzellen sind oft grundlegend an der Entstehung von pathologischen Veränderungen beteiligt [3]. Das Verständnis der bisher unvollständig aufgeklärten Pathomechanismen von komplexen endothelialen Funktionsstörungen wird dabei sowohl durch ein breites Spektrum morphologischer als auch biomolekularer Untersuchungen ständig erweitert [4].

Gerade in Bezug auf klinisch apparente Veränderungen der Gefäße bei Atherosklerose [5] sowie des glomerulären Filtrationsapparates der Niere [6] und des retinalen Kapillarnetzes [7] bei Diabetes Mellitus konnten die Rolle des Endothels an den Entstehungsmechanismen vaskulärer Pathologien abgeleitet werden. Zudem gibt es vielfältige Hinweise darauf, dass die glatte Muskulatur ebenfalls beim Fortschreiten atherosklerotischer Gefäßveränderungen beteiligt ist [8].

Da jedoch bisher keine allgemeingültigen Pathomechanismen die einzelnen makro- und mikrovaskulären Veränderungen beschreiben, sind weitere gewebespezifische Untersuchungen auf struktureller und molekularer Ebene unabdingbar [1,9,10].

### 2.2. Smyd1

In den vergangenen Jahrzehnten wurde Smyd1 nicht nur eine wichtige Rolle bei der embryonalen Genese der quergestreiften und kardialen Muskulatur [11], sondern auch bei der Regulation von Genen zugesprochen, welche an Entzündungsreaktionen, dem Zellstoffwechsel und der Zellmigration beteiligt sind [12,13]. Als Smyd1 kürzlich in ECs nachgewiesen wurde, konnte zudem ein Einfluss von Smyd1 auf die Angiogenese über eine Interaktion mit dem Serum Response Factor (SRF) belegt werden [14].

Smyd1 besteht, wie die vier übrigen Mitglieder der Smyd-Proteinfamilie, aus einer sogenannten SET-Domäne, welche durch eine MYND-Domäne gesplittet ist [15]. Dieser Einschub der MYND-Domäne beeinträchtigt die Funktion der SET-Domäne nicht, welche den Transfer von Methylgruppen an Lysinreste von Histonen katalysiert, und somit an epigenetischen Regulationsprozessen beteiligt ist [12]. Die MYND-Domäne ermöglicht Smyd1 durch ihr Zinkfinger-Motiv Interaktionen mit anderen Proteinen [16].

Ungeklärt blieb bisher jedoch, wie diese Smyd1-vermittelten Effekte situationsadaptiert reguliert werden. Erste Hinweise hierzu lieferten Berkholz et al. im Jahr 2014 [17], als sie zeigen konnten, dass Smyd1 posttranslational durch SUMOylierung modifiziert wird und dadurch die Translokation von Smyd1 aus dem Zellkern ins Zytosol zusammen mit seinem muskelspezifischen Interaktionspartner skNAC ausgelöst wird. Untermauert wurde dieser Befund durch den Nachweis eines Konsensus Motivs für SUMOylierungen - LKDD - in der Aminosäuresequenz von Smyd1 [17].

### 2.3. SUMOylierung

Die Familie der Small Ubiquitin-like Modifier (SUMO) besteht aus drei jeweils ca. 100 Aminosäuren langen Proteinen. Durch ihre Bindung an nukleäre wie auch zytosolische Proteine regulieren sie den Ablauf biologischer Prozesse wie Zellteilung, intrazellulären Transport, DNA-Reparatur, Zellstoffwechsel und Signalwege [18]. Die einzelnen Mitglieder der SUMO Familie unterscheiden sich beispielsweise durch ihre Fähigkeit Polymere zu bilden: SUMO1 bildet dabei primär Monomere, während sich die in ihrer Sequenz fast identischen Varianten 2 und 3 miteinander zu SUMO-Polymeren verbinden können.

An der kovalenten Bindung von SUMO an ein Protein, auch SUMOylierung genannt, sind drei Enzyme (E1-3) beteiligt. Dabei wird SUMO zunächst aktiviert (E1), in einem zweiten Schritt konjugiert (E2) und schließlich durch eine SUMO-E3-Ligase, wie zum Beispiel PML, an das entsprechende Protein gebunden [19]. SUMO-spezifische Proteasen können diese Bindungen wieder auflösen, ein Vorgang der als DeSUMOylierung bezeichnet wird, wodurch sich ein Gleichgewicht zwischen freiem und proteingebundenem SUMO einstellt [19].

Neben Veränderungen der intrazellulären Lokalisation oder der Komplexbildung mit Interaktionspartnern kann SUMOylierung auch die Stabilität eines Proteins beeinflussen, wenn letzteres im weiteren Verlauf durch SUMO-targeted Ubiquitin Ligasen (STUbL) dem Ubiquitin/Proteasom-System zugeführt wird [20].

SUMO kann auch nicht-kovalente Bindungen mit anderen Proteinen über sogenannte SUMO-Interactive-Motifs (SIMs) eingehen. SIMs zeichnen sich durch einen hydrophoben Kern aliphatischer Aminosäuren aus, welche meist von negativ geladenen Aminosäuren flankiert werden und mit einer Domäne aus ebenfalls hydrophoben Aminosäuren von SUMO interagieren [21]. SUMOylierte Proteine können ebenfalls über diesen Mechanismus IM-haltige Proteine erkennen und rekrutieren [21].

Ein exemplarischer Ort, an dem SUMOylierte Proteine über SIMs Aggregate formen, stellen PML-Kernkörperchen (PML-NBs) dar [22]. PML-NBs sind Domänen des Zellkerns, welche nach SUMOylierung des namensgebenden PML-Proteins mit dessen eigener SIM sphärische Hüllstrukturen ausbilden [22]. In diesen hochdynamischen Proteinkomplexen werden alle Faktoren zusammengeführt, die eine adaptive Regulation einzelner Zellprozesse durch die posttranslationale Modifikation der SUMOylierung ermöglichen: SUMO selbst, die SUMO-Ligasen E1-3 und natürlich eine Vielzahl von Zielproteinen [22].

## 2.4. PML und PML-NBs

Es existieren sieben Isoformen von PML, welche durch alternatives Spleißen am C-terminalen Ende entstehen [22,23]. Alle Isoformen enthalten eine RBCC Domäne, welche die SUMO-E2 Ligase UBC9 an den darin enthaltenen RING-Finger binden kann [24]. Basierend darauf konnte zudem für die am besten erforschte Isoform PML-IV eine SUMO E3-Ligase Aktivität nachgewiesen werden [24].

PML-NBs lassen sich in jedem Zelltyp nachweisen und verändern unter oxidativem oder inflammatorischem Stress ihre Anzahl und Größe, wobei die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen nicht vollständig geklärt sind [23]. Innerhalb der PML-NB wird die Aktivität, Lokalisation und Stabilität von über 100 verschiedenen Proteinen durch posttranslationale Modifikationen (PTMs), allen voran SUMOylierung, beeinflusst [22]. Hierfür wird teilweise von einer vorausgehenden Rekrutierung von mit SIM ausgestatteten Zielproteinen durch eine nicht-kovalente Bindung an SUMOyliertes PML ausgegangen [21].

Durch PTMs sind PML und SUMO an der Regulation vieler dynamischer, zellulärer Prozesse wie Proliferation, DNA-Reparatur und Inflammation beteiligt [23].

Das Voranschreiten chronischer Gefäßpathologien wie Atherosklerose basiert neben dem von luminal ausgehenden erhöhten oxidativen Stress, wie er beispielsweise durch Hyperglykämie hervorgerufen wird, ebenfalls auf kontinuierlichen immunologischen Prozessen und Entzündungsreaktionen [25]. Diese werden unter anderem durch die Freisetzung der inflammatorischen Zytokine Tumornekrosefaktor alpha (TNF- $\alpha$ ) und Interferon gamma (IFN- $\gamma$ ) aus den in Plaques eingewanderten Makrophagen von abluminal her mit verursacht [25]. Eine Untersuchung einer Beteiligung von PML, SUMO und Smyd1 an der Reaktion des Endothels und der vaskulären glatten Muskulatur auf derartige Reize könnte den Weg für neue therapeutische Ansätze bahnen.

## 2.5. Ziele der Arbeit

In dieser Arbeit sollen verschiedene Ansätze verfolgt werden, um das Verständnis für gewebespezifische Pathomechanismen bei chronischen Gefäßerkrankungen auszubauen. Insbesondere soll untersucht werden, ob sich Smyd1, PML und SUMO als neue Mediatoren den hierbei beteiligten inflammatorischen Signalwegen zuordnen lassen. Hierfür wurden fünf Ziele definiert:

1. Einleitendes Ziel der Arbeit ist das differenzierte Betrachten und Erkennen struktureller Veränderungen in Kapillaren quergestreifter Muskulatur im Rahmen systemischer Erkrankungen durch eine morphometrische Analyse elektronenmikroskopischer Aufnahmen durch aktive Mitarbeit an einem Projekt definiert (Baum et al., 2020 [26]).

2. Das zweite Ziel der Arbeit ist die Analyse der Expressionsmuster von PML in atherosklerotischen Plaques. Die dafür durchgeführten Versuche sind Teil eines Projektes,

welches PML mit dem Phänotyp-Switch glatter Muskelzellen in atherosklerotischen Herzkranzgefäßen assoziiert (Karle et al., 2021 [27]).

3. Das dritte und umfassendste Ziel wird in drei Schritten verfolgt: Zunächst soll untersucht werden, ob Smyd1 in Endothelzellen SUMOyliert und dadurch reguliert werden kann. Im Anschluss soll untersucht werden, ob die Histonmethyltransferase Smyd1 und PML in PML-Kernkörperchen interagieren und ob Smyd1 PML-abhängig SUMOyliert wird. Abschließend wird der Frage nachgegangen, ob und wie Smyd1, SUMO1 und PML auf Stimulation von Endothelzellen mit den inflammatorischen Zytokinen TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  reagieren. Die Ergebnisse dieser dritten Aufgabenstellung sind unter meiner Erstautorenschaft veröffentlicht worden (Becker et al., 2021 [31]).

## 3. Material und Methodik

### 3.1. Morphometrische Analyse elektronenmikroskopischer Aufnahmen

126 humane Muskelbiopsien des Musculus vastus lateralis (VL) waren im Rahmen fünf internationaler Studien entnommen und nach Fixierung mit 6.25% Glutaraldehyd-haltigem Puffer zu 5000 einzelnen elektronenmikroskopischen Bildern der Kapillaren verarbeitet worden [26,29,30,31,32,33].

Studie 1: Gesunde Probanden (n = 10), Muskelbiopsien wurden vor und nach 8 Wochen Ausdauertraining entnommen [29].

Studie 2: Bei gesunden Probanden (n = 12) wurden vor und nach 6 Monaten leichten Ausdauertrainings Muskelbiopsien durchgeführt. In den VL-Biopsien von sechs Teilnehmern wurde Angiogenese festgestellt (Angiogenese-Responder, AR), während bei den sechs anderen Teilnehmern eine angiogene Reaktion fehlte (Non-Angiogenese-Responder; NR) [30].

Studie 3: Patienten mit arterieller Hypertonie (aHT) (n = 10) und altersangepasste gesunde Kontrollpatienten (n = 9), Muskelbiopsien wurden vor und nach 8 Wochen Ausdauertraining entnommen [31].

Studie 4: Diabetes Mellitus Typ 2 (DMT2) Patienten (n = 10), Muskelbiopsien wurden vor und nach 8 Wochen Ausdauertraining entnommen [32].

Studie 5: Patienten mit peripherer arterielle Verschlusskrankheit (pAVK) im Frühstadium (n = 14) und gesunde Kontrollpersonen (n = 10). Drei der pAVK Patienten litten gleichzeitig an DMT2 und elf an aHT [33].

Die 42 gesunden Teilnehmer, welche eine Altersspanne von 23 bis 75 Jahren abdecken, bilden die Kontrollgruppen der vier Studien mit systemischen Gefäßpathologien.

Im Rahmen der Auswertung erfolgte die morphometrische Analyse des Endothels und der umliegenden Perizyten mit Fokus auf Form und Struktur der Basalmembran durch zwei unabhängige Forscher.

### 3.2. Zellkultur

Endothelzellen menschlicher Nabelschnurvenen (HUVEC) wurde nach Bewilligung durch das Ethikkomitee der Charité und schriftlicher Einwilligung der gesunden Mütter wie beschrieben [34] isoliert und in Endothelial Cell Growth Medium (PromoCell, Deutschland) kultiviert.

EA.hy926, C2C12 sowie H9C2 Zellen wurden in Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM) inkubiert, welches mit 10% Kälberserum (BSA) angereichert worden war. Die Differenzierung der proliferierenden C2C12 und H9C2 wurde ab einer Konfluenz von 70-80% durch Inkubation in DMEM mit 2% Pferdeserum induziert.

Glatte Muskelzellen aus menschlichen Koronararterien (HCASMCs) (Cell Applications, USA) wuchsen in Smooth Muscle Cell Growth Medium (Cell Applications, USA) und wurden ab einer Konfluenz von 80-90% für 5 Tage in Differentiation Medium (Cell Applications, USA) kultiviert. Die Brutschränke waren auf 37°C in befeuchteter Atmosphäre von 5% CO<sub>2</sub> eingestellt.

### 3.3. Zellstimulierung mit Zytokinen

EA.hy926 Zellen, HUVEC und HCASMC wurden bei allen Stimulationen mit IFN- $\gamma$  oder TNF- $\alpha$  (Peprotech, Deutschland) mit Konzentration von 100 ng/ml inkubiert. Die Zytokine wurden hierfür in PBS, pH 7,4 (ThermoFisher Scientific, USA) mit 1% BSA verdünnt. PBS mit 1% BSA diente als Negativkontrolle.

### 3.4. Zellexperimente mit MG132 oder Cycloheximid

MG132 (finale Konzentration: 10  $\mu$ M; SERVA, Deutschland) und Cycloheximid (finale Konzentration: 10  $\mu$ g/ml; Sigma-Aldrich, Deutschland) wurden in Dimethylsulfoxide (DMSO) gelöst und dem Medium hinzugefügt. DMSO in entsprechender Konzentration diente als Negativkontrolle.

### 3.5. Transfektion mit Expressionsvektoren

Transiente Transfektionen in EA.hy926 Zellen und HCASMC wurde mit Hilfe der Expressionsplasmide pEGFP-C1-PML-IV, PML3/pSG5, pCMV2-Smyd1-flag (Sino Biological, USA) und pCMV3-Smyd1-OFP (Sino Biological, USA), pcDNA3-Sumo1-Ha, pEGFP-SuPr1, pEGFP-SuPr1-C466S (SuPr1-inaktive Mutante), pcDNA3-UBC9-HA und des Turbofect Reagens (ThermoFisher Scientific, USA) unter Beachtung der Herstellervorgaben durchgeführt.

Zur Kontrolle der Transfektionsraten anhand der GFP- und OFP-Expression wurde ein Zeiss Axioskop 40-Mikroskop mit Neofluar-Objektiv 16/0.4 (Carl Zeiss, Deutschland) verwendet. Die semiquantitative Analyse der Transfektionseffizienz erfolgt mittels RT-qPCR und

Immunblotting. Negativkontrollen wurden durch Transfektion mit entsprechenden "leeren" Vektoren erstellt, welche keine spezifischen Gensequenzen beinhalteten.

### 3.6. Transfektion spezifischer siRNA

Die transiente Herunterregulation in EA.hy.926 Zellen erfolgte durch Transfektion mit spezifischer siRNA. Hierfür wurde das Interferin-Reagens (Polyplus Transfection, France) nach Angaben des Herstellers verwendet.

Für PML und Smyd1 wurde jeweils eine Kombination aus vier, gegen die PML oder Smyd1 Nucleotid-Sequenz gerichteten siRNA-Spezies in einer finalen Konzentration von 25 nM transfiziert. Ein Mix aus ungerichteten siRNAs diente als Negativkontrolle. Die Auswertung des Knockdowns erfolgte 24 Stunden nach Transfektion mittels Immunblotting.

### 3.7. Immunblotting

Lysate ganzer Zellen wurden unter Verwendung von RIPA-Puffer (Santa Cruz, USA) unter Zugabe von Protease-Inhibitoren (Sigma-Aldrich, Deutschland) und 20 mM N-Ethylmaleimid (Sigma-Aldrich, Deutschland) nach 15-minütiger Inkubation bei 4°C gesammelt.

Für die fraktionierte Zell Lyse in zytoplasmatische und nukleäre Anteile wurde das NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Kit (ThermoFisher Scientific, USA) nach Herstellerprotokoll angewendet.

Zur Immundetektion der einzelnen Proteine wurden folgende Antikörper verwendet:

anti-PML (1:1000, Novus Biologicals, Deutschland), anti-SUMO-1 (1:500, Elabscience, USA), anti-Smyd1 (1:100, H-300, Santa Cruz, Deutschland), anti-GAPDH (1:10000, Proteintech, United Kingdom), anti-Emerin (1:2000, Abcam, United Kingdom), anti- $\alpha$ -Tubulin (1:1000, Cell Signaling, Netherlands), anti- $\beta$ -Actin (1:2000, Sigma Aldrich, Deutschland), anti-Flag (1:1000, Sigma-Aldrich, Darmstadt, Deutschland), anti-HA (1:1000, Santa Cruz, Deutschland) und anti-GAPDH (1:10000, Proteintech, Vereinigtes Königreich).

Bilder der geblotteten Membranen wurden nach der Inkubation mit primärem und passendem Sekundär-Antikörper im Calvin-S-Entwickler (Biostep, Deutschland) aufgenommen und anschließend densitometrisch mit Hilfe von ImageJ analysiert. Dabei wurden die gemessenen Werte mit den zugehörigen Werten für GAPDH, alpha-Tubulin oder Emerin in Relation gesetzt.

### 3.8. Immunzytochemie

EA.hy.926 Zellen und HUVECs wurden mit 4% Paraformaldehyd auf Objektträgern fixiert. Die Koronargefäße wurden in 4% Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet, um aus ihnen 4  $\mu$ m dicke Schnitte herzustellen, die mit Hematoxylin-Eosin (HE) und Elastica-van-Gieson (EvG) gefärbt wurden.

Die Permeabilisierung der Zellmembranen erfolgte mit PBS, pH 7.4 welchem 0.5% Triton X-100 zugesetzt wurden folgende Primärantikörper wurden in einer Verdünnung von 1:100 eingesetzt: anti-PML, anti-Smyd1 und anti-SUMO1.

Als Negativkontrolle wurden nicht-spezifische primäre Antikörper der gleichen Spezies in gleicher Konzentration verwendet.

Es folgte die Inkubation mit Spezies-spezifischen Sekundärantikörper mit Alexa Fluor Konjugation (Life Technologies, USA) in einer Verdünnung von 1:1000.

Zur Darstellung der Zellkerne wurde 4',6-Diamidino-2-Phenylindole Dihydrochlorid (DAPI) (1:10.000, Merck, Darmstadt, Deutschland) hinzugefügt. Die Aufnahme der Fluoreszenz erfolgte mit einem konfokalen Lasermikroskop DMI 6000 von Leica. Dabei wurden 20x und 63x Ölimmersions-Objektive verwendet. Die Verarbeitung der digitalen Bilder erfolgte mit der Leica LAS AF Lite Software.

### 3.9. Statistische Analyse

Die erhobenen Daten wurden mit der SigmaPlot 13.0 Software analysiert. Zunächst wurden die Normalverteilung und Varianzhomogenität der Daten anhand des Shapiro-Wilk Tests und des Brown-Forsythe Tests untersucht. Bei den morphometrischen Datensätzen erfolgte dieser Schritt anhand des Kolmogorow-Smirnow-Lilliefors-Tests sowie des Shapiro-Wilk Tests. One way-ANOVA und Tukey-Test wurden zur Bewertung der statistischen Unterschiede der Gruppen angewandt. Die statistische Signifikanz wurde bei allen Tests als gegeben festgelegt, wenn  $p < 0.05$ .

Die Ergebnisse wurden als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung ( $n \geq 3$ ) dargestellt.

## 4. Ergebnisse

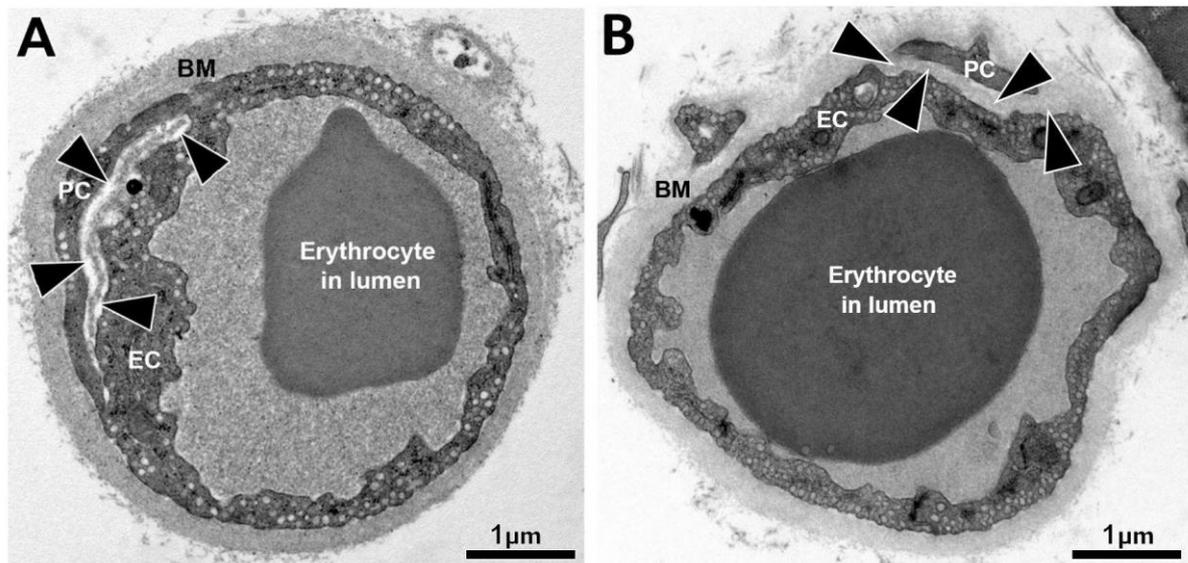
### 4.1 Diabetes Mellitus und arterielle Hypertonie äußern sich in phänotypischer Veränderung der perikapillären Basalmembran im Skelettmuskel

In einem ersten Projekt sollte untersucht werden, ob sich die perikapilläre Basalmembran in Skelettmuskeln von verschiedenen Patientengruppen basierend auf ihrer Grunderkrankung kontinuierlich verändert und welche Effekte sich dahingehend nach körperlichem Training beobachten lassen. Die Analyse der 5000 Kapillaren erfolgte semiquantitativ. Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurde herausgefunden, dass sich die Basalmembranen im Bereich zwischen Perizyten und der abluminalen Seite der kapillären Endothelzellen in den Biopsien der Patienten mit Diabetes Mellitus ( $p < 0,01$ ) oder arterieller Hypertonie ( $p < 0,05$ ) im Vergleich zu den gesunden Probanden vermehrt proteolytisch aufgelöst darstellten, während die Kapillaren in den Biopsien der Patienten mit Claudicatio intermittens hierbei keine

signifikanten

Unterschiede

aufwiesen.



Elektronenmikroskopische Aufnahmen humaner Kapillaren aus VL Biopsien. **A:** proteolytisch aufgelöste Basalmembran (BM) (schwarze Pfeile) zwischen Endothelzelle (EC) und Perizyt (PC). **B:** unveränderte Basalmembran (BM) zwischen EC und PC.

Aus Baum et al, Fig. 1 [26].

Nach körperlichem Training wurde interessanterweise ausschließlich bei den Gruppen mit Diabetes oder Hypertonie eine Zunahme diskontinuierlicher Basalmembranen beobachtet, in allen anderen Gruppen konnten hierbei keine signifikanten Unterschiede ( $p < 0,05$ ) festgestellt werden [siehe Tabelle 2, Baum et al [27]].

#### 4.2. PML wird vermehrt in atherosklerotischen Plaques exprimiert

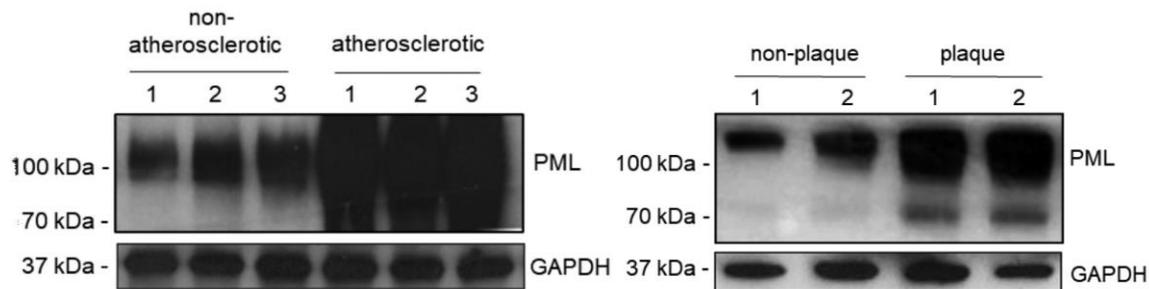
In einem weiteren Projekt wurde das Expressionsmuster des bereits mit vielen inflammatorischen Prozessen assoziierten PML-Proteins in chronisch veränderten Herzkranzgefäßen untersucht.

Hierzu wurden aus 16 im Rahmen von Transplantationen entnommenen menschlichen Herzen jeweils eine Koronararterie untersucht. Sieben dieser Patienten litten an ischämischer Herzinsuffizienz in Folge von atherosklerotischen Herzkranzgefäßen. Die anderen neun Patienten waren aufgrund einer dilatativen Kardiomyopathie (DCM) transplantiert worden [siehe Tabelle 1, Karle et al [27]].

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurde die Konzentration des PML-Proteins in Lysaten dieser Gefäße per Immunblot bestimmt. Dabei wurde eine 2,2-fach ( $p < 0,001$ ) höhere Konzentration an PML in den Lysaten atherosklerotisch veränderter Arterien nachgewiesen als in den nicht durch Atherosklerose betroffenen Arterien der DCM-Patienten [siehe Fig. 1A/C, Karle et al [27]].

Nach Aufteilung von sechs der atherosklerotischen Arterien in Plaque-haltige und Plaque-freie Anteile ergab die Quantifizierung von PML mittels Immunblot in den Plaque-haltigen Segmenten eine 3,3-fach ( $p < 0,001$ ) höhere PML-Konzentrationen als in den Plaque-freien

Arealen [siehe Fig. 1C/D, Karle et al [27]]. Das in den folgenden Abbildungen erkennbare Spektrum PML-positiver Banden unterschiedlicher Molekulargröße lässt sich auf verschiedene Isoformen von PML zurückzuführen.



Immunblots von Lysaten aus koronaren Herzkranzgefäßen. **Links:** Aufteilung in nicht-atherosklerotische Gefäße (Dilatative Kardiomyopathie) und atherosklerotische Gefäße (Ischämische Kardiomyopathie). **Rechts:** Aufteilung in Plaque-haltige und Plaque-freie Segmente atherosklerotischer Koronararterien.

Aus Karle et al, Fig. 1C/D [27].

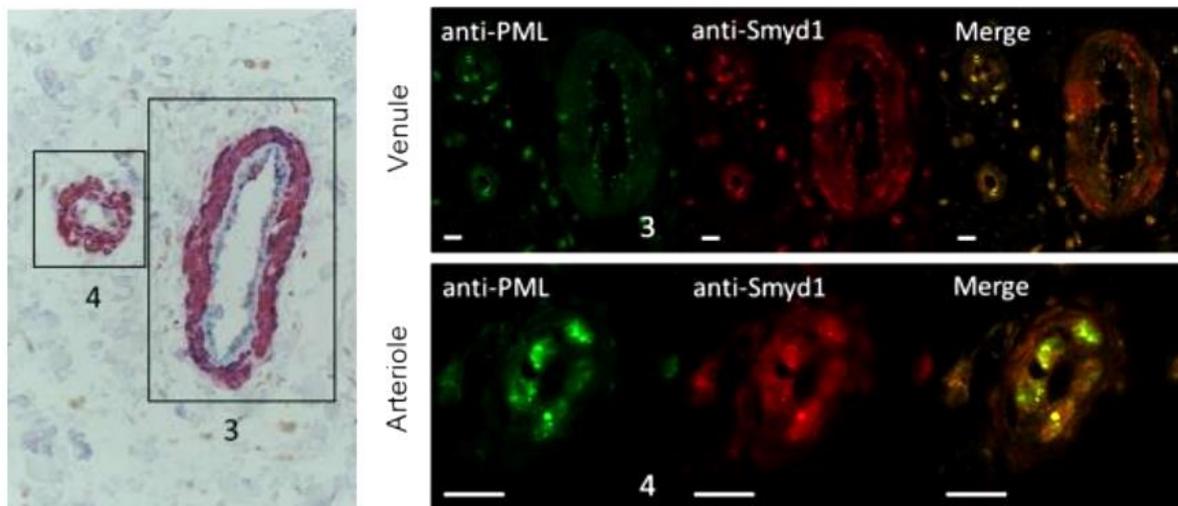
#### 4.3. Smyd1 ko-lokalisiert mit PML in menschlichen Endothelzellen.

Im dritten Projekt der vorliegenden Dissertation sollte zunächst die Interaktion von PML und Smyd1 in Endothelzellen untersucht werden. Da die Expression von Smyd1 bisher vornehmlich in Muskelzellen untersucht wurde, erfolgte initial eine vergleichende Erfassung der Smyd1-Proteinkonzentrationen in ECs (HUVEC, EA.hy926) und Muskelzellen (HCASMC, C2C12, H9C2).

Die dafür durchgeführten Immunblots ergaben ähnlich kräftige Banden für Smyd1 bei 54 kDa in ECs, HCASMCs sowie in den differenzierten C2C12 und H9C2 Zellen. In den proliferierenden C2C12 und H9C2 Zellen wurde im Vergleich dazu weniger Smyd1 nachgewiesen. Interessanterweise zeigte sich hierbei eine weitere, Smyd1-positive Bande bei 64 kDa in allen untersuchten Muskelzelltypen [siehe Fig 1B, Becker et al [28]].

Es folgte anschließend eine Analyse der intrazellulären Verteilung von Smyd1 in ECs per Immunzytochemie. Dabei zeigten sich in EA.hy926 Zellen und HUVECs Fluoreszenzsignale für Smyd1 sowohl im Zytosol als auch intranukleär. Letztere präsentierte sich in einem charakteristischen Muster, welches sich typischerweise auch bei der Immunfluoreszenzfärbung von PML-NBs zeigt.

Basierend auf dieser Beobachtung erfolgte eine parallele Immunfärbung von PML und Smyd1 in den untersuchten Endothelzelllinien. Dabei konnte eine räumliche Beziehung von Smyd1 zu PML-NBs durch kongruente Signale für Smyd1 und PML innerhalb des Zellkerns nachgewiesen werden [siehe Fig 1C/D, Becker et al [28]]. Durch die entsprechenden Immunfärbungen einer koronaren Arteriole und Venole erfolgte ebenfalls der Nachweis der Ko-lokalisation von Smyd1 und PML *ex vivo* [siehe Suppl. Fig S1, Becker et al [28]].



HE Färbung einer Arteriole und Venole menschlicher Herzkranzgefäße (links) sowie Immunfluoreszenz von PML und Smyd1 desselben Schnittes (rechts oben/unten).  
Aus Becker et al [28].

#### 4.4. SUMOyliertes Smyd1 wird in Endothelzellen vermehrt proteasomalem Abbau zugeführt

Da PML-NBs wie eingangs beschrieben Plattformen für SUMOylierungsreaktionen darstellen können [22,23], schien es plausibel, dass Smyd1 während seines "Aufenthaltes" in PML-NBs ebenfalls dieser posttranslationalen Modifikation unterzogen wird.

Diesbezüglich konnte im Rahmen des dritten Projektes der vorliegenden Arbeit von Forschern der Arbeitsgruppe durch Anwendung von Ko-Immünpräzipitationen sowie bioinformatischen Analysen mittels molekularer Dockingstudien gezeigt werden, dass Smyd1 und SUMO1 in ECs eine stabile kovalente Verbindung miteinander eingehen können.

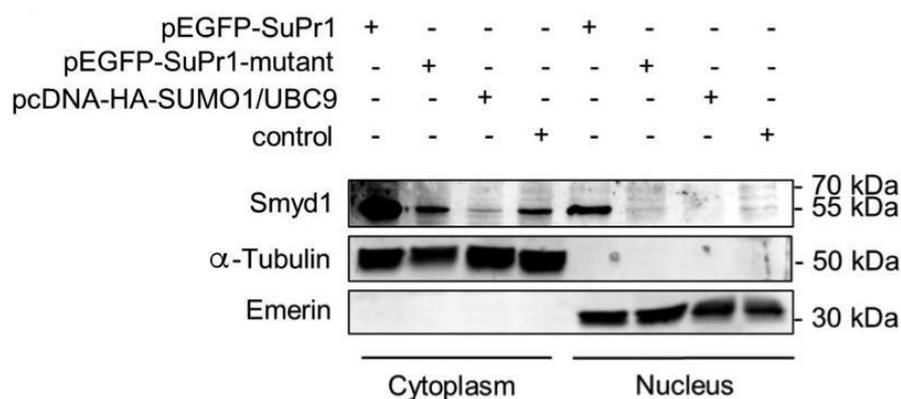
Um die Effekte einer derartigen Verbindung auf die Expression von Smyd1 in ECs zu untersuchen, wurden EA.hy926 Zellen mit den verschiedenen Expressionsvektoren transfiziert. Zum einen wurde ein Vektor verwendet, der für die SUMO1 Protease SuPr1 codiert. Um unspezifische Effekte durch die Transfektion von SuPr1 abgrenzen zu können, wurden Expressionsplasmide einer inaktiven SuPr1-Mutante transfiziert, welche keine Proteaseaktivität aufweist. Zum anderen wurde in einem weiteren Ansatz durch eine Kombination der Vektoren für SUMO1 und UBC9 ein erhöhtes Angebot der an SUMOylierungen beteiligten Faktoren bereitgestellt, um die Anzahl dieser PTM unspezifisch zu steigern. UBC9 stellt dabei als einzige bekannte SUMO E2-Ligase des menschlichen Körpers einen restriktiven Faktor der maximal möglichen Anzahl von SUMOylierungsreaktionen pro Zeiteinheit dar. Als Kontrollansätze dienten EA.hy926 Zellen, welche einen Vektor ohne spezifisches Gen erhalten hatten.

Es folgte eine semiquantitative Analyse der gewonnenen Zelllysate mittels Immunblots.

Dabei zeigten sich in den mit SuPr1 transfizierten Zelllysaten im Vergleich zu den anderen Zelllysaten, erhöhte Smyd1 Proteinkonzentrationen [siehe Fig 3B, Becker et al [28]]. Basierend darauf lässt sich als erste Annahme eine Beeinflussung der Stabilität des Smyd1-Proteins durch SUMOylierung ableiten.

Veränderungen der zellulären Lokalisation von Smyd1 durch dessen SUMOylierung wurden bereits in Muskelzellen beschrieben [17]. Um einen derartigen Effekt auf Smyd1 in ECs zu untersuchen, wurden EA.hy926 Zellen wie oben beschrieben transfiziert und nach 24 Stunden in zytosolische und nukleäre Lysate subfraktioniert.

Dabei wurden sowohl im Zytosol als auch im Zellkern von mit SuPr1 transfizierten Zellen erhöhte Proteinkonzentrationen von Smyd1 im Vergleich zu den Zellen, welche die funktionslose SuPr1 Mutante oder den Kontrollvektor erhalten hatten, nachgewiesen [siehe Fig 3C, Becker et al [28]]. Passend zur Hypothese der negativen Beeinflussung der Stabilität von Smyd1 durch SUMOylierung, zeigte sich hierbei zudem im Vergleich mit den anderen Zellen in den SUMO1/UBC9 transfizierten Zellen eine erniedrigte Konzentration von Smyd1 in der zytosolischen Fraktion.



Immunblot zytosolischer und nukleärer Lysate von EA.hy926 Zellen, die mit den angegebenen Expressionsplasmiden transfiziert wurden. Der Nachweis der erfolgreichen Zellfraktionierung erfolgte durch das Zytosol spezifische Haushaltsgen alpha-Tubulin beziehungsweise dem Zellkern-spezifischen Haushaltsgen Emerin . Aus Becker et al, Fig 3C [28].

Es folgte eine vertiefende Analyse zugrundeliegender Mechanismen der SUMOylierungs-abhängigen Stabilität von Smyd1. Hierfür wurden EA.hy926 Zellen zunächst mit SuPr1 transfiziert. Kontrollzellen erhielten einen Vektor ohne spezifisches Gen. Um festzustellen, ob die gesteigerte Smyd1-Konzentration nach Transfektion von SuPr1 auf einer gesteigerten Translation basiert, wurde 24 Stunden nach der Transfektion die Proteinsynthese durch Hinzufügen von Cycloheximid (CHX) blockiert. In den nach sechs weiteren Stunden gewonnenen Lysaten der mit SuPr1 transfizierten Zellen wurden trotz Cycloheximidbehandlung höhere Smyd1-Proteinmengen festgestellt als in den Lysaten jener Zellen, die den leeren Kontrollvektor erhalten hatten [siehe Fig 3D, Becker et al [28]]. Dadurch

konnte ein Einfluss der Translation auf die im Rahmen der von SuPr1-abhängigen DeSUMOylierung erhöhten Proteinkonzentration von Smyd1 ausgeschlossen werden.

Die Kinetik von Smyd1 wurde anschließend bezüglich potentieller Abbaumechanismen untersucht, indem EA.hy926 Zellen mit dem Proteasom-Inhibitor MG132 über einen Zeitraum von 3 Stunden inkubiert wurden. Dabei zeigten sich in Immunblots bereits nach der ersten Stunde erhöhte Smyd1-Konzentrationen.

Interessanterweise wurde durch die experimentelle Blockade des Proteasoms mittels MG132 eine zusätzliche Bande für Smyd1 bei etwa 64 kDa hervorgerufen [siehe Fig 3E, Becker et al [28]], passend zu jener, die in den initial untersuchten Muskelzellen nachgewiesen wurde [siehe Fig 1B, Becker et al [28]].

Da die Differenz von 12 kDa zur molekularen Masse von Smyd1 von 52 kDa der molekularen Massen von SUMO1 entspricht, wurde angenommen, dass es sich bei dieser zusätzlichen Bande um SUMOyliertes Smyd1 handelt.

Um diese Hypothese unter erhöhtem SUMO1-Angebot zu überprüfen, wurden EA.hy926 Zellen mit einem SUMO1-Expressionsplasmid oder einem leeren Kontrollvektor transfiziert. Nach 24 Stunden wurde durch Zugabe von MG132 der proteasomale Abbau blockiert. In den nach 3 Stunden gewonnenen Zelllysaten der mit SUMO1 transfizierten Zellen konnte dabei im Vergleich zu den Kontrollzellen eine verdickte Bande bei 64 kDa festgestellt werden, welche folglich auf SUMOyliertes Smyd1 zurückzuführen ist [siehe Fig 3F, Becker et al [28]]. Rekapitulierend lässt sich festhalten, dass zum einen die DeSUMOylierung von Smyd1 durch SuPr1 zu einer erhöhten Smyd1 Konzentration ohne Steigerung der Proteinsynthese führt. Zum anderen lässt sich die im Rahmen der Transfektion von SUMO1 und UBC9 beobachtete Depletion von SUMOyliertem Smyd1 durch Blockade des Proteasoms verhindern. Zusammengefasst deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass Smyd1 in seiner SUMOylierten Form stärker dem proteasomalen Abbau zugeführt wird als in seiner nicht-SUMOylierten Form.

#### 4.5. Wechselwirkung von Smyd1 und PML in menschlichen Endothelzellen

Mit Hilfe von Ko-Immünpräzipitationsexperimenten konnten Mitglieder der Arbeitsgruppe einen Einfluss auf die Konzentration von SUMOyliertem Smyd1 nach transientem Knockdown mit PML spezifischer siRNA nachweisen.

Um der möglichen Beeinflussung der Expression von Smyd1 je nach Angebot von PML nachzugehen, wurden EA.hy926 Zellen nach Transfektion eines PML-IV-Expressionsplasmids, PML-spezifischer siRNA oder eines entsprechenden Kontrollvektors bezüglich der Expression von Smyd1 analysiert. Dabei zeigten PML-überexprimierenden Zellen niedrigere und mit PML-siRNA-transfizierte Zellen höhere Smyd1-Proteinkonzentrationen [siehe Fig 4K/M, Becker et al [28]].

In Zusammenhang mit der beschriebenen Vermittlung von SUMOylierungsreaktionen von Smyd1 durch PML, suggerieren diese Ergebnisse einen negativen Einfluss von PML auf die

Stabilität von Smyd1 in ECs, welcher auf der Initiierung des proteasomalen Abbaus von Smyd1 nach dessen SUMOylierung basiert.

Um im Gegenzug den Einfluss von Smyd1 auf die Expression von PML in Endothelzellen zu untersuchen, wurden Immunblots von EA.hy926 Zelllysaten angefertigt, die im Vorfeld entweder mit einem Smyd1-Expressionsvektor, Smyd1-spezifischer siRNA oder einem leeren Kontrollvektor, welcher kein spezifisches Gen enthält, transfiziert wurden.

In den mit Smyd1-transfizierten Zellen, wurden verglichen mit den Kontrollzellen, erhöhte Proteinkonzentrationen von PML nachgewiesen [siehe Fig. 4B/G, Becker et al [28]]. Die analog dazu erfolgten immunzytochemischen-Versuche zeigten nach der Transfektion von Smyd1 außerdem eine höhere Anzahl von PML-NBs verglichen mit den Zellen, die mit dem Kontrollvektor transfiziert worden waren [siehe Fig 3E/F, Becker et al [28]].

Entsprechend verminderte Werte der PML-Proteinkonzentration wurde in den mit Smyd1 siRNA-transfizierten EA.hy926 Zellen festgestellt [siehe Fig 4D, Becker et al [28]]. Auch die Anzahl an PML-NBs zeigte sich hier im Vergleich erniedrigt [siehe Fig 3E/F, Becker et al [28]].

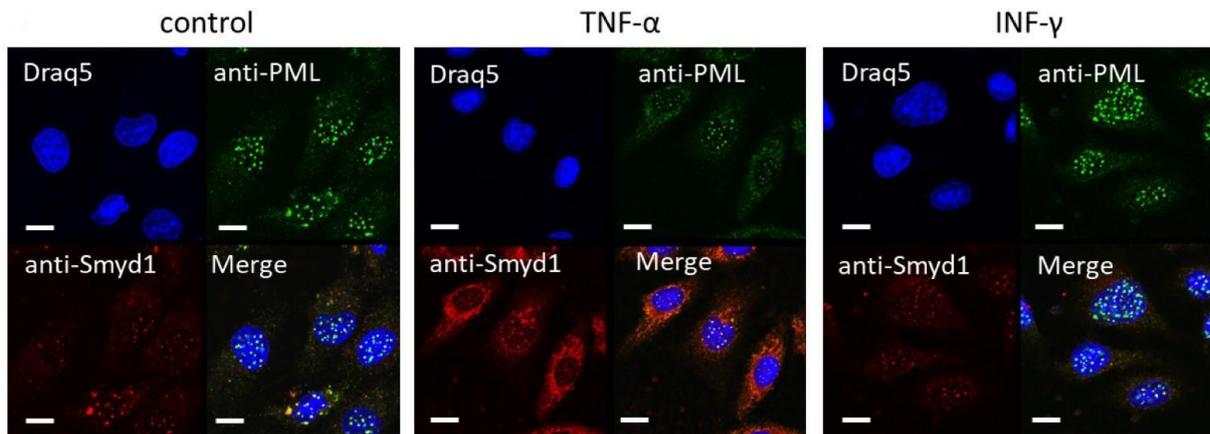
#### 4.6. TNF- $\alpha$ oder IFN- $\gamma$ regulieren die Smyd1 Konzentration in Endothelzellen

EA.hy926 Zellen wurden im letzten Teilprojektteil mit TNF- $\alpha$  oder IFN- $\gamma$  über 6 h stimuliert, um humorale beziehungsweise parakrine Signalwege zu erfassen, welche Zytokin-vermittelt Einfluss auf die Smyd1-Expression im Zusammenhang mit PML in ECs nehmen können.

In beiden Zellansätzen waren verglichen mit der Kontrolle höhere Smyd1- und PML-Konzentrationen festzustellen [siehe Fig 5C, Becker et al [28]].

Bei genauerer Analyse dieser Effekte über einen Zeitraum von 24 Stunden hinweg, resultierte die Stimulation von TNF- $\alpha$  in einem kontinuierlichen Anstieg der Smyd1-Signale im Immunblot [siehe Fig 5E, Becker et al [28]]. In der analog dazu durchgeführten Immunzytochemie waren mehr zytosolische Signale für Smyd1 und eine leicht reduzierte Anzahl von PML-NBs im Vergleich zu nicht-stimulierten Zellen zu beobachten [siehe Fig 5G, Becker et al [28]].

Demgegenüber erreichten die Proteinkonzentrationen von Smyd1 durch Stimulation mit IFN- $\gamma$  nach 6 Stunden ihr Maximum, um im weiteren Verlauf der untersuchten 24 Stunden auf das Ausgangsniveau vor der Stimulation zurückzufallen [siehe Fig 5E, Becker et al [28]]. Dabei wurde eine erhöhte Anzahl und Größe von PML-NBs beobachtet, deren nukleären Signale vermehrt mit denen von Smyd1 ko-lokalisierten [siehe Fig 5G, Becker et al [28]].



EA.hy926 Zellen nach Stimulation mit TNF- $\alpha$  oder INF- $\gamma$  über 24 Stunden. Die Immunfluoreszenzfärbung erfolgte mit anti-Smyd1- und anti-PML-Antikörpern sowie DraQ5 als Kernmarker. Aus Becker et al, Fig. 5G [28].

## 5. Diskussion

Die beobachteten strukturellen Unterschiede der Basalmembran im Raum zwischen kapillärem Endothel und Perizyten erweitern das Spektrum beschriebener morphologischer Auswirkungen auf das Gefäßsystem in der Skelettmuskulatur (a.e. [36,37,38]) bei systemischen Erkrankungen wie Diabetes Mellitus und arterieller Hypertonie. Die Lücken in der BM könnten auf die erhöhte Aktivität von Matrixmetalloproteinasen zurückgehen, ein Effekt, der bereits in Zusammenhang mit erhöhtem oxidativem Stress im Rahmen von Hyperglykämie sowie durch Stimulation mit INF- $\gamma$  *in vitro* nachgewiesen werden konnte [39,40]. Zu klären wäre, ob und inwiefern sich aus diesen veränderten Strukturen auch funktionellen Konsequenzen für die Versorgung des umliegenden Gewebes ergeben.

Da die Bildung von größeren PML-NBs ebenfalls mit gesteigertem oxidativem Stress assoziiert ist, lässt der Nachweis erhöhter PML-Konzentrationen in von Atherosklerose betroffenen Gefäßsegmenten im Vergleich zu denen ohne Plaque vermuten, dass PML ein wichtiger Vermittler jener zellulären Adaptationsmechanismen der Intima und Media ist, welche in dieser vaskulären Pathologie münden. Dieser Ansatz ist aufgrund der nachgewiesenen Einbindung von PML in stressinduzierten Prozessen [22] gut mit den aktuellen Erklärungsmodellen zur Pathogenese von Atherosklerose durch erhöhten Scherstress sowie oxidativen- und metabolischen Stress der Blutgefäße vereinbar [4].

Da eine Vielzahl von Faktoren durch ihre Interaktion mit PML-NBs reguliert werden, ist eine isolierte Untersuchung potentieller Effektoren vaskulärer Pathomechanismen im Zusammenhang mit PML erforderlich, um eine korrekte Einordnung der erhöhten PML-

Konzentrationen bezüglich der daraus resultierenden molekularbiologischen Konsequenzen ableiten zu können.

Ein äußerst interessantes Untersuchungsziel in diesem Kontext ist Smyd1. Smyd1 ist zum einen bekannt für seine wichtige Rolle in der embryonalen Genese des Herzens und in der Regulation des kardialen Metabolismus. Zum anderen finden sich neue Erkenntnisse, die Smyd1 auch mit dem vaskulären System verbinden, wie durch die in ECs nachgewiesene Interaktion von Smyd1 mit dem Serum Response Faktor, einem wichtigen Mediator der Angiogenese und Gefäßstabilität [41].

Smyd1 lässt sich in Endothelzellen nachweisen und ko-lokalisiert hier mit PML und SUMO1 im Zellkern [28,34,41]. Basierend auf den hier präsentierten Ergebnissen wird die Stabilität des Smyd1-Proteins in diesem Zelltyp über die posttranslationale Modifikation der SUMOylierung reguliert. Untermauert wird diese Protein-Wechselwirkung durch den reproduzierbaren Nachweis von sowohl SUMO1 und Smyd1 als auch von Smyd1 und PML in Ko-Immunpräzipitationsversuchen [28].

Die Hypothese der direkten Interaktion von PML und Smyd1, welche konsekutiv zur SUMOylierung von Smyd1 führt, wurde auch durch Simulationsrechnungen unterstützt. Diese konnten anhand eines auf der Kristallstruktur von murinem Smyd1 basierenden homologen Modells von Smyd1 über Protein-Docking Analysen die räumliche Nähe zwischen den entscheidenden Lysin- und Glycin-Resten von Smyd1 und SUMO1 ermitteln, welche eine stabile kovalente Verbindung von Smyd1 und SUMO1 sehr wahrscheinlich macht [28].

Unklar bleibt inwiefern weitere Faktoren die Effizienz der PML vermittelten SUMOylierung von Smyd1 beeinflussen.

Die Daten der vorliegenden Arbeit belegen, dass die SUMOylierung von Smyd1 in Endothelzellen im Gegensatz zu Skelettmuskelzellen [17] weniger dem gezielten Transport aus dem Zellkern ins Zytoplasma dient, sondern eine "Markierung" für den proteasomalen Abbau bewirkt. Diese Aussage lässt sich aus drei Ergebnissen ableiten:

1. Die Konzentration von Smyd1 in Endothelzellen war nach Transfektion der SUMO-Protease sowohl im Nukleus als auch im Zytoplasma erhöht.
2. Nach der Behandlung der EA.hy 926 Zellen mit dem Proteasominhibitor MG132 ließ sich ein starkes Signal der zweiten, SUMOylierten Smyd1 Bande bei 64 kDa nachweisen.
3. Die kombinierte Transfektion von SUMO1 und der UBC9 E2-Ligase, welche zu weniger Smyd1-Signalen als in den Kontrollzellen führte, deutet darüber hinaus darauf hin, dass Smyd1 durch SUMOylierung in ECs destabilisiert wird.

Die theoretische Überführung SUMOylierter Proteine zum proteasomalen Abbau ergibt sich durch die Klasse der SUMO-targeted Ubiquitin Ligasen (STUbL) [20], deren Beteiligung es in dieser Konstellation experimentell zu bestätigen gilt.

Der Anstieg der Konzentrationen von PML-mRNA [28] und PML-Protein in Smyd1-transfizierten EA.hy926 Zellen lässt sich durch die Steigerung der Methyltransferase-Aktivität von Smyd1 erklären. Hierdurch würde eine Downstream-Regulation von Genen über

Histonmodifikation durch Smyd1 in Endothelzellen induziert werden, die in anderen Zelltypen bereits bestätigt wurde [12].

Demgegenüber hatte die Überexpression von PML in EA.hy926 Zellen eine verminderte und ein durch siRNA-induzierter PML-Knockdown eine erhöhte Smyd1-Proteinkonzentration zur Folge. Ein Einfluss auf die Transskriptionsrate von Smyd1 konnte dabei nicht nachgewiesen werden. Daraus lässt sich ein negativer Effekt von PML auf die Stabilität von Smyd1 ableiten, welcher mit dem oben beschriebenen Mechanismus des durch SUMOylierung getriggerten proteasomalen Abbaus von Smyd1 vereinbar ist.

Zusammengenommen lässt sich ein selbstregulierendes Gleichgewicht zwischen PML und Smyd1 erkennen, in dem ein Smyd1-induzierter Anstieg der PML-Konzentration durch eine PML-abhängige Depletion von Smyd1 antagonisiert wird.

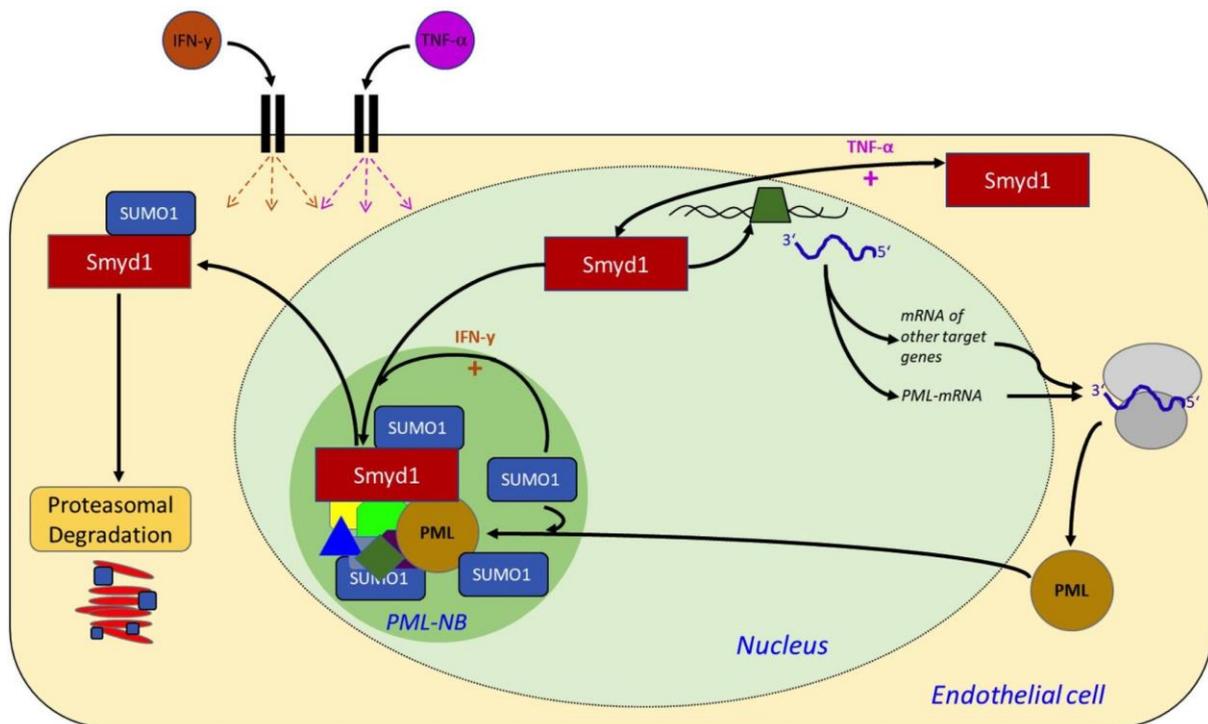
Die steigende Zahl der Erkenntnisse über die Beteiligung von Smyd1 an der Vermittlung von immunologischen Prozessen [1] und den bereits nachgewiesenen Einfluss diverser Zytokine auf die Expression von PML [42] legten eine Untersuchung der Interaktion von PML und Smyd1 in Endothelzellen durch Zytokine nahe. Die Entscheidung, den Einfluss von TNF- $\alpha$  zu untersuchen, beruht unter anderem auf der Assoziation mit kardiovaskulären Erkrankungen [43], während IFN- $\gamma$  durch die beschriebene induzierten Veränderung des PML-vermittelten SUMOylierungsmusters in HEK293 [44] ein attraktives inflammatorisches Stimulanz für das hier untersuchte EA.hy926-Zellmodell darstellt.

Durch die Stimulation von EA.hy926-Zellen mit TNF- $\alpha$  stieg die Konzentration von Smyd1 kontinuierlich über 24 h, was sich immunzytochemisch in einer zytoplasmatischen Anreicherung von Smyd1-Signalen äußerte. Gleichzeitig verminderte sich die Anzahl und Größe der PML-NBs. TNF- $\alpha$  scheint daher einen positiven Effekt auf die Stabilität von Smyd1 zu vermitteln.

Wurden EA.hy926-Zellen mit IFN- $\gamma$  stimuliert, führte dieses zu mehr und größeren PML-NBs, einer Ballung der Smyd1-Signale in den PML-NBs sowie einem Anstieg von SUMOyliertem Smyd1. Der Abfall der initial steigenden Smyd1-Konzentration ist mit einem zunehmenden proteasomalen Abbau durch vermehrte PML-abhängige SUMOylierung von Smyd1 vereinbar.

Zusammengenommen beeinflussen diese Zytokine offensichtlich trotz gemeinsamer initialer Steigerung der Smyd1-Konzentration nach 24 Stunden die Smyd1-Konzentration gegenläufig, wofür das hier postulierte Interaktionsmodell zwischen PML und Smyd1 eine mechanistische Erklärungsgrundlage darstellen könnte.

Die Erkenntnisse dieser Arbeit könnten somit weitere Bausteine im Verständnis der molekularen Genese der unterschiedlichen Morphologie vaskulärer Erkrankungen liefern.



Schematische Darstellung des Interaktionsmechanismus zwischen PML und Smyd1 über SUMO1 in Endothelzellen. 1. Smyd1 wird in PML-Kernkörpern (PML-NBs) durch PML vermehrt SUMOyliert. 2. Dies führt zum proteasomalen Abbau von Smyd1 nach Translokation ins Zytosol. 3. Im Nucleus verbleibendes Smyd1 steigert die Transkription des PML Gens mit konsekutiv erhöhter PML Proteinkonzentration. 4. Durch die Stimulation mit IFN- $\gamma$  wird die SUMOylierung von Smyd1 gesteigert und Smyd1 somit vermehrt abgebaut. 5. Die Stimulation mit TNF- $\alpha$  verstärkt demgegenüber die Translokation von Smyd1 ins Zytosol.  
aus Becker et al [28]

## 6. Literaturverzeichnis

- 1** Libby P, Ridker PM, Hansson GK.  
Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis.  
Nature. 2011 ;473(7347):317-325.  
doi: 10.1038/nature10146. PMID: 21593864.
- 2** Aird WC.  
Endothelial cell heterogeneity.  
Cold Spring Harb Perspect Med. 2012 ;2(1):a006429.  
doi: 10.1101/cshperspect.a006429. PMID: 22315715; PMCID: PMC3253027.
- 3** Rohlenova K, Veys K, Miranda-Santos I, De Bock K, Carmeliet P.  
Endothelial cell metabolism in health and disease.  
Trends Cell Biol. 2018 ;28(3):224-236.  
doi: 10.1016/j.tcb.2017.10.010. PMID: 29153487.
- 4** Gimbrone MA Jr, García-Cardeña G.  
Endothelial cell dysfunction and the pathobiology of atherosclerosis.  
Circ Res. 2016 ;118(4):620-636.  
doi: 10.1161/CIRCRESAHA.115.306301. PMID: 26892962; PMCID: PMC4762052.
- 5** Stary HC.  
Natural history and histological classification of atherosclerotic lesions: an update.  
Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2000 ;20(5):1177-1178.  
doi: 10.1161/01.atv.20.5.1177. PMID: 10807728.
- 6** Kanwar YS, Sun L, Xie P, Liu FY, Chen S.  
A glimpse of various pathogenetic mechanisms of diabetic nephropathy.  
Annu Rev Pathol. 2011 ;6:395-423.  
doi: 10.1146/annurev.pathol.4.110807.092150. PMID: 21261520; PMCID: PMC3700379.
- 7** Kur J, Newman EA, Chan-Ling T.  
Cellular and physiological mechanisms underlying blood flow regulation in the retina and choroid in health and disease.  
Prog Retin Eye Res. 2012 ;31(5):377-406.  
doi: 10.1016/j.preteyeres.2012.04.004. PMID: 22580107; PMCID: PMC3418965.
- 8** Gomez D, Owens GK.  
Smooth muscle cell phenotypic switching in atherosclerosis.  
Cardiovasc Res. 2012 ;95(2):156-164.  
doi: 10.1093/cvr/cvs115. PMID: 22406749; PMCID: PMC3388816.
- 9** Tsilibary EC.  
Microvascular basement membranes in diabetes mellitus.  
J Pathol. 2003 ;200(4):537-546.

doi: 10.1002/path.1439. PMID: 12845621.

**10** Bigler M, Koutsantonis D, Odriozola A, Halm S, Tschanz SA, Zakrzewicz A, Weichert A, Baum O. Morphometry of skeletal muscle capillaries: the relationship between capillary ultrastructure and ageing in humans.

Acta Physiol (Oxf). 2016 ;218(2):98-111.

doi: 10.1111/apha.12709. PMID: 27174490.

**11** Du SJ, Tan X, Zhang J.

SMYD proteins: key regulators in skeletal and cardiac muscle development and function.

Anat Rec . 2014 ;297(9):1650-1662.

doi: 10.1002/ar.22972. PMID: 25125178.

**12** Doughan M, Spellmon N, Li C, Yang Z.

SMYD proteins in immunity: dawning of a new era.

AIMS Biophys. 2016;3(4):450-455.

doi: 10.3934/biophy.2016.4.450. PMID: 27790639; PMCID: PMC5079279.

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

skNAC and Smyd1 in transcriptional control.

Exp Cell Res. 2015 ;336(2):182-191.

doi: 10.1016/j.yexcr.2015.06.019. PMID: 26162853.

**14** Ye X, Qian Y, Wang Q, Yuan W, Mo X, Li Y, Jiang Z, Xu W, Deng Y, Wan Y, Fan X, Wu X, Wang Y.

SMYD1, an SRF-Interacting Partner, Is Involved in Angiogenesis.

PLoS One. 2016 ;11(1):e0146468.

doi: 10.1371/journal.pone.0146468. PMID: 26799706; PMCID: PMC4723226.

**15** Sirinupong N, Brunzelle J, Ye J, Pirzada A, Nico L, Yang Z.

Crystal structure of cardiac-specific histone methyltransferase SmyD1 reveals unusual active site architecture.

J Biol Chem. 2010 ;285(52):40635-40644.

doi: 10.1074/jbc.M110.168187. PMID: 20943667; PMCID: PMC3003362.

**16** Leinhart K, Brown M.

SET/MYND lysine methyltransferases regulate gene transcription and protein activity.

Genes (Basel). 2011 ;2(1):210-218.

doi: 10.3390/genes2010210. PMID: 24710145; PMCID: PMC3924839.

**17** Berkholz J, Michalick L, Munz B.

The E3 SUMO ligase Nse2 regulates sumoylation and nuclear-to-cytoplasmic translocation of skNAC-Smyd1 in myogenesis.

J Cell Sci. 2014 ;127(Pt 17):3794-3804.

doi: 10.1242/jcs.150334. PMID: 25002400.

**18** Zhao X.

SUMO-mediated regulation of nuclear functions and signaling Processes.

Mol Cell. 2018 ;71(3):409-418.

doi: 10.1016/j.molcel.2018.07.027. PMID: 30075142; PMCID: PMC6095470.

**19** Gareau JR, Lima CD.

The SUMO pathway: emerging mechanisms that shape specificity, conjugation and recognition.

Nat Rev Mol Cell Biol. 2010 ;11(12):861-871.

doi: 10.1038/nrm3011. PMID: 21102611; PMCID: PMC3079294.

**20** Sriramachandran AM, Dohmen RJ.

SUMO-targeted ubiquitin ligases.

Biochim Biophys Acta. 2014 ;1843(1):75-85.

doi: 10.1016/j.bbamcr.2013.08.022. PMID: 24018209.

**21** Kerscher O.

SUMO junction-what's your function? New insights through SUMO-interacting motifs.

EMBO Rep. 2007 ;8(6):550-555.

doi: 10.1038/sj.embor.7400980. PMID: 17545995; PMCID: PMC2002525.

**22** Lallemand-Breitenbach V, de Thé H.

PML nuclear bodies: from architecture to function.

Curr Opin Cell Biol. 2018 ;52:154-161.

doi: 10.1016/j.ceb.2018.03.011. PMID: 29723661.

**23** Sahin U, de Thé H, Lallemand-Breitenbach V.

PML nuclear bodies: assembly and oxidative stress-sensitive sumoylation.

Nucleus. 2014;5(6):499-507.

doi: 10.4161/19491034.2014.970104. PMID: 25482067; PMCID: PMC4615786.

**24** Chu Y, Yang X.

SUMO E3 ligase activity of TRIM proteins.

Oncogene. 2011 ;30(9):1108-1116.

doi: 10.1038/onc.2010.462. PMID: 20972456; PMCID: PMC3103664.

**25** Libby P.

Inflammation in atherosclerosis.

Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2012 ;32(9):2045-2051.

doi: 10.1161/ATVBAHA.108.179705. PMID: 22895665; PMCID: PMC3422754.

**26** Baum O, Bernd J, Becker S, Odriozola A, Zuber B, Tschanz SA, Zakrzewicz A, Egginton S, Berkholz J.

Structural microangiopathies in skeletal muscle related to systemic Vascular Pathologies in Humans.

Front Physiol. 2020 ;11-28.

doi: 10.3389/fphys.2020.00028. PMID: 32116748; PMCID: PMC7013089.

**27** Karle W, Becker S, Stenzel P, Knosalla C, Siegel G, Baum O, Zakrzewicz A, Berkholz J. Promyelocytic leukemia protein (PML) promotes the phenotypic switch of smooth muscle cells in atherosclerotic plaques of human coronary arteries.

Clin Sci (Lond). 2021 :CS20201399.

doi: 10.1042/CS20201399. PMID: 33764440.

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

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

Biochem J. 2021 ;478(1):217-234.

doi: 10.1042/BCJ20200603. PMID: 33241844.

**29** Rösler K, Conley KE, Howald H, Gerber C, Hoppeler H.

Specificity of leg power changes to velocities used in bicycle endurance training.

J Appl Physiol 1986 ;61(1):30-36.

doi: 10.1152/jappl.1986.61.1.30. PMID: 3733616.

**30** Suter E, Hoppeler H, Claassen H, Billeter R, Aebi U, Horber F, Jaeger P, Marti B.

Ultrastructural modification of human skeletal muscle tissue with 6-month moderate-intensity exercise training.

Int J Sports Med. 1995 ;16(3):160-166.

doi: 10.1055/s-2007-972985. PMID: 7649706.

**31** Nyberg M, Jensen LG, Thaning P, Hellsten Y, Mortensen SP.

Role of nitric oxide and prostanoids in the regulation of leg blood flow and blood pressure in humans with essential hypertension: effect of high-intensity aerobic training.

J Physiol. 2012 ;590(6):1481-1494.

doi: 10.1113/jphysiol.2011.225136. PMID: 22271868; PMCID: PMC3382335.

**32** Winding KM, Munch GW, Lepsen UW, Van Hall G, Pedersen BK, Mortensen SP.

The effect on glycaemic control of low-volume high-intensity interval training versus endurance training in individuals with type 2 diabetes.

Diabetes Obes Metab. 2019 ;20(5):1131-1139.

doi: 10.1111/dom.13198. PMID: 29272072.

**33** Walker MA, Hoier B, Walker PJ, Schulze K, Bangsbo J, Hellsten Y, Askew CD.

Vasoactive enzymes and blood flow responses to passive and active exercise in peripheral arterial disease.

Atherosclerosis. 2016 ;246:98-105.

doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2015.12.029. PMID: 26771386.

**34** Maroski J, Vorderwülbecke BJ, Fiedorowicz K, Da Silva-Azevedo L, Siegel G, Marki A, Pries AR, Zakrzewicz A.

Shear stress increases endothelial hyaluronan synthase 2 and hyaluronan synthesis especially in regard to an atheroprotective flow profile.

Exp Physiol. 2011 ;96(9):977-986.

doi: 10.1113/expphysiol.2010.056051. PMID: 21551265.

**35** Baum O, Torchetti E, Malik C, Hoier B, Walker M, Walker PJ, Odriozola A, Graber F, Tschanz SA, Bangsbo J, Hoppeler H, Askew CD, Hellsten Y.

Capillary ultrastructure and mitochondrial volume density in skeletal muscle in relation to reduced exercise capacity of patients with intermittent claudication.

Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2016 ;310(10):R943-951.

doi: 10.1152/ajpregu.00480.2015. PMID: 27009051.

**36** Mortensen SP, Winding KM, Lepsen UW, Munch GW, Marcussen N, Hellsten Y, Pedersen BK, Baum O.

The effect of two exercise modalities on skeletal muscle capillary ultrastructure in individuals with type 2 diabetes.

Scand J Med Sci Sports. 2019 ;29(3):360-368.

doi: 10.1111/sms.13348. PMID: 30480353.

**37** Williamson JR, Kilo C.

Capillary basement membranes in diabetes.

Diabetes. 1983 ;32 Suppl 2:96-100.

doi: 10.2337/diab.32.2.s96. PMID: 6400674.

**38** Uemura S, Matsushita H, Li W, Glassford AJ, Asagami T, Lee KH, Harrison DG, Tsao PS.

Diabetes mellitus enhances vascular matrix metalloproteinase activity: role of oxidative stress.

Circ Res. 2001 22;88(12):1291-1298.

doi: 10.1161/hh1201.092042. PMID: 11420306.

**39** Nareika A, Sundararaj KP, Im YB, Game BA, Lopes-Virella MF, Huang Y.

High glucose and interferon gamma synergistically stimulate MMP-1 expression in U937 macrophages by increasing transcription factor STAT1 activity.

Atherosclerosis. 2009 ;202(2):363-371.

doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2008.05.043. PMID: 18586252; PMCID: PMC2665715

**40** Maarifi G, Chelbi-Alix MK, Nisole S.

PML control of cytokine signaling.

Cytokine Growth Factor Rev. 2014 ;25(5):551-561.

doi: 10.1016/j.cytogfr.2014.04.008. PMID: 24861946.

**41** Popa C, Netea MG, van Riel PL, van der Meer JW, Stalenhoef AF.

The role of TNF-alpha in chronic inflammatory conditions, intermediary metabolism, and cardiovascular risk.

J Lipid Res. 2007 ;48(4):751-762.

doi: 10.1194/jlr.R600021-JLR200. PMID: 17202130.

**42** Maroui MA, Maarifi G, McManus FP, Lamoliatte F, Thibault P, Chelbi-Alix MK.

Promyelocytic Leukemia Protein (PML) requirement for interferon-induced global cellular SUMOylation.

Mol Cell Proteomics. 2018 ;17(6):1196-1208.

doi: 10.1074/mcp.RA117.000447. PMID: 29535160; PMCID: PMC5986244.

## 7. Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Samuel Becker, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „PML und Smyd1: potentielle Mediatoren chronischer Gefäßerkrankungen“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Erstbetreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; [www.icmje.org](http://www.icmje.org)) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

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

Datum

Unterschrift

## 8. Anteilserklärung an den erfolgten Publikationen

**Samuel Becker** hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

### **Publikation 1: Structural Microangiopathies in Skeletal Muscle Related to Systemic Vascular Pathologies in Humans**

Baum O, Bernd J, Becker S, Odriozola A, Zuber B, Tschanz SA, Zakrzewicz A, Egginton S, Berkholz J.

Structural Microangiopathies in Skeletal Muscle Related to Systemic Vascular Pathologies in Humans.

Front Physiol. 2020 Feb 5;11:28.

doi: 10.3389/fphys.2020.00028. PMID: 32116748; PMCID: PMC7013089

#### **Eigener Beitrag:**

- Morphologische Analyse der Basalmembran von 5000 elektronenmikroskopischer Aufnahmen von Kapillaren aus Biopsien des Vastus lateralis,
- Datenerhebung und Auswertung (Table 2).

### **Publikation 2: 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.

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

Biochem J. 2021 Jan 15;478(1):217-234.

doi: 10.1042/BCJ20200603. PMID: 33241844.

#### **Eigener Beitrag:**

- Planung und Durchführung von Zellkultur, Aufbereitung und Fraktionierung der Zelllysate
- Transfektionsversuche mit Expressionsplasmiden von PML, SMYD, SUMO1, SuPr, UBC9 und siRNA gegen PML IV und Smyd1
- Stimulationsversuche mit TNF- $\alpha$  und INF- $\gamma$
- Versuche mit Cycloheximid und MG132
- Immunoblotting (Fig. 3 B/C, Fig. 4 B/D/K/M, Fig. 5 C)
- Immunhistochemie (Fig. 4 E)
- Datenakquise und Auswertung

### **Publikation 3: 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.

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

Clin Sci (Lond). 2021 Apr 16;135(7):887-905.

doi: 10.1042/CS20201399. PMID: 33764440.

#### **Eigener Beitrag:**

- Aufbereitung von Gewebelysaten aus menschlichen Koronararterien
- Immunoblotting (Fig. 1C/D)
- Datenakquise und Auswertung

---

Unterschrift, Datum und Stempel des/der erstbetreuenden Hochschullehrers/in

---

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

## 9. Druckversion der ersten Publikation

Baum O, Bernd J, Becker S, Odriozola A, Zuber B, Tschanz SA, Zakrzewicz A, Egginton S, Berkholz J.

Structural microangiopathies in skeletal muscle related to systemic Vascular Pathologies in Humans. Front Physiol. 2020 ;11-28.

doi: 10.3389/fphys.2020.00028. PMID: 32116748; PMCID: PMC7013089.

<https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00028>





























## 10. Druckversion der zweiten Publikation

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

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

Biochem J. 2021 ;478(1):217-234.

doi: 10.1042/BCJ20200603. PMID: 33241844.<https://doi.org/10.1042/BCJ20200603>



































## 11. Druckversion der dritten Publikation

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

Promyelocytic leukemia protein (PML) promotes the phenotypic switch of smooth muscle cells in atherosclerotic plaques of human coronary arteries.

Clin Sci (Lond). 2021 :CS20201399.

doi: 10.1042/CS20201399. PMID: 33764440.

<https://doi.org/10.1042/CS20201399>





































## 12. Lebenslauf

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



# 13. Liste aller Publikationen

## **1. Structural Microangiopathies in Skeletal Muscle Related to Systemic Vascular Pathologies in Humans**

Baum O, Bernd J, Becker S, Odriozola A, Zuber B, Tschanz SA, Zakrzewicz A, Egginton S, Berkholz J. Structural Microangiopathies in Skeletal Muscle Related to Systemic Vascular Pathologies in Humans.

Front Physiol. 2020 Feb 5;11:28.

doi: 10.3389/fphys.2020.00028. PMID: 32116748; PMCID: PMC7013089.

**Impact Factor:** 4.134, Rang 15 der Kategorie "PHYSIOLOGY"

(basierend auf der ISI-WEB-Liste Stand 2021)

## **2. 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. Stability of Smyd1 in endothelial cells is controlled by PML-dependent SUMOylation upon cytokine stimulation.

Biochem J. 2021 Jan 15;478(1):217-234.

doi: 10.1042/BCJ20200603. PMID: 33241844.

**Impact Factor:** 3.857, Rang 81 der Kategorie "BIOCHEMISTRY and MOLECULAR BIOLOGY"

(basierend auf der ISI-WEB-Liste Stand 2021)

## **3. 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. Promyelocytic leukemia protein promotes the phenotypic switch of smooth muscle cells in atherosclerotic plaques of human coronary arteries.

Clin Sci (Lond). 2021 Apr 16;135(7):887-905.

doi: 10.1042/CS20201399. PMID: 33764440.

**Impact Factor:** 5.223, Rang 24 der Kategorie "MEDICINE, RESEARCH and EXPERIMENTAL"

(basierend auf der ISI-WEB-Liste Stand 2021)

## 14. Danksagung

Ich möchte mich bei allen Beteiligten des Institutes für Physiologie wie auch der kooperierenden Einrichtungen für die Unterstützung bei der Realisierung dieser Arbeit herzlich bedanken, insbesondere bei Dr. Janine Berkholz für ihre exzellente Betreuung, Dr. Oliver Baum für seinen Rat, Dr. Weronika Karle, Dr. Gustav Steinemann und Dr. Andrea Volkamer für ihre Mitarbeit an den Projekten, Angela Becker und Björn Hofmann für ihre hervorragende technische Unterstützung sowie Isabelle für ihren moralischen Beistand.