

Elastin – Entstehung und Verbleib

Kumulative Habilitationsschrift

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium habitatus (Dr. rer. nat. habil.)

vorgelegt der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I

Biowissenschaften

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

Herrn Dr. rer. nat. Christian E. H. Schmelzer
geboren am 17. Mai 1978 in Wippra

Gutachter:

1. Prof. Dr. rer. nat. habil. Dr. h. c. Reinhard H. H. Neubert, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
2. Prof. Dr. rer. nat. habil. Thomas M. Groth, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
3. Prof. Dr. rer. nat. habil. Dieter P. Reinhardt, McGill University (Kanada)

Einreichung: 4. November 2020

Verteidigung: 20. Mai 2021

Probevorlesung: 13. Juli 2021

Für Alexandra und meine Eltern.

DANKSAGUNG

Die vorliegende Habilitationsschrift basiert auf Studien, die in den Jahren von 2008 bis 2016 am Institut für Pharmazie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg sowie von 2016 bis 2020 am Fraunhofer-Institut für Mikrostruktur von Werkstoffen und Systemen IMWS entstanden sind. Mein besonderer Dank gilt meinem Mentor, Prof. Dr. Dr. h.c. Reinhard Neubert, für seine wegweisende und großzügige Unterstützung. Er gab mir die Möglichkeit und die Freiheit, nach meiner Promotion meine eigene Forschung fortzuführen und stand mir immer mit Rat und Tat zur Seite.

Großer Dank gilt weiterhin meinen früheren und jetzigen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern, insbesondere meinen Promotions-, Master- und Diplomstudentinnen und -studenten. Sie haben mit viel Fleiß, Hartnäckigkeit und Kreativität ganz entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Einige, für diese Habilitationsschrift besonders wichtige Arbeiten und die mit ihnen in Verbindung stehenden Personen möchte ich im Folgenden gesondert hervorheben.

Dr. Samuel Taddese leistete in seinem Promotionsvorhaben wichtige Arbeiten zu elastinolytischen Metalloproteasen, die den Weg für viele spätere Studien ebneten. Michael Jung entwickelte mit großem Geschick nicht nur Protokolle für die Isolierung Elastins aus verschiedenen Geweben, sondern auch analytische Methoden, um die enzymatische Schädigung elastischer Fasern nachvollziehen zu können. Wichtige Beiträge lieferte auch Dr. Christoph Ruttkies, der im Rahmen seiner Diplomarbeit die Entwicklung bioinformatischer Methoden für die Identifizierung von elastintypischen Quervernetzungen basierend auf Tandem-MS-Daten vorantrieb. Dr. Christoph Schröder gelang es dann in seiner Promotion mithilfe dieser und weiterer Methoden, vor allem aber mit beeindruckendem Einfallsreichtum und enormer Ausdauer, erstmals eine Vielzahl nativer Quervernetzungen aufzuklären und auf diese Weise ein besseres Verständnis für die molekulare Reifung Elastins zu schaffen. Tobias Hedtke konnte im Rahmen seiner Masterarbeit und seines gegenwärtig laufenden Promotionsvorhabens dieses Bild durch Erkenntnisse zu höherfunktionalen Quervernetzungen und Vorgängen des alternativen Spleißens noch deutlich erweitern und entwickelte zudem neuartige, auf Elastin basierende Biomaterialien. Erwähnen möchte ich auch Dr. Andrea Heinz, die als Postdoktorandin in meiner Gruppe an vielen dieser Arbeiten mitgewirkt hat.

Weiterhin möchte ich allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern danken, die in der einen oder anderen Form in den anfangs genannten Zeiträumen in meinen Arbeitsgruppen an Themen zur extrazellulären Matrix geforscht haben. Dies sind Angelica Avila Castillo, Dr. Szymon Dziomba, Ruth Fritzsche, Mirko Hähnel, Dr. Cristina Mora Huertas, Martin Köhler, Dr. Natalia Miekus-Purwin, Dr. Marcus Nagel, Ute Richter, Mina Rizk, Dr.-Ing. Martin Scharm, Christian Schumann, Thushar Srivatsa, Jenny Tiede, Jing Wang und Mina Wilson. Weiterhin danke ich Manuela Woigk für Ihre exzellente Arbeit im Labor und Herrn Dieter

Reese und seinem früheren Team der feinmechanischen Werkstatt für die stets brillante Umsetzung beim Bau diverser Hardware.

Auch innerhalb der Alma mater halensis möchte ich zahlreichen Kolleginnen und Kollegen für die hervorragende Zusammenarbeit danken. Prof. Dr. Karsten Mäder danke ich für seine fortwährende Unterstützung in Lehre und Forschung. Prof. Dr. Andrea Sinz und Dr. Christian Ihling ermöglichten es meiner Gruppe, wichtige Messungen an ihren hochauflösenden Massenspektrometern durchzuführen und unterstützten uns bei der Testung neuer Methoden. Prof. Dr. Wolfgang Sippl half uns mit seiner Expertise und den Methoden der molekularen Modellierung, insbesondere durch Dockingstudien, experimentelle Ergebnisse besser zu verstehen und manche Hypothese zu überprüfen. Mit Prof. Dr. Markus Pletzsch gibt es seit vielen Jahren eine sehr gute Zusammenarbeit in Lehre und Forschung. Von seiner Gruppe erhielten wir u.a. rekombinantes Tropoelastin, das wir als Modellsupstrat in zahlreichen Studien einsetzten. Herrn PD Dr. Günther Jahreis möchte ich für die Herstellung teilweise sehr schwer synthetisierbarer Peptide danken. Prof. Dr. Johannes Wohlrab danke ich für die langjährige Zusammenarbeit insbesondere bei dermalen Forschungsthemen. Dr. Wolfgang Hoehenwarter vom Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie möchte ich für die langjährige Kooperation bei bioanalytischen Fragestellungen sowie in der Lehre danken.

Viele der Studien sind im Rahmen nationaler und internationaler Kooperationen entstanden. *Merci beaucoup* an Prof. Dr. Laurent Duca, Dr. Stéphane Jaisson, Dr. Sébastien Blaise, Dr. Pascal Maurice, Prof. Dr. Stéphanie Baud und Prof. Dr. Laurent Debelle von der Université de Reims Champagne-Ardenne sowie Dr. Laurent Muller und Dr. Stéphane Germain vom Collège de France in Paris. Ich danke zudem Prof. Dr. Anthony Weiss von der University of Sydney, Prof. Dr. Brigida Bochicchio und Prof. Dr. Antonietta Pepe von der University of Basilicata, Prof. Arie Admon und Dr. Eilon Barnea vom Technion, Prof. Dr. Dieter Brömme und Dr. Preeti Panwar von der University of British Columbia, Prof. Dr. Fred Keeley von der University of Toronto, Prof. Dr. Sarit Sivan vom ORT Braude College of Engineering und Prof. Dr. Jürgen Brinckmann von der Universität zu Lübeck.

Bei Dr. Christiane Lindner und Tobias Hedtke bedanke ich mich für das kritische Lesen dieser Arbeit und die vielen wertvollen Hinweise. Weiterhin möchte ich dem Deutschen Akademischen Austauschdienst (DAAD), der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG), dem Europäischen Fonds für regionale Entwicklung (EFRE) und der Fraunhofer-Gesellschaft (Programm ATTRACT) für die Förderung unterschiedlicher Projekte danken, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Der größte Dank geht an meine Eltern, meine Tochter Alexandra und meine Freundin Paola für ihr Verständnis und ihre immerwährende Unterstützung.

INHALTSVERZEICHNIS

DANKSAGUNG	3
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	8
VORBEMERKUNG	11
1 EINLEITUNG UND MOTIVATION	14
2 FORSCHUNGSERGEBNISSE	18
2.1 Isolierung Elastins aus Gewebe	18
2.2 Elastogenese	21
2.2.1 Bildung der Mikrofibrillen	22
2.2.2 Die Synthese Tropoelastins.....	23
2.2.3 Tropoelastins Domänenstruktur.....	25
2.2.4 Die Sekretion Tropoelastins	27
2.2.5 Die Mikroassemblierung	27
2.2.6 Die Lysyloxidase-vermittelte Quervernetzung.....	29
2.2.7 Die Makroassemblierung	34
2.2.8 Die Quervernetzungspositionen	34
2.3 Die Eigenschaften Elastins	43
2.3.1 Vorkommen und Morphologie	43
2.3.2 Alterungsbeständigkeit und proteolytische Stabilität	44
2.3.3 Biologische Eigenschaften	44
2.3.4 Mechanische Eigenschaften	45
2.4 Alterung und Schädigung Elastins.....	48
2.4.1 Matrix-Metalloproteasen	50
2.4.2 Serinproteasen.....	56
2.4.3 Cysteinproteasen	61
3 ZUSAMMENFASSUNG	64
4 LITERATUR	66
5 LEBENSLAUF.....	80
6 PUBLIKATIONSLISTE	82
7 ERKLÄRUNG	87
8 ANHANG: DER HABILITATIONSSCHRIFT ZU GRUNDE LIEGENDE VERÖFFENTLICHUNGEN.....	88

A1	Taddese, S., Weiss, A. S., Neubert, R. H. H. und Schmelzer, C. E. H. (2008) Mapping of macrophage elastase cleavage sites in insoluble human skin elastin. <i>Matrix Biol</i> 27 (5): 420-428.	89
A2	Taddese, S., Weiss, A. S., Jahreis, G., Neubert, R. H. H. und Schmelzer, C. E. H. (2009) In vitro degradation of human tropoelastin by MMP-12 and the generation of matrikines from domain 24. <i>Matrix Biol</i> 28 (2): 84-91.	98
A3	Heinz, A., Jung, M. C., Duca, L., Sippl, W., Taddese, S., Ihling, C., Rusciani, A., Jahreis, G., Weiss, A. S., Neubert, R. H. H. und Schmelzer, C. E. H. (2010) Degradation of tropoelastin by matrix metalloproteinases - cleavage site specificities and release of matrikines. <i>FEBS J</i> 277 (8): 1939-1956.	106
A4	Taddese, S., Jung, M. C., Ihling, C., Heinz, A., Neubert, R. H. H. und Schmelzer, C. E. H. (2010) MMP-12 catalytic domain recognizes and cleaves at multiple sites in human skin collagen type I and type III. <i>Biochim Biophys Acta Gen Subj</i> 1804 (4): 731-739.	124
A5	Heinz, A., Taddese, S., Sippl, W., Neubert, R. H. H. und Schmelzer, C. E. H. (2011) Insights into the degradation of human elastin by matrilysin-1. <i>Biochimie</i> 93 (2): 187-194.	133
A6	Heinz, A., Jung, M. C., Jahreis, G., Rusciani, A., Duca, L., Debelle, L., Weiss, A. S., Neubert, R. H. H. und Schmelzer, C. E. H. (2012) The action of neutrophil serine proteases on elastin and its precursor. <i>Biochimie</i> 94 (1): 192-202.	141
A7	Schmelzer, C. E. H. , Jung, M. C., Wohlrab, J., Neubert, R. H. H. und Heinz, A. (2012) Does human leukocyte elastase degrade intact skin elastin? <i>FEBS J</i> 279 (22): 4191-4200.	152
A8	Sivan, S. S., Van El, B., Merkher, Y., Schmelzer, C. E. H. , Zuurmond, A. M., Heinz, A., Wachtel, E., Varga, P. P., Lazary, A., Brayda-Bruno, M. und Maroudas, A. (2012) Longevity of elastin in human intervertebral disc as probed by the racemization of aspartic acid. <i>Biochim Biophys Acta Gen Subj</i> 1820 (10): 1671-1677.	162
A9	Bochicchio, B., Laurita, A., Heinz, A., Schmelzer, C. E. H. und Pepe, A. (2013) Investigating the role of (2S,4R)-4-hydroxyproline in elastin model peptides. <i>Biomacromolecules</i> 14 (12): 4278-4288.	169
A10	Heinz, A., Ruttkies, C. K., Jahreis, G., Schröder, C. U., Wichapong, K., Sippl, W., Keeley, F. W., Neubert, R. H. H. und Schmelzer, C. E. H. (2013) In vitro cross-linking of elastin peptides and molecular characterization of the resultant biomaterials. <i>Biochim Biophys Acta</i> 1830 (4): 2994-3004.	180
A11	Heinz, A., Schröder, C. U., Baud, S., Keeley, F. W., Mithieux, S. M., Weiss, A. S., Neubert, R. H. H. und Schmelzer, C. E. H. (2014) Molecular-level characterization of elastin-like constructs and human aortic elastin. <i>Matrix Biol</i> 38: 12-21.	191
A12	Schröder, C. U., Heinz, A., Majovsky, P. und Schmelzer, C. E. H. (2015) Fingerprinting desmosine-containing elastin peptides. <i>J Am Soc Mass Spectrom</i> 26 (5): 762-773.	201

- A13 Mora Huertas, A. C., **Schmelzer, C. E. H.**, Hoehenwarter, W., Heyroth, F. und Heinz, A. (2016) Molecular-level insights into aging processes of skin elastin. *Biochimie* 128-129: 163-173. 213
- A14 **Schmelzer, C. E. H.**, Nagel, M. B., Dziomba, S., Merkher, Y., Sivan, S. S. und Heinz, A. (2016) Prolyl hydroxylation in elastin is not random. *Biochim Biophys Acta Gen Subj* 1860 (10): 2169-2177. 224
- A15 Gorisse, L., Pietrement, C., Vuiblet, V., **Schmelzer, C. E. H.**, Köhler, M., Duca, L., Debelle, L., Fornes, P., Jaisson, S. und Gillery, P. (2016) Protein carbamylation is a hallmark of aging. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113 (5): 1191-1196. 233
- A16 Mora Huertas, A. C., **Schmelzer, C. E. H.**, Luise, C., Sippl, W., Pietzsch, M., Hoehenwarter, W. und Heinz, A. (2018) Degradation of tropoelastin and skin elastin by neprilysin. *Biochimie* 146: 73-78. 239
- A17 Schröder, C. U., Heinz, A., Majovsky, P., Karaman Mayack, B., Brinckmann, J., Sippl, W. und **Schmelzer, C. E. H.** (2018) Elastin is heterogeneously cross-linked. *J Biol Chem* 293 (39): 15107-15119. 245
- A18 Hedtke, T., Schröder, C. U., Heinz, A., Hoehenwarter, W., Brinckmann, J., Groth, T. und **Schmelzer, C. E. H.** (2019) A comprehensive map of human elastin cross-linking during elastogenesis. *FEBS J* 286 (18): 3594-3610. 258
- A19 Miekus, N., Luise, C., Sippl, W., Baczek, T., **Schmelzer, C. E. H.** und Heinz, A. (2019) MMP-14 degrades tropoelastin and elastin. *Biochimie* 165: 32-39. 275
- A20 **Schmelzer, C. E. H.**, Heinz, A., Troilo, H., Lockhart-Cairns, M. P., Jowitt, T. A., Marchand, M. F., Bidault, L., Bignon, M., Hedtke, T., Barret, A., McConnell, J. C., Sherratt, M. J., Germain, S., Hulmes, D. J. S., Baldock, C. und Muller, L. (2019) Lysyl oxidase-like 2 (LOXL2)-mediated cross-linking of tropoelastin. *FASEB J* 33 (4): 5468-5481. 283
- A21 Panwar, P., Hedtke, T., Heinz, A., Andrault, P. M., Hoehenwarter, W., Granville, D. J., **Schmelzer, C. E. H.** und Brömme, D. (2020) Expression of elastolytic cathepsins in human skin and their involvement in age-dependent elastin degradation. *Biochim Biophys Acta Gen Subj* 1864 (5): 129544. 297

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AA	Allysinaldol
ADAMTS	ein Disintegrin und Metalloprotease mit Thrombospondinmotiven (engl. <i>a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs</i>)
ADAMTSL	ADAMTS-ähnlich (engl. <i>ADAMTS-like</i>)
AGEs	fortgeschrittene Glykierungsendprodukte (engl. <i>advanced glycation end products</i>)
BrCN	Bromcyan
CatG	Cathepsin G
CatK	Cathepsin K
CatS	Cathepsin S
CatV	Cathepsin V
CC	Cysteincathepsin
ΔLNL	Dehydrolysinonorleucin
ΔMDES	Dehydromerodesmosin
DES	Desmosin
EBP	elastinbindendes Protein (engl. <i>elastin binding protein</i>)
EDP	Elastinpeptid (engl. <i>elastin-derived peptide</i>)
EMILIN	Elastin-Mikrofibrillen-Schittstellenprotein (engl. <i>elastin microfibril interfacier</i>)
ER	endoplasmatisches Retikulum
ERC	Elastinrezeptorkomplex (engl. <i>elastin receptor complex</i>)
EZM	extrazelluläre Matrix
GAG	Glykosaminoglykan
HIF	Hypoxie-induzierter Faktor
HLE	humane Leukozytenelastase
Hyp	Hydroxyprolin
IDES	Isodesmosin
LC	Flüssigchromatographie (engl. <i>liquid chromatography</i>)
LNL	Lysinonorleucin

LOX	Lysyloxidase
LOXL	LOX-ähnlich (engl. <i>LOX-like</i>)
LTBP	latente TGFβ-bindende Proteine (engl. <i>latent TGFβ binding proteins</i>)
LTQ	Lysintyrosylchinon
Lya	Allysin
MAGP	Mikrofibrillen-assoziiertes Glykoprotein
MDES	Merodesmosin
MMP	Matrix-Metalloprotease
mRNA	Boten-RNA (engl. <i>messenger RNA</i>)
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
MT1-MMP	membranassoziierte MMP (engl. <i>membrane-type 1 MMP</i>)
Neu-1	Neuraminidase-1
NSP	neutrophile Serinprotease
PPCA	Protective Protein/Cathepsin A
PR3	Proteinase 3
prä-mRNA	Vorläufer-mRNA (engl. <i>precursor mRNA</i>)
PTM	posttranslationale Modifikation
PQQ	Pyrrlochinolinchinon
RNA	Ribonukleinsäure (engl. <i>ribonucleic acid</i>)
SRCR	cysteinreiche Scavenger-Rezeptordomänen (engl. <i>scavenger receptor cysteine-rich</i>)
TE	Tropoelastin
TGF	Transformierender Wachstumsfaktor (engl. <i>transforming growth factor</i>)
TIMP	Gewebeinhibitor der Metalloproteasen (engl. <i>tissue inhibitor of metalloproteinases</i>)
UV	ultraviolett

Drei- und Einbuchstabencodes der Aminosäuren und Massen ihrer Reste

Aminosäure	Dreibuch- stabencode	Einbuch- stabencode	Monoisotopische Masse /Da
Alanin	Ala	A	71,0371
Allysin	Lya	k	127,0633
Arginin	Arg	R	156,1011
Asparagin	Asn	N	114,0429
Asparaginsäure	Asp	D	115,0269
Cystein	Cys	C	103,0092
Glutamin	Gln	Q	128,0586
Glutaminsäure	Glu	E	129,0426
Glycin	Gly	G	57,0215
Histidin	His	H	137,0589
Hydroxyprolin	Hyp	p	113,0477
Isoleucin	Ile	I	113,0841
Leucin	Leu	L	113,0841
Lysin	Lys	K	128,0950
Methionin	Met	M	131,0405
Phenylalanin	Phe	F	147,0684
Prolin	Pro	P	97,0528
Serin	Ser	S	87,0320
Threonin	Thr	T	101,0477
Tryptophan	Trp	W	186,0793
Tyrosin	Tyr	Y	163,0633
Valin	Val	V	99,0684

Quervernetzende Aminosäuren in Elastin

Aminosäure	Typ	Abkürzung	Monoisotopische Masse /Da
Allysinaldol	bifunktional	AA	272,1372
Dehydrolysinonorleucin	bifunktional	Δ LNL	273,1689
Dehydromerodesmosin	trifunktional	Δ MDES	400,2322
Desmosin	tetrafunktional	DES	526,2871
Isodesmosin	tetrafunktional	IDES	526,2871
Lysinonorleucin	bifunktional	LNL	275,1845
Merodesmosin	trifunktional	MDES	402,2478

VORBEMERKUNG

Für die Darstellung meiner Forschungsarbeiten habe ich die kumulative Form der Habilitation gewählt. Die Arbeit ist in der Art eines Übersichtsartikels^a geschrieben, in dem wesentliche Erkenntnisse meiner eigenen Forschung im Kontext des aktuellen Wissensstandes diskutiert werden. Die dafür ausgewählten Originalarbeiten sind als Anlagen und auf einem Datenträger beigefügt und enthalten die experimentellen Ergebnisse sowie ausführliche Diskussionen. Auf diese Publikationen wird am Anfang der Kapitel hingewiesen. Zudem sind alle eigenen Veröffentlichungen, auch einige, die nicht Bestandteil dieser Habilitationsschrift sind, durch eine vorangestellte Raute (#) im Text gekennzeichnet.

Verzeichnis der dieser Habilitationsschrift zu Grunde liegenden Originalartikel in der Reihenfolge ihrer Veröffentlichung:

- A1 Taddese, S., Weiss, A. S., Neubert, R. H. H. und **Schmelzer, C. E. H.*** (2008) Mapping of macrophage elastase cleavage sites in insoluble human skin elastin. *Matrix Biol* 27 (5): 420-428, <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2008.02.001>
- A2 Taddese, S., Weiss, A. S., Jahreis, G., Neubert, R. H. H. und **Schmelzer, C. E. H.*** (2009) In vitro degradation of human tropoelastin by MMP-12 and the generation of matrikines from domain 24. *Matrix Biol* 28 (2): 84-91, <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2008.12.002>
- A3 Heinz, A., Jung, M. C., Duca, L., Sippl, W., Taddese, S., Ihling, C., Rusciani, A., Jahreis, G., Weiss, A. S., Neubert, R. H. H. und **Schmelzer, C. E. H.*** (2010) Degradation of tropoelastin by matrix metalloproteinases - cleavage site specificities and release of matrikines. *FEBS J* 277 (8): 1939-1956, <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2010.07616.x>
- A4 Taddese, S., Jung, M. C., Ihling, C., Heinz, A., Neubert, R. H. H. und **Schmelzer, C. E. H.*** (2010) MMP-12 catalytic domain recognizes and cleaves at multiple sites in human skin collagen type I and type III. *Biochim Biophys Acta Gen Subj* 1804 (4): 731-739, <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2009.11.014>

^a Siehe auch die englischsprachigen Übersichtsartikel: ([#Schmelzer, 2016](#); [#Schmelzer und Duca, 2021](#))

- A5 Heinz, A., Taddese, S., Sippl, W., Neubert, R. H. H. und **Schmelzer, C. E. H.*** (2011) Insights into the degradation of human elastin by matrilysin-1. *Biochimie* 93 (2): 187-194, <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2010.09.011>
- A6 Heinz, A., Jung, M. C., Jahreis, G., Rusciani, A., Duca, L., Debelle, L., Weiss, A. S., Neubert, R. H. H. und **Schmelzer, C. E. H.*** (2012) The action of neutrophil serine proteases on elastin and its precursor. *Biochimie* 94 (1): 192-202, <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2011.10.006>
- A7 **Schmelzer, C. E. H.***, Jung, M. C., Wohlrab, J., Neubert, R. H. H. und Heinz, A. (2012) Does human leukocyte elastase degrade intact skin elastin? *FEBS J* 279 (22): 4191-4200, <https://doi.org/10.1111/febs.12012>
- A8 Sivan, S. S.*, Van El, B., Merkher, Y., **Schmelzer, C. E. H.**, Zuurmond, A. M., Heinz, A., Wachtel, E., Varga, P. P., Lazary, A., Brayda-Bruno, M. und Maroudas, A. (2012) Longevity of elastin in human intervertebral disc as probed by the racemization of aspartic acid. *Biochim Biophys Acta Gen Subj* 1820 (10): 1671-1677, <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.06.010>
- A9 Bochicchio, B., Laurita, A., Heinz, A., **Schmelzer, C. E. H.** und Pepe, A.* (2013) Investigating the role of (2S,4R)-4-hydroxyproline in elastin model peptides. *Biomacromolecules* 14 (12): 4278-4288, <https://doi.org/10.1021/bm4011529>
- A10 Heinz, A.*, Ruttkies, C. K., Jahreis, G., Schröder, C. U., Wichapong, K., Sippl, W., Keeley, F. W., Neubert, R. H. H. und **Schmelzer, C. E. H.** (2013) In vitro cross-linking of elastin peptides and molecular characterization of the resultant biomaterials. *Biochim Biophys Acta* 1830 (4): 2994-3004, <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.01.014>
- A11 Heinz, A.*, Schröder, C. U., Baud, S., Keeley, F. W., Mithieux, S. M., Weiss, A. S., Neubert, R. H. H. und **Schmelzer, C. E. H.** (2014) Molecular-level characterization of elastin-like constructs and human aortic elastin. *Matrix Biol* 38: 12-21, <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2014.07.006>
- A12 Schröder, C. U., Heinz, A., Majovsky, P. und **Schmelzer, C. E. H.*** (2015) Fingerprinting desmosine-containing elastin peptides. *J Am Soc Mass Spectrom* 26 (5): 762-773, <https://doi.org/10.1007/s13361-014-1075-9>
- A13 Mora Huertas, A. C., **Schmelzer, C. E. H.**, Hoehenwarter, W., Heyroth, F. und Heinz, A.* (2016) Molecular-level insights into aging processes of skin elastin. *Biochimie* 128-129: 163-173, <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2016.08.010>

- A14 **Schmelzer, C. E. H.**, Nagel, M. B., Dziomba, S., Merkher, Y., Sivan, S. S. und Heinz, A.* (2016) Prolyl hydroxylation in elastin is not random. *Biochim Biophys Acta Gen Subj* 1860 (10): 2169-2177, <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2016.05.013>
- A15 Gorisse, L., Pietrement, C., Vuiblet, V., **Schmelzer, C. E. H.**, Köhler, M., Duca, L., Debelle, L., Fornes, P., Jaisson, S. und Gillery, P.* (2016) Protein carbamylation is a hallmark of aging. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113 (5): 1191-1196.
- A16 Mora Huertas, A. C., **Schmelzer, C. E. H.**, Luise, C., Sippl, W., Pietzsch, M., Hoehenwarter, W. und Heinz, A.* (2018) Degradation of tropoelastin and skin elastin by neprilysin. *Biochimie* 146: 73-78, <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2017.11.018>
- A17 Schröder, C. U., Heinz, A., Majovsky, P., Karaman Mayack, B., Brinckmann, J., Sippl, W. und **Schmelzer, C. E. H.*** (2018) Elastin is heterogeneously cross-linked. *J Biol Chem* 293 (39): 15107-15119, <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.004322>
- A18 Hedtke, T., Schröder, C. U., Heinz, A., Hoehenwarter, W., Brinckmann, J., Groth, T. und **Schmelzer, C. E. H.*** (2019) A comprehensive map of human elastin cross-linking during elastogenesis. *FEBS J* 286 (18): 3594-3610, <https://doi.org/10.1111/febs.14929>
- A19 Miekus, N., Luise, C., Sippl, W., Baczek, T., **Schmelzer, C. E. H.** und Heinz, A.* (2019) MMP-14 degrades tropoelastin and elastin. *Biochimie* 165: 32-39, <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2019.07.001>
- A20 **Schmelzer, C. E. H.**, Heinz, A., Troilo, H., Lockhart-Cairns, M. P., Jowitt, T. A., Marchand, M. F., Bidault, L., Bignon, M., Hedtke, T., Barret, A., McConnell, J. C., Sherratt, M. J., Germain, S., Hulmes, D. J. S., Baldock, C. und Muller, L.* (2019) Lysyl oxidase-like 2 (LOXL2)-mediated cross-linking of tropoelastin. *FASEB J* 33 (4): 5468-5481, <https://doi.org/10.1096/fj.201801860RR>
- A21 Panwar, P., Hedtke, T., Heinz, A., Andrault, P. M., Hoehenwarter, W., Granville, D. J., **Schmelzer, C. E. H.** und Brömme, D.* (2020) Expression of elastolytic cathepsins in human skin and their involvement in age-dependent elastin degradation. *Biochim Biophys Acta Gen Subj* 1864 (5): 129544, <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2020.129544>

* korrespondierende/r Autor/in

1 EINLEITUNG UND MOTIVATION

Die Evolution der Wirbeltiere ging mit der Konversion von einem offenen zu einem geschlossenen und unter hohem Druck stehenden Blutkreislaufsystem einher. Die dafür notwendige mechanische Stabilität und Elastizität der Blutgefäße wurde insbesondere durch strukturelle Veränderungen der Gefäßwände erreicht. Für eine hohe Elastizität und Dehnbarkeit sind die elastischen Fasern verantwortlich, die vor allem in größeren Blutgefäßen mit hoher Abundanz vorkommen. Die Fasern speichern die potenzielle Energie, die erforderlich ist, um den Blutfluss während der Diastole aufrechtzuerhalten und ermöglichen auf diese Weise die ordnungsgemäße Herz-Kreislauf-Funktion.

Elastische Fasern kommen außerdem in der extrazellulären Matrix (EZM) vieler weiterer Organe vor, die für ihre physiologische Funktion reversibel verformbar sein müssen. Dazu gehören die Lungen, die Haut, elastischer Knorpel, Faserknorpel und elastische Bänder. Die elastischen Fasern haben Durchmesser zwischen 1 μm und 5 μm und bestehen aus einem äußeren Mantel aus Fibrillin-reichen Mikrofibrillen und einem dichten Kern aus quervernetztem Elastin, der über 90 % des Gesamtvolumens ausmacht, wie dies schematisch in **Abb. 1** gezeigt ist.

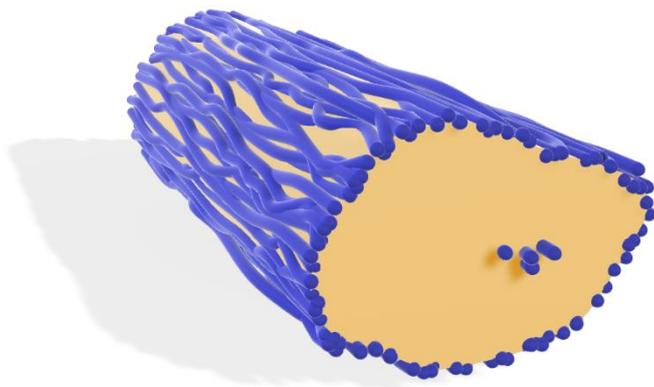


Abb. 1: Elastische Fasern bestehen aus einem Kern aus Elastin (gelb dargestellt) und einem Mantel aus Fibrillin-Mikrofibrillen (blau dargestellt).

Die Bildung der elastischen Fasern *in vivo* wird als Elastogenese bezeichnet. Sie beginnt beim Fötus ungefähr zur Mitte der Schwangerschaft und setzt sich während der ersten Lebensjahre fort, wobei sich ihre Produktion mit zunehmendem Alter sukzessive reduziert ([Keeley, 1979](#)). In adulten Geweben werden praktisch keine funktionalen neuen Fasern mehr gebildet und kaum erneuert ([Roten et al., 1996](#); [Ritz-Timme et al., 2003](#)), weshalb Schädigungen elastischer Fasern irreversibel sind. Eine Ausnahme ist die Gebärmutter, in der Elastin nach jeder Geburt abgebaut wird und die Elastogenese mit jeder weiteren Schwangerschaft erneut einsetzt ([Starcher und Percival, 1985](#)). Die Faserbildung ist ein sehr

komplexer und mehrstufiger Vorgang, der die Involvierung zahlreicher Proteine sowie anderer Moleküle erfordert ([Baldwin et al., 2013](#)). Obwohl eine Vielzahl direkt oder indirekt an der Elastogenese beteiligter Moleküle identifiziert wurde, ist noch immer wenig über ihre genauen Rollen und die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen bekannt.

Das Grundgerüst der Fasern bilden die Mikrofibrillen, bei denen es sich um Filamente mit 10 nm bis 12 nm Durchmesser handelt und die hauptsächlich aus Fibrillinen bestehen. Das sind ca. 350 kDa große, modular aufgebaute Glykoproteine, die einen hohen Cystein Gehalt von ca. 13 % besitzen. Aus Sicht der Evolution gehören die Mikrofibrillen zu den ältesten makromolekularen Molekülverbänden. Die Fibrilline entstanden noch vor der Aufspaltung von Cnidaria und Bilateria und somit vor mehr als 600 Millionen Jahren. Seitdem haben sie sich bemerkenswerterweise kaum verändert ([Robertson et al., 2011](#)). Fibrilline sind von den Nesseltieren bis zu den Säugetieren sehr weit verbreitet und verleihen, häufig ergänzt durch Elastin, dynamischen Bindegewebe Elastizität ([Piha-Gossack et al., 2012](#)). In einigen Vertebratengewebe, wie z.B. den Ziliarzonen des Auges oder der Pulpa dentis, treten Mikrofibrillen auch ohne Elastin in Form paralleler Bündel, den sogenannten Oxytalanfasern, auf ([Shuttleworth et al., 1992](#); [Davis et al., 2002](#)).

Im Gegensatz zur Fibrillinfamilie kommt das zweite für die Bildung der elastischen Fasern wesentliche Protein, Elastin, in niederen Chordatieren und allen Invertebraten nicht vor ([Sage und Gray, 1979](#)). Elastin erschien relativ spät in der Evolution und ist eine Synapomorphie der Gnathostomata. Cyclostomata wie Schleimaale oder Neunaugen, von denen angenommen wird, dass sie sich vor der Entwicklung der Knochen und des Dentins von den anderen Wirbeltierklassen abgespalten haben, besitzen hingegen kein Elastin. Es wurde jedoch in Neunaugen ein Protein nachgewiesen, das Lamprin genannt wurde und einige Eigenschaften mit Elastin gemeinsam hat. Es unterscheidet sich allerdings auch in vielen Merkmalen, einschließlich der Art der Quervernetzungen ([Robson et al., 1993](#); [Fernandes und Eyre, 1999](#)).

Elastin ist ein äußerst langlebiges Protein mit einer Halbwertszeit von mehr als 70 Jahren im Menschen ([Shapiro et al., 1991](#)) und bemerkenswerten Eigenschaften wie einem sehr geringen elastischen Modul zwischen 0,3 und 1,5 MPa^b ([Koenders et al., 2009](#)) sowie einer hohen metabolischen wie mechanischen Stabilität. Elastin durchläuft beispielsweise als Bestandteil der Blutgefäße während der durchschnittlichen menschlichen Lebensspanne mehr als 3 Milliarden Zyklen der Dehnung und Relaxation. In seiner reifen Form ist Elastin hydrophob und vollständig unlöslich, jedoch ist seine hydrophobe Hydratation Voraussetzung für die elastischen Eigenschaften ([Li et al., 2001](#)). Während getrocknetes Elastin hart

^b Zum Vergleich: Kollagene sind mit einem Elastizitätsmodul zwischen 1 GPa und 2 GPa relativ unelastisch.

und spröde ist, lässt sich zuvor in Wasser gequollenes Elastin leicht dehnen und kehrt danach in seine ursprüngliche Form zurück.

Die Ursache für die Fähigkeit Elastins nach einer Dehnung wieder in seine Ausgangsform zurückzukehren, liegt ganz wesentlich in einer mit der Relaxation verbundenen Erhöhung der Entropie begründet. Obgleich in der Vergangenheit verschiedene Strukturmodelle vorgeschlagen wurden, die die Funktionsweise Elastins zu beschreiben versuchten, konnte keines die reversible Elastizität auf struktureller Ebene zufriedenstellend erklären ([Li und Daggett, 2002](#)). Trotz einer Vielzahl von Charakterisierungsstudien, die seit den 1960er Jahren unter Verwendung unterschiedlicher spektroskopischer und mikroskopischer Methoden sowie der Röntgendiffraktometrie durchgeführt wurden [für eine Übersicht siehe ([Schmelzer, 2016](#))], existieren bis heute nur relativ begrenzte Informationen zum strukturellen Aufbau des elastischen Fasernetzwerks. Dies liegt vor allem an der schweren Zugänglichkeit Elastins für analytische Untersuchungen aufgrund der einzigartigen Kombination verschiedener Eigenschaften (siehe hierzu Kapitel 2.3), zu denen der polymere Charakter und die vollkommene Unlöslichkeit gehören.

Darüber hinaus verfügt Elastin zwischen den Einheiten seines Monomers Tropoelastin (TE) über eine Vielzahl unterschiedlicher Quervernetzungen, deren Vorhandensein eine wesentliche Voraussetzung für die Elastizität ist. Das aus den Quervernetzungen resultierende Netzwerk ermöglicht während der Verformung des Gewebes die Verteilung der mechanischen Kräfte über das gesamte Biopolymer und hilft nach der Verformung dem Gewebe, seine Form wiederzuerlangen. Zwar sind die meisten Quervernetzungsarten schon seit langem bekannt ([Eyre et al., 1984](#); [Schmelzer et al., 2020](#)), doch fehlt die genaue Kenntnis, welche Aminosäurereste zwischen den einzelnen Monomeren welche kovalenten Bindungen eingehen. Eines der Ziele war es daher, Methoden zu entwickeln und mit diesen die einzigartigen Quervernetzungen sowie weitere posttranslationale Modifikationen (PTMs) in Elastin aufzuklären, um dadurch zu einem besseren Verständnis der Bildung und des Aufbaus Elastins und elastischer Fasern beizutragen.

Obwohl Elastin eine außergewöhnlich hohe Lebensdauer besitzt und insgesamt sehr resistent gegenüber verschiedenen inneren und äußeren Einflüssen ist, durchläuft es im Laufe des Lebens eine Reihe von Veränderungen und Schädigungen. Diese gehen auf mechanische Beanspruchungen, die Ablagerung von Lipiden, das Binden von Calcium sowie weitere nicht-enzymatische und enzymatische Modifikationen zurück. Insbesondere der Einfluss aberrant exprimierter elastinabbauender Enzyme aus den Familien der Matrix-Metallo-, Serin- oder Cysteinproteasen kann zur Schädigung elastischer Fasern führen. Diese Veränderungen können zur Verringerung bis hin zum vollkommenen Verlust der Funktionsfähigkeit von dynamischen Geweben führen.

Zahlreiche Untersuchungen haben ergeben, dass Elastin nicht nur große Bedeutung als Strukturprotein hat und den Aufbau ebenso wie die biomechanischen Eigenschaften der EZM beeinflusst, sondern dass es auch eine wichtige Rolle bei verschiedenen physiologischen Prozessen spielt. Elastinpeptide (engl. *elastin-derived peptides*, EDPs), die während des Abbaus von Elastin freigesetzt werden, weisen teilweise biologische Wirkungen auf. Derartige bioaktive EDPs werden auch als Elastokine bezeichnet. Sie bilden eine Untergruppe der Matrikine, bei denen es sich per Definition um bioaktive Stoffe handelt, die durch die Proteolyse von EZM-Proteinen freigesetzt werden. Elastokine können beispielsweise die Angiogenese fördern und verschiedene Zellaktivitäten wie Zelladhäsion, Chemotaxis, Migration, Proliferation, Proteaseaktivierung und Apoptose beeinflussen ([Duca et al., 2004](#); [Scandolera et al., 2016](#)).

Die Schädigung Elastins ebenso wie die zuvor genannten, durch Elastokine ausgelösten, biologischen Prozesse sind an der Entstehung und dem Fortschreiten verschiedener schwerwiegender Erkrankungen wie Aortenstenose, Arteriosklerose, Aortenaneurysma und Lungenemphysem beteiligt und spielen eine wichtige Rolle bei Prozessen wie der Hautalterung und dem Krebsgeschehen ([Antonicelli et al., 2007](#); [Robert et al., 2008](#); [Devy et al., 2010](#)). Insgesamt hat die Schädigung elastischer Fasern einen großen Einfluss auf Erkrankungen und Sterblichkeit. Es ist daher von großer Bedeutung, elastinschädigende Prozesse im Detail zu verstehen, um Strategien zur Prävention und Therapie entwickeln zu können. Ein weiteres Ziel der dieser Schrift zugrundeliegenden Forschungsarbeiten war es daher, neben Aspekten der Bildung und Reifung Elastins auch die Prozesse seiner Schädigung durch extrazellulär vorkommende Proteasen näher zu untersuchen.

Erkenntnisse aus dieser Arbeit sollen zum Wissensstand der Elastogenese und des Elastinabbaus beitragen. Ein besseres Verständnis der Bildung elastischer Fasern sowie der Wechselwirkungen ihrer Bestandteile und Abbauprodukte ist erforderlich, um die Erkennung und Behandlung genetischer und erworbener elastischer Faserkrankheiten voranzutreiben. Genaue mechanistische Informationen werden auch benötigt, um der Elastinschädigung im Körper entgegenzuwirken und um Behandlungsmöglichkeiten zu entwickeln, mit denen sich die Elastogenese erneut initiieren lässt. Auf diese Weise ließe sich die Bildung von funktionellen elastischen Fasern in regenerierenden Geweben wieder anstoßen. Eine bessere Kenntnis zum Aufbau Elastins kann zudem helfen, neuartige Biomaterialien und Tissue-Engineering-Gerüststrukturen zu entwickeln, die der EZM in Aufbau, Zusammensetzung und mechanischen Eigenschaften nachempfunden sind.

2 FORSCHUNGSERGEBNISSE

2.1 Isolierung Elastins aus Gewebe

(A1 Taddese *et al.*, 2008; A7 Schmelzer *et al.*, 2012; A8 Sivan *et al.*, 2012; A14 Schmelzer *et al.*, 2016)

Der überwiegende Teil der in der Vergangenheit von unterschiedlichen Arbeitsgruppen durchgeführten Strukturuntersuchungen fand nach Totalhydrolyse von Elastin in stark sauren oder basischen Medien statt. Für die dazu notwendige Isolierung des Proteins aus tierischem und menschlichem Gewebe kamen relativ aggressive Methoden zum Einsatz. Diese Verfahren, die beispielsweise eine Behandlung mit Natronlauge, Säuren oder das Autoklavieren umfassen, resultieren in einem Produkt, das bereits geschädigt ist ([Daamen *et al.*, 2001](#); [Daamen *et al.*, 2005](#)). Folglich ergeben Analysen von auf diese Weise isoliertem Elastin insgesamt nur sehr eingeschränkte Einblicke in seine Struktur.

Die verschiedenen Isolationstechniken nutzen die vollständige Unlöslichkeit Elastins, seine Proteasebeständigkeit und Stabilität gegenüber hohen Temperaturen und pH-Werten [siehe Übersichtsartikel ([Mecham, 2008](#))]. Häufig verwendete Verfahren sind die sehr harsche Alkalimethode ([Lansing *et al.*, 1952](#)), die Behandlung durch Autoklavieren ([Partridge *et al.*, 1955](#)) und eine Methode, die üblicherweise als Starcher-Methode ([Starcher und Galione, 1976](#)) bezeichnet wird. Das Starcher-Protokoll ist das sanfteste unter den bisher genannten ([Mecham, 2008](#)) und kombiniert das Autoklavieren mit der anschließenden Extraktion anderer Gewebekomponenten unter Nutzung chaotroper Reagenzien und verschiedener Enzyme. Ein weiterer wichtiger Schritt ist die Inkubation mit Bromcyan (BrCN), bei der eine Vielzahl von Gewebeproteinen, einschließlich Kollagenen, gespalten wird. Dies gelingt, da BrCN an Methioninresten spaltet, die jedoch in Tropoelastin und somit auch in Elastin nicht vorkommen. Am Ende aller Verfahren besteht das verbleibende unlösliche Material nicht aus elastischen Fasern, sondern aus Elastin, das noch vernetzt ist und strukturelle Merkmale der ursprünglichen Fasern aufweist. Daamen *et al.* haben für dieses Material den passenden Begriff „Elastinfasern“ eingeführt, die im Gegensatz zu den nativen elastischen Fasern weder Fibrilline noch andere assoziierte Moleküle enthalten ([Daamen *et al.*, 2005](#)).

Die hohen Temperaturen, die während des Autoklavierens auf das Gewebe einwirken, führen jedoch zu einer erheblichen Schädigung der Elastinfasern ([Soskel und Sandburg, 1983](#); [Daamen, 2006](#)). Es ist zu berücksichtigen, dass jede Schädigung nicht nur die Morphologie des Elastins verändern, sondern auch seine Anfälligkeit für Proteasen drastisch

erhöhen kann. Neben der Unversehrtheit von Elastin ist dessen Reinheit von hoher Bedeutung, da die Anwesenheit anderer Moleküle die Aussagekraft von Studienergebnissen in Frage stellen kann. Insbesondere Kollagene stellen für die Isolation von Elastin eine Herausforderung dar, da sie in den meisten elastinhaltigen Geweben sehr abundant sind und mehrere Eigenschaften mit Elastin teilen. Dazu zählen die vollständige Unlöslichkeit sowie Ähnlichkeiten in der Aminosäurezusammensetzung und den PTMs, einschließlich einiger Quervernetzungsarten. Kollagenverunreinigungen sind daher bei Anwendung der zuvor genannten Methoden in gewissem Umfang zu erwarten. Diese sind beispielsweise bei kommerziell verfügbarem Elastin sehr ausgeprägt und so konnten sowohl in Arbeiten von Daamen *et al.* als auch in eigenen Arbeiten signifikante Kollagenrückstände nachgewiesen werden ([Daamen et al., 2001](#); [#Taddese et al., 2008](#)). In der letztgenannten Arbeit, bei der wir eine Charakterisierung des Spaltverhaltens der Matrix-Metalloprotease-12 an humanem Hautelastin vornahmen, wiesen wir zahlreiche Peptide von Kollagenen der Typen I und III nach, die ebenso wie Elastin in der Dermis vorkommen.

In jedem Fall müssen beide Aspekte, Unversehrtheit sowie Reinheit der Elastinfasern, bei der Isolation berücksichtigt werden, wenn Elastin zu strukturellen Untersuchungen oder proteolytischen Studien verwendet werden soll. Da derartige Fragestellungen Schwerpunkt dieser Arbeit waren, war es notwendig, eine Methode zur Elastinisolierung zu entwickeln, die beide Aspekte berücksichtigt.



Abb. 2: Wesentliche Schritte der Methode zur Isolation Elastins aus Gewebe: Das Verfahren macht sich die Resistenz Elastins gegenüber verschiedenen Reagenzien und Enzymen zu Nutze, um alle weiteren Gewebebestandteile zu entfernen.

Das von uns vorgestellte Verfahren ist in **Abb. 2** skizziert und basiert auf zuvor genannten Isolationstechniken ([Daamen et al., 2001](#); [Daamen et al., 2005](#)). Es wurde jedoch in einigen Punkten, insbesondere im Hinblick auf seine Anwendbarkeit für sehr kleine Ausgangsproben wie Stanzbiopsate hin optimiert ([#Schmelzer et al., 2012](#)). Das Verfahren wurde zunächst an tierischem elastinhaltigen Gewebe erprobt und schließlich an menschlichen Hautbiopsaten von jungen und älteren Personen evaluiert und mit Hautelastin, das mittels der Starcher-Methode isoliert wurde, verglichen. In **Abb. 3** ist ein mit dieser neuen Methode isoliertes Stück bovines Elastin in trockenem sowie befeuchtetem Zustand gezeigt.

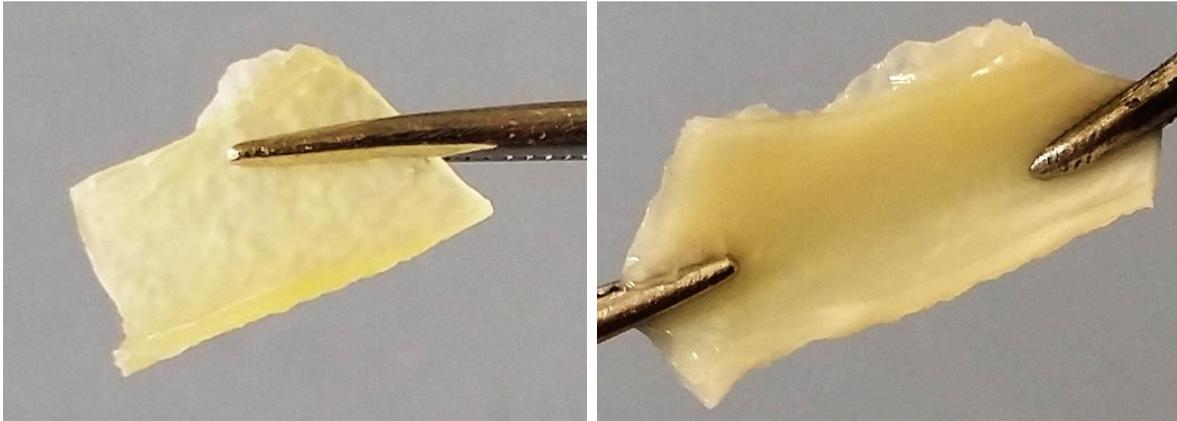


Abb. 3: Isoliertes Elastin aus Rinderaorta (Kantenlänge der Probe ca. 1 cm): links im trockenen Zustand; rechts nach Befeuchtung und während Dehnung.

Das Verfahren ist vergleichsweise aufwändig und die verschiedenen Einzelschritte benötigen, ausgehend von einem elastinhaltigen Gewebestück, bis zum reinen Elastin ca. fünf Arbeitstage. Unsere Methode wurde bereits erfolgreich an einer Vielzahl von Geweben ([#Schmelzer et al., 2016](#)) unterschiedlicher Spezies aus den Klassen der Säugetiere, Fische, Vögel und Amphibien getestet ([Nagel, 2013](#); [Schröder, 2016](#)). Einzig bei Geweben wie der Bandscheibe, in denen neben Elastin größere Mengen Kollagen des Typs II vorkommen, konnten nach der Isolation neben Elastin noch größere Anteile Kollagen nachgewiesen werden ([#Sivan et al., 2012](#); [#Schmelzer et al., 2016](#)).

Die Aufreinigungsmethode ermöglicht es, Elastin auch aus sehr kleinen Gewebestücken wie 4 mm-Stanzbiopsaten der Haut^c zu isolieren, ohne dass Proben für nachfolgende Untersuchungen vereinigt werden müssen. Die gewonnenen Mengen sind insbesondere für eine nachfolgende Hydrolyse und Charakterisierung mittels der Kombination aus Flüssigchromatographie und Massenspektrometrie (LC/MS) ausreichend, so dass es möglich ist, Untersuchungen auf molekularer Ebene durchzuführen. Dadurch lassen sich beispielsweise Veränderungen wie posttranslationale Modifikationen aufklären, die während des Alterns oder im Zusammenhang mit Erkrankungen auftreten. Diese Isolationsmethode kam ohne Veränderung der wesentlichen Schritte bei einem Großteil der in dieser Schrift vorgestellten Arbeiten zum Einsatz.

^c Der relative Elastinanteil der menschlichen Haut beträgt bezogen auf das Trockengewicht ca. 3 %.

2.2 Elastogenese

Die Assemblierung elastischer Fasern ist ein äußerst komplexer und bis heute unvollständig verstandener Vorgang. Dieser beinhaltet die Bildung von Fibrillin-Mikrofibrillen, die Synthese von TE, die intrazelluläre Prozessierung, die Sekretion in den Extrazellularraum und die dortige Assemblierung und Quervernetzung. Die momentan als wesentlich angesehenen Schritte sind in **Abb. 4** grafisch umrissen und werden im Folgenden im Detail beschrieben.

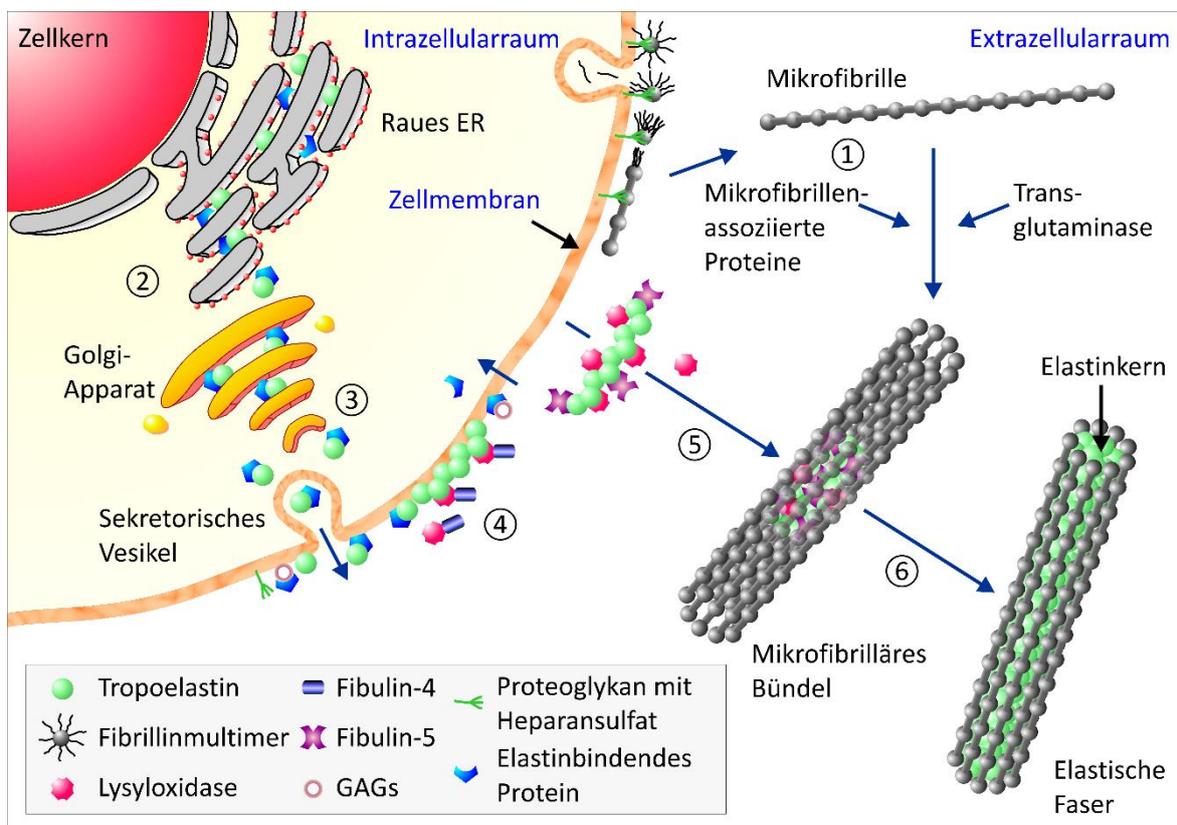


Abb. 4: Schema zum Ablauf der Elastogenese: (1) Fibrillin und Mikrofibrillen-assoziierte Proteine werden in den extrazellulären Raum sezerniert, multimerisieren zu perlenkettenartigen Strukturen und bilden eine mikrofibrilläre Gerüststruktur. (2) TE wird am rauen endoplasmatischen Retikulum (ER) gebildet, wo es an das Chaperon *elastin-binding protein* (EBP) bindet. (3) Der Komplex aus EBP und TE durchläuft dann den Golgi-Apparat und wird über sekretorische Vesikel extrazellulär an die Zellmembran abgegeben. (4) Der TE-EBP-Komplex dissoziiert infolge der Wechselwirkung von EBP mit Glykosaminoglykanen (GAGs), worauf das freigewordene TE sphärische Strukturen an der Zelloberfläche bildet. Fibulin-4 vermittelt die Interaktion zwischen TE und der Lysyloxidase bzw. Lysyloxidase-ähnlichen Enzymen. Der damit verknüpften Oxidation von Lysinresten folgen eine Reihe von Kondensationsreaktionen, aus denen kovalente intra- und intermolekulare Quervernetzungen hervorgehen. (5) Nachdem die Cluster aus TE-Molekülen eine kritische Größe erreicht haben, lösen

sie sich von der Plasmamembran und bewegen sich durch die EZM. Es wird angenommen, dass Fibulin-5 bei diesem Vorgang eine Rolle spielt und das unreife Elastin zu den Fibrillin-Mikrofibrillen lenkt. (6) Die Elastinaggregate verschmelzen auf diesen zu größeren Anordnungen und vernetzen weiter [modifiziert nach ([#Schmelzer, 2016](#))].

2.2.1 Bildung der Mikrofibrillen

Die Elastogenese beginnt mit der Bildung von Mikrofibrillen, die als Gerüststruktur für die spätere Elastinanlagerung fungieren. Ihre Grundbausteine, die Fibrilline ([Ramirez, 2000](#)), werden von mesenchymalen Zellen wie Fibroblasten oder glatten Muskelzellen sezerniert. Beim Menschen gibt es die drei Fibrillin-Isoformen Fibrillin-1, -2 und -3, die eine hohe Übereinstimmung in ihrer Aminosäuresequenz aufweisen. Jede Isoform besitzt 43 Calcium-bindende epidermale Wachstumsfaktor^d-ähnliche Domänen, fünf EGF-ähnliche Domänen, sieben acht-Cystein-haltige Domänen sowie zwei sogenannte Hybriddomänen ([Baldwin et al., 2013](#)). Zudem sind weitere Proteine bekannt, die mit Mikrofibrillen assoziiert sind ([Thomson et al., 2019](#)). Dazu gehören die Mikrofibrillen-assoziierten Glykoproteine (MAGPs) ([Mecham und Gibson, 2015](#)), EMILINs (Abk. für engl. *elastin microfibril interfacier*) ([Bressan et al., 1993](#)), ADAMTS (Abk. für engl. *a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs*), ADAMTS-ähnliche Proteine (ADAMTSL) ([Brocker et al., 2009](#)) und LTBP (Abk. für engl. *latent TGFβ binding proteins*) ([Isogai et al., 2003](#)). Fibrillin-1 ist in allen Geweben der Hauptbestandteil der Mikrofibrillen und wird fortwährend exprimiert. Fibrillin-2 und Fibrillin-3 hingegen sind auf die Entwicklung fetaler Gewebe beschränkt ([Zhang et al., 1994](#); [Charbonneau et al., 2010](#); [Sabatier et al., 2011](#)). Fibrillin-3 scheint zudem in bestimmten Geweben, wie dem Gehirn, einzigartige Funktionen zu erfüllen ([Corson et al., 2004](#)).

Während oder nach der Sekretion der Vorläuferproteine durchlaufen Profibrilline durch Furin-ähnliche Proprotein-Konvertasen eine N- und C-terminale Spaltung an dem Erkennungsmotiv RXK/RR, wodurch die ~320 kDa großen reifen Formen entstehen ([Milewicz et al., 1995](#); [Raghunath et al., 1999](#)). Dieser Schritt ist für die anschließende lineare Multimerisierung zu perlenkettenartigen Strukturen und die Assemblierung an der Zelloberfläche erforderlich ([Marson et al., 2005](#); [Hubmacher et al., 2008](#)). Jensen *et al.* haben zudem gezeigt, dass das Vorhandensein des N-terminalen Propeptids für die Sekretion von Fibrillin-1 essenziell ist, da es die vorzeitige intrazelluläre Assemblierung verhindert. Die anschlie-

^d engl. *epidermal growth factor* (EGF)

ßende Spaltung des Propeptids ist jedoch entscheidend für die ordnungsgemäße Assemblierung der Mikrofibrillen ([Jensen et al., 2014](#)). Es gibt Hinweise darauf, dass die Multimerisierung die Affinität der Fibrillin-Kügelchen zu Fibronectin, zum N-Terminus von Fibrillin-1 und insbesondere zu Heparin/Heparansulfat begünstigt ([Sabatier et al., 2014](#)). Die Fibrillin-Multimere interagieren wahrscheinlich zuerst mit Heparansulfat-haltigen Proteoglykanen an der Zelloberfläche über C-terminale Bindungsstellen und bauen dann fokale Adhäsionen auf. Diesem Prozess folgen Wechselwirkungen zwischen den N- und C-Termini der Fibrillinmoleküle, die die Entstehung der perlenkettenartigen Strukturen in einer parallelen Kopf-Schwanz-Abfolge sowie ihre laterale Wechselwirkung vermitteln ([Reinhardt et al., 1996](#); [Lin et al., 2002](#)). Die größer werdenden Mikrofibrillen werden anschließend zu einem Fibronectin-Netzwerk transportiert, von dem angenommen wird, dass es eine wichtige Rolle bei der Stabilisierung der neu gebildeten Mikrofibrillen und/oder der Förderung ihrer Wechselwirkung mit anderen Mikrofibrillenproteinen spielt ([Sabatier et al., 2014](#)). Das Fibrillin-Netzwerk kann zudem quervernetzt werden, wodurch die dreidimensionalen fibrillären Strukturen weiter stabilisiert werden. Die bisher nachgewiesenen Quervernetzungen sind intermolekulare Disulfidbrücken ([Reinhardt et al., 2000](#)) und $\epsilon(\gamma\text{-Glutamyl})\text{-Lysin}$ -Quervernetzungen, die von Enzymen der Transglutaminasefamilie katalysiert werden ([Qian und Glanville, 1997](#)). Fibrillin-1 kann auch über Integrine wie $\alpha_5\beta_1$ und $\alpha_v\beta_3$ mit Zellen interagieren. Es ist jedoch nicht bekannt, ob diese Wechselwirkungen für die Mikrofibrillen-anordnung oder für gewebespezifische Funktionen erforderlich sind ([Bax et al., 2007](#)).

2.2.2 Die Synthese Tropoelastins

(A18 Hedtke et al., 2019; A9 Bochicchio et al., 2013; A14 Schmelzer et al., 2016)

Bei der Mehrzahl der Wirbeltierspezies wird TE durch ein einziges Gen (ELN) codiert ([Chung et al., 2006](#)). Knochenfische und Froschlurche stellen nach jetzigem Stand Ausnahmen dar, denn sie besitzen jeweils zwei nicht-allelische Gene für TE. Die Expression TEs erfolgt in elastogenen Zellen, zu denen Fibroblasten ([Mecham et al., 1985](#)), glatte Gefäßmuskelzellen ([Narayanan et al., 1976](#)) Endothelzellen ([Mecham et al., 1983](#)), Chondrozyten ([Brown-Augsburger et al., 1996](#)) und Keratinozyten ([Kajiyama et al., 1997](#)) gehören. Die prä-mRNA Tropoelastins unterliegt einem ausgeprägten alternativen Spleißen, wodurch es zur Bildung unterschiedlicher Isoformen kommt. Das Spleißen erfolgt ohne Beeinflussung des Leserasters, so dass ein Exon entweder einbezogen, verlängert, verkürzt oder entfernt wird. Für humanes TE wurden bisher 18 Isoformen mit Molekulargewichten zwischen 49 kDa und 69 kDa beschrieben ([Reichheld et al., 2019](#)). Die Exons, von denen berichtet wurde, dass sie häufig alternativ gespleißt werden, sind 3, 10, 11, 13, 22, 23 und 32 ([Sugitani et al., 2012](#)).

Die funktionellen Konsequenzen des alternativen Spleißens sind nicht genau bekannt, aber verschiedene Studien legen nahe, dass das Spleißen gewebespezifisch sein oder mit Entwicklungsveränderungen von Zellen zusammenhängen könnte ([Wrenn et al., 1987](#); [Parks et al., 1988](#); [Parks und Deak, 1990](#); [Heim et al., 1991](#)). Wir haben kürzlich auf Proteinebene nachgewiesen, dass innerhalb eines Gewebetyps auch mehrere durch alternatives Spleißen hervorgegangene Isoformen parallel vorkommen können ([#Hedtke et al., 2019](#)). Es wurde weiterhin gezeigt, dass das Vorhandensein oder die Abwesenheit von TE-Domänen oder durch Mutationen bedingte Veränderungen der Aminosäuresequenz verschiedene Mechanismen beeinflusst, die mit der Assemblierung von TE-Monomeren zu einem Biopolymer in Verbindung stehen. Dazu gehören Koazervations- und Quervernetzungsprozesse, die wiederum direkten Einfluss auf die resultierenden mechanischen Eigenschaften des Biopolymers haben können. Alles das legt nahe, dass Variationen in der TE-Sequenz gewebespezifische Veränderungen der Elastineigenschaften ermöglichen oder für eine abnormale Faserbildung und pathologische Gewebeveränderungen verantwortlich sein können ([Miao et al., 2017](#); [Yeo et al., 2017](#); [Tarakanova et al., 2018](#)).

Die Translation TEs findet an den Ribosomen auf der Oberfläche des rauen endoplasmatischen Retikulums statt. Danach wird das N-terminale Signalpeptid abgespalten. Bevor TE durch den Golgi-Apparat und schließlich zur Zelloberfläche transportiert wird, erfolgt eine Hydroxylierung von Prolinresten durch eine Prolylhydroxylase, vermutlich die Prolyl-4-Hydroxylase. Obgleich die Prolylhydroxylierung aufgrund ihres Vorkommens in Kollagenen zu den abundantesten PTMs in Wirbeltieren überhaupt gehört, kommt sie nur in sehr wenigen Proteinen vor. Dazu gehören neben Kollagenen und Elastin z.B. das Prion-Protein, Argonaut-2, α -Fibrinogen oder Hypoxie-induzierter Faktor 1 (HIF-1) ([Kaelin und Ratcliffe, 2008](#); [Ono et al., 2009](#); [Gorres und Raines, 2010](#)).

Das Vorhandensein Hydroxyprolins in Elastin war lange Zeit umstritten und entsprechende Nachweise in Totalhydrolysaten wurden häufig mit Kollagenverunreinigungen in Verbindung gebracht ([Bentley und Hanson, 1969](#)). Den ersten eindeutigen Nachweis auf Proteinebene erbrachten wir im Jahr 2005 in zwei Arbeiten ([#Getie et al., 2005](#); [#Schmelzer et al., 2005](#)). Wie wir zusammen mit Kolleginnen anhand von Modellpeptiden zeigen konnten, hat die Anwesenheit von Hydroxyprolin-Resten (Hyp) erhebliche Auswirkungen auf die Koazervationseigenschaften und die enzymatische Resistenz ([#Bochicchio et al., 2013](#)). In einer weiteren Studie haben wir die Modifikation systematisch an verschiedenen Prolin-Resten im Elastin in vier unterschiedlichen Spezies (Mensch, Schwein, Rind, Huhn) und sechs Geweben (Haut, Aorta, elastischer Knorpel, Bandscheibe, Nackenband und Hahnenkamm) qualitativ und quantitativ untersucht ([#Schmelzer et al., 2016](#)). Anhand der Ergebnisse dieser Studie wurde deutlich, dass die Hydroxylierung nicht zufällig erfolgt, sondern

ihr Ausmaß von Spezies und Gewebe abhängt. So konnten wir beispielsweise zeigen, dass die Prolylhydroxylierung im Elastin der Bandscheibe an den untersuchten Resten in allen Spezies im Vergleich zu den anderen Geweben erhöht ist. Insgesamt sind ca. ein Viertel aller vorhandenen Prolinreste zumindest partiell modifiziert. Der Hydroxyierungsgrad variierte an den unterschiedlichen Prolinresten zwischen 4 % und 100 %. Ferner konnte nachgewiesen werden, dass Elastin, anders als Kollagene, nicht an Lysinresten hydroxyliert wird ([#Schmelzer et al., 2016](#)).

Die Daten erlaubten zudem eine Analyse der Spezifität der Hydroxylase, die in Elastin fast ausnahmslos den Prolinrest in GXP_G-Motiven modifiziert. Prolinreste in den in Elastin ebenfalls häufig vorkommenden GXXP_G-Motiven bleiben hingegen unverändert. Diese Motive befinden sich beispielsweise in der sich im Falle des Menschen sechsfach wiederholenden Sequenz VGVAPG in Domäne 24. Dies ist insofern von Bedeutung, da TE ebenso wie Elastinpeptide, die das GXXP_G-Motiv enthalten, aufgrund der Ausbildung einer β_{VIII} -Schleife an das elastinbindende Protein (EBP), eine Untereinheit des Elastinrezeptorkomplexes (engl. *elastin receptor complex*, ERC), binden können. Diese Interaktion ist einerseits für die Sekretion TEs aus der Zelle bedeutsam ([Privitera et al., 1998](#)), andererseits können Peptide mit diesem Motiv auf diesem Weg verschiedene zelluläre Aktivitäten (beschrieben in Abschnitt 2.3.3) beeinflussen ([Wahart et al., 2019](#)). Die Ausbildung der genannten Konformation und damit die Interaktion mit dem EBP wäre im Falle einer Hydroxylierung beeinträchtigt oder verhindert.

Insgesamt zeigen unsere Ergebnisse, dass die Prolylhydroxylierung in Elastin abundant und reguliert ist sowie Auswirkungen auf die Assemblierung und Eigenschaften der elastischen Fasern hat. Inzwischen wurde ein atomistisches Modell für humanes Tropoelastin vorgestellt ([Tarakanova et al., 2018](#)), mit dessen Hilfe bereits der Einfluss der im folgenden diskutierten Allysinsbildung auf die Struktur und Beweglichkeit Tropoelastins untersucht wurde ([Ozsvar et al., 2019](#)). Die Modifikation der Prolinreste blieb darin allerdings unberücksichtigt. Unsere neuen Erkenntnisse zu Position und Grad der Hydroxylierungen können in diese Modellierung einbezogen werden und auf diese Weise realistischere Vorhersagen zur Struktur und molekularen Dynamik der Monomere ermöglichen.

2.2.3 Tropoelastins Domänenstruktur

(A14 [Schmelzer et al., 2016](#); A17 [Schröder et al., 2018](#); A18 [Hedtke et al., 2019](#))

Die Aminosäuresequenz von TE ist stark repetitiv und besteht zu ca. 80 % aus den vier Aminosäuren Gly, Ala, Val und Pro. TE besitzt hydrophobe und hydrophilere Abschnitte (für Elastin gewöhnlich als Domänen bezeichnet), die überwiegend alternierend angeordnet

sind. Sie werden von einzelnen Exons in der Weise codiert, dass sich die Domänenstruktur des Proteins in der Exon-Organisation seines Gens widerspiegelt. Die eher hydrophilen Domänen sind an der Quervernetzung beteiligt und enthalten Lys-Ala-Motive (KA-Motive), die häufig in Oligoalaninabschnitten eingebettet sind, oder Lys-Pro-Motive (KP-Motive) (siehe **Abb. 5**). In den KA-Domänen treten Lys-Reste meist als Paare oder Triplets auf, die durch zwei oder drei Ala-Reste und manchmal einem anderen Rest getrennt sind. Eine Ausnahme ist Domäne 14, die in der Literatur gewöhnlich als hydrophobe Domäne eingestuft wird ([Mecham, 2008](#); [Yeo et al., 2017](#)). Die Domäne 14 hat jedoch eher hydrophilen Charakter und besitzt zudem einen Lys-Rest, der, wie später gezeigt, ebenfalls in Quervernetzungen involviert ist und daher auch als KA-Domäne eingestuft werden muss. KP-Domänen haben hingegen einen oder zwei Lys-Reste und mindestens einen Pro-Rest in unmittelbarer Nachbarschaft. Humanes TE besitzt 11 KA- und 5 KP-Quervernetzungsdomänen, die insgesamt 32 Lys-Reste umfassen. Drei weitere Lys-Reste befinden sich im polybasischen Motiv KXXXRKRK der C-terminalen Domäne, die vom hochkonservierten Exon 36 codiert wird.

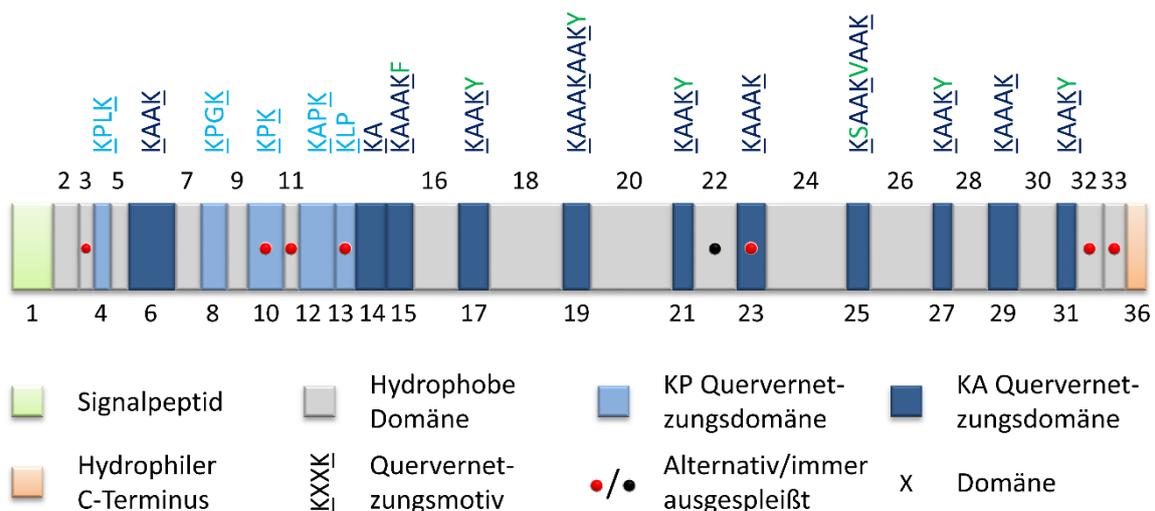


Abb. 5: Domänenstruktur von humanem Tropoelastin: Die hydrophoben Domänen (graue Kästchen) und hydrophilen Quervernetzungsdomänen (hell- und dunkelblaue Kästchen) sind größtenteils alternierend angeordnet. Die Exons einiger Domänen unterliegen alternativem Spleißen (durch rote Punkte gekennzeichnet) bzw. sind immer ausgespleißt (Domäne 22, schwarzer Punkt). Die Nummerierung der Domänen stimmt mit der Zuordnung der insgesamt 34 Exons im Gen überein. Die Breite der Kästchen entspricht der relativen Länge der Domänen. Im humanen TE-Gen fehlen die Exons 34 und 35, die während der Evolution verloren gegangen sind, aber in anderen Vertebraten vorhanden sind ([Szabo et al., 1999](#)) [modifiziert nach ([#Schmelzer und Duca, 2021](#))].

Es gilt als sicher, dass diese C-terminalen Lys-Reste nicht an Quervernetzungen mit KA- oder KP-Domänen beteiligt sind. Obgleich die genaue Rolle dieser einzigartigen Domäne noch geklärt werden muss, ist bekannt, dass sie für die Assemblierung und die Quervernetzung während der Elastogenese von entscheidender Bedeutung ist. Es wurde zum Beispiel gezeigt, dass TE-Mutanten ohne diese Sequenz weniger effizient in Elastin eingebaut werden und zudem eine abnormale Quervernetzung zeigen ([Hsiao et al., 1999](#); [Kozel et al., 2003](#)). Weitere Ergebnisse legen nahe, dass die Domäne 36 in reifem Elastin nahezu immer verändert vorliegt ([Broekelmann et al., 2008](#)). Dies ist in Übereinstimmung mit eigenen Ergebnissen. Im Rahmen der in dieser Arbeit vorgestellten Studien wurden hunderte Elastinproben aus verschiedenen Spezies isoliert und analysiert, ohne dass das KXXXRKRK-Motiv der Domäne 36 auch nur einmal vollständig wiedergefunden werden konnte ([#Schmelzer et al., 2016](#); [#Schröder et al., 2018](#); [#Hedtke et al., 2019](#)). Möglicherweise wird dieses im Zuge der Reifung abgespalten oder auf andere Weise posttranslational modifiziert und ist beispielsweise in bisher nicht identifizierte Quervernetzungen involviert.

2.2.4 Die Sekretion Tropoelastins

Intrazellulär bindet TE an das EBP, eine 67-kDa große und enzymatisch inaktive Spleißvariante der β -Galactosidase ([Hinek und Rabinovitch, 1994](#); [Hinek, 1995](#)). Das Chaperon schützt TE innerhalb der Zelle vor Abbau und Koazervation und transportiert es an die Zelloberfläche ([Blanchevoye et al., 2013](#)). Nach der Sekretion des TE-EBP-Komplexes assoziiert EBP mit den anderen beiden Untereinheiten des Elastinrezeptorkomplexes: den membranassoziierten Proteinen Protective Protein/Cathepsin A (PPCA) und Neuraminidase-1 (Neu-1) ([Wahart et al., 2019](#)). EBP interagiert wahrscheinlich auch mit Glykosaminoglykanen, von denen angenommen wird, dass sie Konformationsänderungen in EBP verursachen und somit zur Dissoziation von TE und seinem Chaperon führen ([Privitera et al., 1998](#); [Blanchevoye et al., 2013](#)). Das EBP wird in die intrazellulären, endosomalen Kompartimente zurückgeführt und assoziiert mit neu synthetisiertem TE. Man geht davon aus, dass seine Rückgewinnung für die Elastogenese von Bedeutung ist ([Hinek et al., 1995](#)).

2.2.5 Die Mikroassemblierung

Eine besondere Eigenschaft TEs ist seine Fähigkeit zur Selbstaggregation. Bei diesem für die Mikroassemblierung äußerst wichtigen Schritt handelt es sich um einen endothermen, entropisch getriebenen Prozess der Flüssig-Flüssig-Phasentrennung, der auch als Koazervation bezeichnet wird ([Muiznieks et al., 2018](#)). Dabei interagieren hydrophobe Domänen TEs,

insbesondere die von den Exons 17 bis 27 codierten Domänen, nichtkovalent miteinander ([Dyksterhuis et al., 2007](#)). Dies führt zur Bildung kugelförmiger Aggregate auf der Zellmembran ([Clarke et al., 2006](#); [Kozel et al., 2006](#)). Die Geschwindigkeit dieser Bildung, ebenso wie die Größen und Eigenschaften der Aggregate hängen *in vitro* von der TE-Konzentration, dem pH-Wert, der Temperatur und der Ionenstärke ab ([Yeo et al., 2011](#)). In einer aktuellen Arbeit wurden Daten sowohl aus Lösungs- als auch aus Festkörper-NMR-Untersuchungen verwendet, um ein Modell zu entwickeln, das die Struktur und Dynamik eines elastinartigen Polypeptids während der Selbstorganisation einschließlich der Flüssig-Flüssig-Phasentrennung und der anschließenden Quervernetzung beschreibt ([Reichheld et al., 2017](#)). Gemäß diesem Modell tritt der intramolekulare Kollaps der hydrophoben Domänen und die daraus folgende Phasentrennung aufgrund eines größeren entropischen Nachteils bei der Solvatisierung der Polypeptidketten bei erhöhter Salzkonzentration und Temperatur auf. Da die an Pro- und Gly-Resten reichen hydrophoben Domänen nicht in der Lage sind, stabile Sekundärstrukturen zu bilden ([Rauscher et al., 2006](#)), wird die Unordnung im koazervierten Zustand aufrecht erhalten. Die Quervernetzung erfolgt nach Ausschluss überschüssigen Wassers sowie Na⁺ und Cl⁻, wodurch die Koazervation weiter verstärkt wird ([Reichheld et al., 2017](#)). Es wird seit langem angenommen, dass die Koazervation für die Elastogenese essenziell ist ([Cox et al., 1974](#); [Narayanan et al., 1978](#)). Einige Studien, darunter eine von Kozel und Kollegen, die Deletionskonstrukte von TE verwendeten, deuten jedoch darauf hin, dass neben der Koazervation weitere Interaktionen für die Elastinbildung ausschlaggebend sind ([Kozel et al., 2003](#)). Wechselwirkungen der C-terminalen Region TEs, insbesondere der Domäne 30, mit mikrofibrillären Proteinen scheinen demnach ebenso für die Entstehung der elastischen Faser notwendig zu sein ([Kozel et al., 2003](#); [Sato et al., 2007](#)). Es wurde auch gezeigt, dass TE-Mutanten ohne das C-terminale, mehrfach basische Motiv KXXXRKRK aus Domäne 36 weniger effizient in reifes Elastin eingebaut werden und außerdem eine abnormale Quervernetzungen aufweisen ([Hsiao et al., 1999](#); [Kozel et al., 2003](#); [Nonaka et al., 2014](#)). Weitere Studien zeigen, dass Proteoglykane möglicherweise bei der korrekten Ausrichtung der TE-Monomere durch Wechselwirkung mit Domäne 36 eine Rolle spielen ([Broekelmann et al., 2005](#)). Die Ausrichtung der TE-Moleküle und die anschließende Vernetzung werden außerdem durch Fibulin-4 unterstützt, das die Assoziation zwischen TE und der extrazellulären Cu²⁺-abhängigen Aminoxydase Lysyloxidase (LOX) vermittelt ([Horiguchi et al., 2009](#); [Yanagisawa und Davis, 2010](#); [Nakamura, 2018](#)).

2.2.6 Die Lysyloxidase-vermittelte Quervernetzung

(A18 Hedtke *et al.*, 2019; A20 Schmelzer *et al.*, 2019)

Die Ausbildung von kovalenten Quervernetzungen wird in Elastin ebenso wie in Kollagenen durch Enzyme der Familie der Lysyloxidasen induziert. Zu ihnen gehören in Säugetieren fünf Proteine: die Lysyloxidase und die vier Lysyloxidase-ähnlichen (engl. *LOX-like*; Abk.: LOXL) Enzyme 1 bis 4 (LOXL1-4). Bezogen auf ihre Homologie können die Oxidasen in die folgenden zwei Untergruppen unterteilt werden: 1) LOX und LOXL1 und 2) LOXL2, -3 und -4. Die Enzyme der zweiten Gruppe haben eine gemeinsame Propeptidomäne, die vier cysteinereiche Scavenger-Rezeptordomänen [engl. *scavenger receptor cysteine-rich (SRCR) domains*] aufweisen, deren Funktion nicht bekannt ist. Eine kürzlich veröffentlichte Studie zu LOXL2 deutet darauf hin, dass SRCR-Domänen mit anderen Matrixproteinen interagieren und an der Bildung der EZM beteiligt sind (Umana-Diaz *et al.*, 2020).

Alle LOXs besitzen am C-Terminus eine konservierte katalytische Aminoxidase-Domäne, die aus einem Lysintyrosylchinon (LTQ)-Cofaktor und einem Kupferbindungsmotiv besteht [siehe auch Übersichtsartikel (Vallet und Ricard-Blum, 2019)]. Die Bindung von Kupfer ist für die Enzymaktivität erforderlich, weshalb ein Kupfermangel u.a. in der Bildung von elastischen Fasern und Kollagenfibrillen resultiert, die in Stabilität und Funktion deutlich eingeschränkt sind. LOX und LOXLs induzieren nicht nur Vernetzungen in Kollagenen und Elastin, sondern besitzen auch eine Vielzahl weiterer biologischer Funktionen und spielen beispielsweise eine Schlüsselrolle bei Erkrankungen wie Krebs und Fibrose (Trackman, 2016).

Die für die ordnungsgemäße Quervernetzung von TE nachgewiesenen Enzyme sind LOX und LOXL1 (Liu *et al.*, 2004). Beide Enzyme werden als Proform sezerniert und erfordern eine proteolytische Prozessierung durch Procollagen-C-Proteinasen (Rucker *et al.*, 1998). Nach der Aktivierung katalysieren sie extrazellulär die oxidative Desaminierung von Lysinresten (Liu *et al.*, 2004). Insbesondere kondensiert die in KA- oder KP-Domänen befindliche ϵ -Aminogruppe von Lys-Resten mit einer der LTQ-Carbonylgruppen unter Bildung eines kovalenten Zwischenprodukts. Die anschließende Hydrolyse setzt das aminomodifizierte LTQ und den α -Aminoadipinsäure- δ -semialdehyd frei (siehe **Abb. 6**), der allgemein als Allysin (Lya) bezeichnet wird.

Die anschließende LTQ-Regeneration wird durch Cu^{2+} vermittelt und ist mit der Freisetzung jeweils eines Moleküls Wasserstoffperoxid und Ammoniak verbunden (Smith-Mungo und Kagan, 1998; Akagawa und Suyama, 2001). Lya ist äußerst reaktiv und beteiligt sich an der nachfolgenden Bildung der Quervernetzungen.

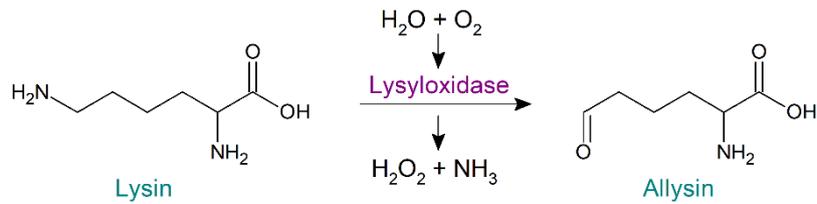


Abb. 6: Der Quervernetzung geht die oxidative Desaminierung der Seitenketten von Lysinresten voraus. Aus der Reaktion, die Sauerstoff benötigt und bei der Wasserstoffperoxid frei wird, geht ein reaktiver Aldehyd hervor, der als Allysin bezeichnet wird.

Wir konnten zeigen, dass im Durchschnitt ungefähr 90 % aller Lys-Reste je TE-Molekül modifiziert werden, d.h. sie sind entweder zu Lya derivatisiert oder Bestandteil der Quervernetzungen ([#Hedtke et al., 2019](#)). Das weist darauf hin, dass die Modifikation partiell ist. Dies ist für die nachfolgenden, nicht-enzymatischen Kondensationsreaktionen von grundlegender Bedeutung, da die meisten Reaktionen das Vorhandensein freier Lys-Reste erfordern. Wir haben zudem vor kurzem gezeigt, dass auch LOXL2 *in vitro* mit TE interagiert und dabei Lysinreste oxidativ desaminiert ([#Schmelzer et al., 2019](#)). Auf diese Weise gelang die Herstellung eines artifiziellen Elastins, das nicht nur die typischen Quervernetzungen wie Desmosin und ähnliche mechanischen Eigenschaften wie reifes Elastin aufwies (siehe **Abb. 7**), sondern auch eine erhöhte enzymatische Stabilität besaß. Dieses künstliche Elastin ist vielversprechend für Anwendungen im Bereich Tissue Engineering, bei denen biomimetische und zu Zellen kompatible Materialien benötigt werden.



Abb. 7: Mit LOXL2 quervernetztes Tropoelastin während (links) und nach Dehnung (rechts). Für das Material wurde ein reduzierter Elastizitätsmodul von ~190 kPa ermittelt, womit es eine mit reifem Elastin vergleichbare Elastizität aufweist ([#Schmelzer et al., 2019](#)).

Der Nachweis des gemeinsamen Vorkommens der beiden Proteine, LOXL2 und TE, in Gefäßwänden *in vivo* legt zudem nahe, dass LOXL2 an der Elastogenese beteiligt ist. Weiterhin konnten wir in der Studie mittels Röntgenstreuung und elektronenmikroskopischen Untersuchungen die niedrig-aufgelöste Struktur von LOXL2 bestimmen ([#Schmelzer et al., 2019](#)).

Quervernetzungsstrukturen

Aus den spontan ablaufenden Kondensationsreaktionen gehen unterschiedliche Arten von Quervernetzungen hervor, die sich nach der Anzahl der jeweils involvierten Lys-Reste in bi-, tri-, tetra- und pentafunktionale Quervernetzungen einteilen lassen. In einigen länger zurückliegenden Arbeiten wurde der Mechanismus der Bildung der unterschiedlichen Quervernetzungen untersucht und dabei gezeigt, dass die niedrigfunktionalen Quervernetzungsstrukturen erforderliche Zwischenprodukte für die Bildung höherfunktionaler Quervernetzungstypen sind ([Davis und Anwar, 1970](#); [Akagawa und Suyama, 2000](#)). **Abb. 8** zeigt eine Übersicht [nach ([#Schmelzer et al., 2020](#))] über die vorgeschlagenen unterschiedlichen Synthesewege. Sie werden im Folgenden diskutiert.

Die einfachsten Quervernetzungsstrukturen, die sowohl in Elastin als auch in Kollagen vorkommen, sind bifunktionale Aminosäuren. In Elastin gibt es davon zwei Arten, die entweder durch Kondensation von Lys- mit Lya- oder zwei Lya-Einheiten gebildet werden. Die Kondensation von Lya mit einem nicht modifizierten Lys-Rest bildet eine Schiff'sche Base (Imin), die als 6,7-Dehydrolysinonorleucin (Δ LNL) bezeichnet wird. Δ LNL kann zum sekundären Amin (LNL) reduziert werden, dessen chemische Struktur mit Bezug zum zentralen Stickstoffatom symmetrisch ist. Durch Aldolkondensation zweier Lya-Reste entsteht Allylsinaldol (AA), ein α,β -ungesättigter Aldehyd (Enal), der leicht mit einem weiteren unmodifizierten Lys-Rest reagieren kann, woraus das trifunktionale Dehydromerodesmosin (Δ MDES) hervorgeht. Die Schiff'sche-Base-Bindung in Δ MDES kann analog zu Δ LNL zu Mero-desmosin (MDES) reduziert werden. Wie in Untersuchungen mit Modellsubstanzen gezeigt wurde, kann Δ MDES auch aus der Kondensation des Enamintautomers von Δ LNL und Lya entstehen ([Davis und Anwar, 1970](#)). Aus den Reaktionen von Δ LNL mit AA sowie Δ MDES mit Lya gehen die tetrafunktionalen Quervernetzungen Desmosin (DES) und Isodesmosin (IDES) hervor, bei denen es sich um strukturelle Isomere handelt und die in keinen weiteren Säugetierproteinen vorkommen. Δ LNL, AA und Δ MDES können daher als Zwischenprodukte angesehen werden, die zu höherfunktionalen Quervernetzungen weiterkondensieren. Nach der Iminreduktion können LNL und MDES jedoch als stabile Quervernetzungen in ausgereiftem Elastin erhalten bleiben. Der Mechanismus dieser in der EZM stattfindenden Reduktion ist im Hinblick auf das Reduktionsmittel nicht genau bekannt. Raju und Anwar schlugen vor, dass Dihydropyridine, die anfänglichen Kondensationsprodukte von DES und IDES, in der Nähe von Quervernetzungen vom Imintyp als Reduktionsmittel dienen und die Umwandlung von Iminen zu sekundären Aminen in Δ LNL und Δ MDES initiieren könnten ([Raju und Anwar, 1987](#)). Eine andere trifunktionale quervernetzende Aminosäure, die in Elastinhydrolysaten identifiziert wurde, ist Cyclopentenosin, das eine 2-Cyclopenten-1-on-

Struktur besitzt. Es entsteht durch Cyclisierung eines $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -ungesättigten Aldehyds, der aus der Aldolkondensation von drei Lys-Resten hervorgeht ([Nakamura et al., 1992](#); [Akagawa et al., 1999](#)).

Die Bildung der tetrafunktionalen quervernetzenden Aminosäuren DES und IDES wird durch die paarweise Anordnung von Lys-Resten innerhalb der Primärstruktur von TE unterstützt (siehe **Abb. 5**). DES und IDES wurden zuerst von Partridge, Elsdon und Thomas in den frühen 1960er Jahren aus Elastinhydrolysaten isoliert und anfänglich als "Verbindung A" und "Verbindung M" bezeichnet ([Partridge et al., 1963](#)). Weitere Analysen derselben Arbeitsgruppe ergaben, dass diese Verbindungen isomere Pyridinium-Derivate sind, d.h. sie besitzen einen stickstoffhaltigen aromatischen Heterocyclus aus sechs Atomen, der im Falle von DES an den Positionen 1, 3, 4 und 5 und bei IDES an den Positionen 1, 2, 3 und 5 durch die Reste der früheren Lys-Seitenketten substituiert ist ([Thomas et al., 1963](#)). Insgesamt sind für die Bildung von DES und IDES ein unmodifizierter Lys-Rest und drei Lys-Reste erforderlich. Der Ring wird dann durch das nicht modifizierte Stickstoffatom der ϵ -Aminogruppe von Lys, den ϵ -Kohlenstoff eines Lys-Restes und die δ - und ϵ -Kohlenstoffe der beiden anderen Lys-Reste gebildet (siehe **Abb. 8**). Die Wertigkeit des Stickstoffheteroatoms bewirkt eine intrinsische positive Ladung, die für die Analyse der molekularen Quervernetzungen vorteilhaft ist, wie dies im Abschnitt 2.2.8 erläutert wird. Abgesehen von DES und IDES wurden andere von Pyridinium abgeleitete Quervernetzungsstrukturen in Elastin identifiziert. Dazu gehören Neodesmosin (trifunktional) ([Nagai, 1983](#)), Pentasin ([Starcher et al., 1987](#)) und Allodesmosin (beide pentafunktional) ([Suyama und Nakamura, 1990](#)).

Neben der Funktionalität, die durch die Anzahl der beteiligten Aminosäurereste bestimmt wird, können Quervernetzungen auch nach der Anzahl der beteiligten TE-Monomere (intramolekular vs. intermolekular) oder involvierten Quervernetzungsdomänen (intradomain vs. interdomain) eingeordnet werden. Während Intra-Domänen-Verknüpfungen immer auch intramolekular sind, können Inter-Domain-Verknüpfungen sowohl intra- als auch intermolekular gebildet werden. Die einzigartigen tetrafunktionalen Quervernetzungen in Elastin verbinden immer mindestens zwei Domänen, können aber theoretisch bis zu vier Domänen verbinden. Es wird allgemein angenommen, dass die Bildung von DES und IDES durch Kondensation eines AA mit einer Intra-Domänen-Quervernetzung des Typs Δ LNL erfolgt, wodurch schließlich zwei Peptidketten verbunden werden ([Gray, 1977](#)).

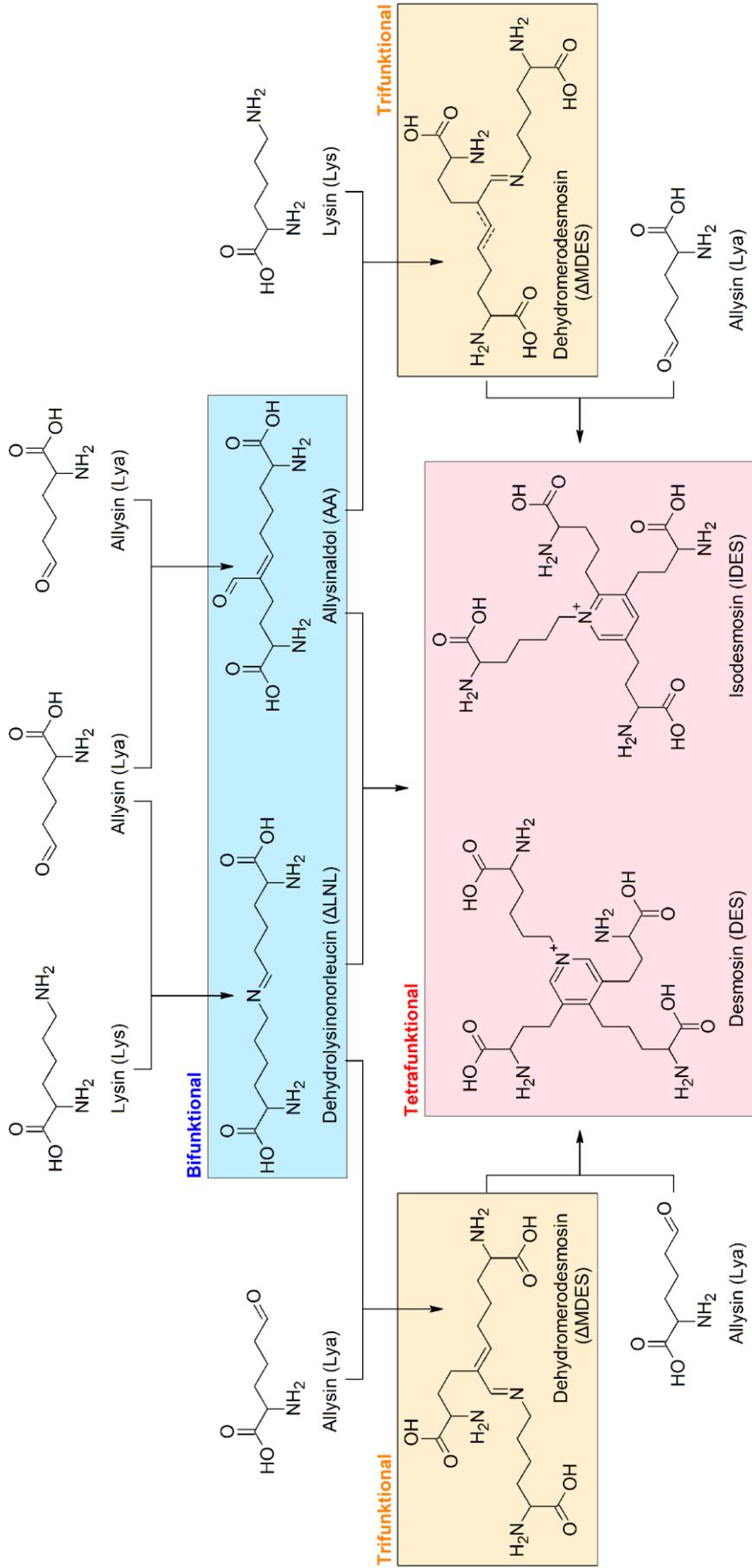


Abb. 8: Das Schema zeigt die Bildung der wichtigsten bi-, tri- und tetrafunktionalen Quervernetzungen in Elastin, die alle aus Allysine- und Lysinresten hervorgehen. Die Aldehydgruppe eines Allysinerests kondensiert spontan mit einem anderen Allysinerest durch eine Aldolkondensation unter Bildung von Allysinaldol oder mit einem weiteren Lysinrest unter Bildung von Dehydrolysinonorleucin. Diese bifunktionalen Quervernetzungen können weiter miteinander kondensieren, woraus die für Elastin einzigartigen tetrafunktionalen Quervernetzungen Desmosin und Isodesmosin entstehen. Alternativ können weitere Zwischenprodukte, wie das trifunktionale Merodesmosin, durch Kondensation mit einem Allysinerest zur Bildung von Desmosin und Isodesmosin führen [nach (#Schmelzer et al., 2020)].

2.2.7 Die Makroassemblierung

Das Hinzufügen und Quervernetzen neu sezernierter TE-Moleküle geht mit dem Wachstum der Cluster an der Zelloberfläche einher. Nachdem sich ausreichend viele TE-Moleküle in den Aggregaten angesammelt und diese eine kritische Größe erreicht haben, lösen sich die Cluster von der Zelloberfläche und bewegen sich durch den extrazellulären Raum. Fibulin-5 und Fibulin-4 können dabei mit Fibrillin interagieren und spielen vermutlich eine wichtige Rolle bei der Ablagerung der noch unreifen Elastinaggregate auf dem Mikrofibrillengerüst ([Choudhury et al., 2009](#); [Nakamura, 2018](#)). Ein weiteres an der Elastogenese beteiligtes Protein ist LTBP-4. Es interagiert nicht direkt mit TE, sondern mit dem Fibulin-5-Fibulin-4-TE-Komplex und ist vermutlich für die ordnungsgemäße lineare Abscheidung auf dem Mikrofibrillennetzwerk verantwortlich ([Noda et al., 2013](#); [Bultmann-Mellin et al., 2015](#); [Rifkin et al., 2018](#)). Aus der Assoziation Elastins mit den Mikrofibrillen und der Verschmelzung zu größeren Aggregaten gehen schließlich funktionelle Fasern hervor. Das Elastin, das nun Bestandteil der elastischen Faser ist, wird durch LOX/LOXLs vermutlich weiter oxidiert. Es finden zudem weiterhin Kondensationsreaktionen statt, bis das Elastin vollständig in das mikrofibrilläre Gerüst integriert ist. Es gibt Hinweise darauf, dass dieser Vorgang relativ langsam abläuft ([Partridge et al., 1966](#)).

2.2.8 Die Quervernetzungspositionen

([A7 Schmelzer et al., 2012](#); [A10 Heinz et al., 2013](#); [A11 Heinz et al., 2014](#); [A12 Schröder et al., 2015](#); [A14 Schmelzer et al., 2016](#); [A17 Schröder et al., 2018](#); [A18 Hedtke et al., 2019](#))

Die Analyse von Quervernetzungen

Die Aufklärung von Quervernetzungen in Elastin ist aufgrund ihrer Vielfalt, der enormen Zahl möglicher Kombinationen und der vielen Wiederholungen in der Aminosäuresequenz seit jeher eine Herausforderung. Erschwerend kommen die Unlöslichkeit Elastins, seine Beständigkeit gegenüber spezifischen Proteasen wie Trypsin und das Vorhandensein verschiedener Spleißvarianten sowie posttranslationaler Modifikationen wie die Prolylhydroxylierung hinzu ([#Schmelzer et al., 2016](#); [#Schmelzer et al., 2020](#)). Die daraus resultierenden analytischen Schwierigkeiten haben eine eingehende Analyse der Quervernetzungen in der Vergangenheit verhindert. Analytische Entwicklungen der vergangenen Jahre haben jedoch neue Einblicke in die molekulare Struktur von Elastin ermöglicht. Alle in der Literatur beschriebenen analytischen Ansätze erfordern als ersten Schritt die Isolierung Elastins. Wie zuvor beschrieben, nutzen die verschiedenen Techniken den Vorteil der Unlöslichkeit von

Elastin sowie seiner Beständigkeit gegen hohe Temperaturen, Chemikalien und viele Proteasen ([Mecham, 2008](#); [#Schmelzer et al., 2012](#)). Das gereinigte Elastin kann enzymatisch oder chemisch zu Peptiden oder Aminosäuren hydrolysiert werden, wodurch das Biopolymer indirekt für analytische Untersuchungen zugänglich wird.

Die wesentlichen qualitativen und quantitativen Studien zu quervernetzenden Aminosäuren sowie die Aufklärung ihrer Strukturen wurden in der Vergangenheit durch vollständige Hydrolyse von Elastin und die anschließende Aminosäureanalyse realisiert. Wie zuvor erwähnt, erfordert die Untersuchung der an der Vernetzung beteiligten TE-Domänen sowie die genaue Bestimmung der Position von Quervernetzungen innerhalb der Domänen jedoch eine proteolytische Hydrolyse und die Analyse von Peptiden. Hierfür können unterschiedliche (auch bakterielle) elastinspaltende Enzyme, die zu den Familien der Cystein-, Metallo- und Serinproteasen gehören, eingesetzt werden ([Maurice et al., 2013](#)). Die exakten Positionen und die Arten der Quervernetzungen lassen sich dann anhand der Untersuchung der freigesetzten Peptide bestimmen. Während Peptidsequenzen und Quervernetzungsstellen in der Vergangenheit mit klassischen Methoden wie dem Edman-Abbau untersucht wurden ([Gerber und Anwar, 1975](#); [Brown-Augsburger et al., 1995](#)), lassen sich heutzutage die hochauflösende Massenspektrometrie in Kombination mit spezieller Software dafür einsetzen.

Da massenspektrometrische Methoden sowie Software für diese spezifische Fragestellung nicht existierten, haben wir zunächst von Elastin abgeleitete Modellpeptide erzeugt und diese für die Entwicklung und Evaluierung neuer Methoden verwendet. Hierfür wurden elastintypische Dek- und Undekapeptide synthetisiert, die bereits reaktive Allysine beinhalten ([#Heinz et al., 2013](#)). Diese wurden anschließend genutzt, um die typischen bi-, tri- und tetrafunktionalen Quervernetzungen erzeugen zu können. Dabei ließen sich teilweise stabile, unlösliche Produkte herstellen, die als Elastinersatz für biomedizinische Anwendungen interessant sind.

Erstaunlicherweise konnten zudem unterschiedliche, über DES bzw. IDES quervernetzte Moleküle erzeugt werden, die aus drei Peptidketten hervorgingen. Diese Spezies wurden mittels Molekulardynamiksimulationen erfolgreich auf ihre Stabilität hin untersucht. Bei tandemmassenspektrometrischen Untersuchungen zeigten die erzeugten Peptide bzw. Polypeptide, die über die unterschiedlich funktionalen Quervernetzungen verfügten, Besonderheiten in ihren Dissoziationsspektren. Diese Eigenschaft konnte für eine Klassifizierung der Quervernetzungsart herangezogen werden können. Mithilfe der gewonnenen Daten entwickelten wir zudem die Software PolyLinX, die für die Identifizierung von bi-, tri- und tetrafunktionalen Quervernetzungen nützlich ist ([#Heinz et al., 2013](#)). Diese neuen Metho-

den wurden dann in einer Folgestudie verwendet, um natives, humanes Aortenelastin sowie unterschiedlich hergestellte, an Elastin angelehnte Materialien im Hinblick auf die Quervernetzungen zu untersuchen. Eines der Biomaterialien wurde aus rekombinant hergestelltem Tropoelastin erzeugt, das hierzu mithilfe einer Aminoxidase aus *Aspergillus nidulans* quervernetzt wurde. Die Aktivität dieses Enzyms gegenüber Tropoelastin konnten wir in einer vorangegangenen Arbeit nachweisen ([#McGrath et al., 2011](#)). Das zweite Konstrukt wurde unter Nutzung eines rekombinant hergestellten Polypeptids, bestehend aus den humanen Elastindomänen 20-21-23-24-21-23-24, und dem chemischen Quervernetzer Pyrrolochinolinchinon (PQQ) erzeugt. Für beide Materialien konnte die Bildung von DES/IDES nachgewiesen sowie intramolekulare bifunktionale Quervernetzungen basierend auf Allysinaldol identifiziert werden ([#Heinz et al., 2014](#)). In einer weiteren Arbeit lag der Fokus auf der Methodenentwicklung für die Aufklärung tetrafunktionaler Quervernetzungen. Dabei kamen insbesondere die zuvor erwähnten Desmosin-enthaltenden Peptide ([#Heinz et al., 2013](#)), Standards von DES und IDEs sowie daraus hergestellte Derivate zum Einsatz. Wir verfolgten in dieser Studie die Überprüfung unserer Hypothese, dass bei der kollisionsinduzierten Dissoziierung von DES/IDES bzw. DES/IDES-enthaltenden Molekülen in Tandem-MS-Experimenten spezifische Fragment-Ionen entstehen, die als Markerionen zum Nachweis entsprechender Peptide herangezogen werden können. Dies gelang durch die Verwendung erhöhter Kollisionsenergien, bei der ein Cluster spezifischer Fragmente nachgewiesen werden konnte. Darauf basierend wurde ein Algorithmus inklusive Scoring entwickelt, der, in eine Software integriert, den eindeutigen Nachweis von DES-/IDES-enthaltenden Peptiden anhand von Daten aus modifizierten LC-MS/MS-Experimenten ermöglicht ([#Schröder et al., 2015](#)). Die Entwicklung dieser Methode war bedeutsam für die Aufklärung der im Folgenden beschriebenen nativen Quervernetzungen in reifem Elastin.

Aus bifunktionalen Intra-Domain-Quervernetzungen gehen bei der Hydrolyse intern vernetzte Peptide mit einer zyklischen Struktur hervor. Bi- und höherfunktionale Quervernetzungen zwischen unterschiedlichen Domänen resultieren hingegen in Peptiden, die aus zwei oder mehr Peptidsträngen bestehen, die nur über die Quervernetzung miteinander verbunden sind. Die Aufklärung letzterer stellt eine deutlich größere Herausforderung als die zuvor genannter dar. Die MS-basierte Identifizierung von vernetzten Elastinpeptiden kann teilweise mithilfe spezieller Software erfolgen. Peptide, die einfache bifunktionale Quervernetzungen enthalten, können mit herkömmlicher Sequenzierungssoftware identifiziert werden, sofern diese die Integration benutzerdefinierter posttranslationaler oder artifizieller Modifikationen und Datenbanken, wie beschrieben, ermöglicht ([#Schröder et al., 2018](#)). Zudem gibt es Softwarelösungen, die speziell für die Analyse von quervernetzten

Peptiden entwickelt wurde. Neben der von uns entwickelten Software PolyLinX verwendeten wir die in der Arbeitsgruppe von Prof. Andrea Sinz entwickelte Software StavroX/MeroX, die die Analyse von MS-Daten bifunktionaler intra- und interpeptidischer Quervernetzungen ermöglicht, jedoch eine manuelle Validierung der Ergebnisse erfordert ([Götze et al., 2011](#)). Deutlich komplizierter ist die Aufklärung und Zuordnung von höherfunktionalen Quervernetzungen. Die Analyse solcher Spezies, beispielsweise von DES- und IDES-haltigen Peptiden, wird durch eine vorherige chromatographische Anreicherung wesentlich erleichtert. Diese Vorgehensweise macht sich die Hydrophilie der quervernetzten Peptide zunutze, die durch die intrinsische positive Ladung des Pyridiniumrings verursacht wird. Der Nachweis und die Identifizierung von tetrafunktionalen Quervernetzungen kann zudem durch die zuvor beschriebene Methode, die DES-spezifische Markerionen nutzt, wesentlich erleichtert werden ([#Schröder et al., 2015](#)). Dabei wird jedes Quasimolekölion eines Peptids zwei unterschiedlichen Tandem-MS-Messungen unterzogen. Die erste wird bei erhöhter Kollisionsenergie durchgeführt, wodurch es zur Freisetzung spezifischer Reportationen kommt, die den zentralen Pyridiniumkern enthalten. Dies erleichtert das gezielte Screening nach DES- und IDES-haltigen Peptiden. Das zweite Tandem-MS-Experiment verwendet dann eine geringere Kollisionsenergie, wodurch Spektren erzeugt werden, die für die Ermittlung der Sequenz relevante Informationen enthalten. Durch diese Vorgehensweise konnten wir, wie im nächsten Kapitel näher beschrieben, eine hohe Zahl bi- und tetrafunktionaler Quervernetzungen identifizieren.

Das Quervernetzungsmuster in Elastin

Peptide mit tetrafunktionalen Quervernetzungen wurden zum ersten Mal vor mehr als vier Jahrzehnten durch Gerber und Anwar ([Gerber und Anwar, 1974](#); [Gerber und Anwar, 1975](#)) sowie Baig *et al.* ([Baig et al., 1980](#)) unter Verwendung der Methode des Edman-Abbaus untersucht. Ihnen gelang die Aufklärung der Aminosäuresequenz von Peptidketten auf C-terminalen Seite von DES/IDES in Elastin von Rind, Schwein und Mensch. Sie schlussfolgerten aus ihren Daten, dass sich DES und IDES zwischen zwei Lys-Paaren nach dem Einfluss von LOX ausbildet. Sie fanden zudem heraus, dass drei der vier Lys-Reste C- und N-terminal von Ala oder anderen kleinen Aminosäureresten wie Ser flankiert werden, während der vierte Lys-Rest an einen hydrophoben Aminosäurerest wie Phe oder Leu grenzt, der die Modifikation durch LOX zu Allysins behindert. Dies bedeutet wiederum, dass DES/IDES zwischen zwei KA-Domänen nach LOX-induzierter Modifikation gebildet werden. KP-Domänen scheinen hingegen deutlich seltener an der Bildung von DES/IDES beteiligt zu sein. Dies liegt vermutlich in der relativ ungeordneten Sekundärstruktur der KP-Domänen begründet.

Im Jahr 1995 veröffentlichten Brown-Augsburger *et al.* Ergebnisse einer Studie zu quervernetzten Peptiden aus Elastin, das aus Aorten von Schweinen isoliert wurde, die während des Wachstums einer Kupfermangelernährung ausgesetzt waren ([Brown-Augsburger et al., 1995](#)). Wie in Kapitel 2.2.6 beschrieben, ist Kupfer ein wichtiger Cofaktor der Lysyloxidasen, dessen Abwesenheit zu einer Verringerung der Aktivität dieser Oxidasen führt und in Folge in unvollständig quervernetztem Elastin und Kollagen resultiert. Brown-Augsburger und Kollegen identifizierten in dieser Arbeit in Hydrolysaten dieses porzinen, unreifen Elastins mit Hilfe von Aminosäureanalysen ein komplex aufgebautes, quervernetztes Peptid (siehe **Abb. 9**).

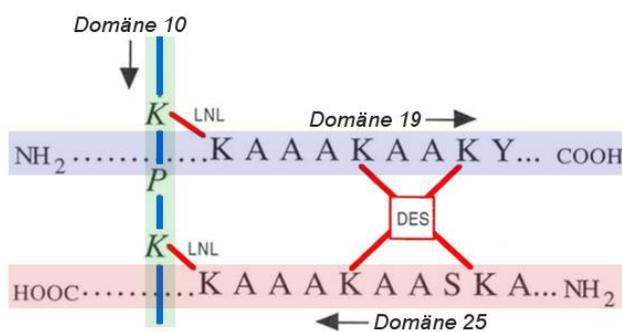


Abb. 9: Schema des von Brown-Augsburger *et al.* charakterisierten Peptids, das aus der Vernetzung der drei Domänen 10, 19 und 25 über ein DES/IDES sowie zwei LNL hervorgeht [modifiziert nach ([Brown-Augsburger et al., 1995](#))]

Dieses bestand aus drei einzelnen Peptidsträngen, von denen zwei aus den KA-Domänen 19 bzw. 25 stammen, die über DES oder IDES miteinander verbunden waren. Beide Domänen unterscheiden sich in den meisten Säugetieren insofern von anderen KA-Domänen, dass sie über drei statt zwei Lys-Reste verfügen (vgl. **Abb. 5**). Der jeweils dritte Lys-Rest dieser beiden Domänen war über ein LNL mit einem der beiden Lys-Reste des dritten Peptidstranges verbunden, der der KP-Domäne 10 entstammt.

2011 ermittelten Baldock und Kollegen von rekombinant hergestelltem humanen Tropoelastin sowie TE-Fragmenten mittels Kleinwinkelröntgen- und Kleinwinkelneutronenstreuung niedrig aufgelöste dreidimensionale Strukturen ([Baldock et al., 2011](#)). Sie konnten auch die Position der terminalen Domänen sowie weiterer Regionen identifizieren und fanden heraus, dass sich die Domänen 19 und 25 gegenüberstehen und in räumlicher Nähe befinden. Mit Bezug auf das zuvor diskutierte Peptid und die darin identifizierten Quervernetzungen ([Brown-Augsburger et al., 1995](#)) schlugen Baldock *et al.* in der selben Arbeit ein Kopf-Schwanz-Modell (engl. *head-to-tail model*) für die *in vivo* ablaufende TE-Polymerisation vor. Dieses Modell basiert auf einer einheitlichen molekularen Verknüpfung der TE-Einheiten durch Quervernetzung der Domänen 10, 19 und 25. Eine weitere Reifung unter

Bildung größerer Aggregate soll dann durch Interaktionen dieser feinen Elastinfasern untereinander, insbesondere durch hydrophobe Wechselwirkungen hervorgerufen, erfolgen ([Brown-Augsburger et al., 1995](#)).

Insgesamt wären an dieser Assemblierung nur drei der insgesamt 16 KA- und KP-Domänen beteiligt. Darüber hinaus ist zu berücksichtigen, dass die Ergebnisse aus der Studie von Brown-Augsburger *et al.* möglicherweise nicht repräsentativ sind, da das verwendete Elastin unter nicht physiologischen Bedingungen erzeugt wurde. Zudem handelte es sich dabei um Elastin vom Schwein, in der Studie von Baldock *et al.* wurde jedoch humanes TE eingesetzt. Ob die Struktur des letztgenannten unter *In-vivo*-Bedingungen tatsächlich derer der Veröffentlichung entspricht, ist ebenfalls ungewiss, zumal das verwendete TE im Gegensatz zu nativem TE ([Schmelzer et al., 2016](#)) über keine Prolylhydroxylierungen verfügte. Die Hydroxyproline haben aufgrund der starken Elektronegativität des zusätzlichen Sauerstoffatoms einen Einfluss auf die Sekundärstruktur des Proteins, wie dies auch für Kollagen bekannt ist, bei dem die Hydroxylierungsstellen entscheidend für die Stabilität des Proteins sind.

Seit der Arbeit von Brown-Augsburger *et al.* wurden keine Quervernetzungen in nativem Elastin mehr aufgeklärt. Meine Arbeitsgruppe hat mit den zuvor beschriebenen, selbstentwickelten Methoden in den vergangenen Jahren native Quervernetzungen in bovinem und humanem Elastin untersucht ([Schröder et al., 2018](#); [Hedtke et al., 2019](#)). Dadurch gelang es uns, eine breite Vielfalt und eine hohe Zahl von Quervernetzungen zu identifizieren und Informationen über die Vielfältigkeit des Quervernetzungsprozesses zu erhalten.

Während für bifunktionale Quervernetzungen zumeist angenommen wurde, dass sie unterschiedliche Domänen aus zumeist zwei Monomereinheiten verbinden, identifizierten wir überraschenderweise in beiden Studien auch eine hohe Anzahl von bifunktionalen Intradomänenquervernetzungen, deren Bildung wir bereits zuvor in *In-vitro*-Studien beobachtet hatten ([Heinz et al., 2014](#)). Wie in Abschnitt 2.2.6 beschrieben, wird gemeinhin angenommen, dass es sich bei diesen Strukturen um Zwischenprodukte handelt, die bei der Bildung von tetrafunktionalen Quervernetzungen entstehen. Es wurde jedoch zuvor nicht beschrieben, dass diese Vorstufen, wie von uns nachgewiesen, auch in ausgereiftem Elastin existieren. Stabile Quervernetzungen innerhalb einer Domäne sind aus zwei Gründen unerwartet. Erstens können derartige kovalente Bindungen nur lokale Sekundärstrukturelemente innerhalb eines einzigen TE-Monomers stabilisieren und tragen somit nicht zur Verteilung der angreifenden Kräfte im gesamten Polymer bei, wie dies bei Interdomänen-Quervernetzungen und insbesondere intermolekularen Quervernetzungen der Fall ist. Zweitens führt die Ausbildung sekundärer Strukturelemente zu einer sterischen Kompress-

sion hydrophiler Molekülabschnitte. Es ist möglich, dass dies für die hydrophobe Hydratation von Vorteil ist, die, wie zuvor beschrieben, Grundvoraussetzung für die mechanischen Eigenschaften Elastins ist. Unsere Untersuchungen haben gezeigt, dass bifunktionale Intradomänenquervernetzungen basierend auf LNL oder AA innerhalb jeder TE-Quervernetzungsdomäne zu finden sind ([#Hedtke et al., 2019](#)). Der Einfluss der Intradomänenquervernetzungen auf die Struktur und Eigenschaften von Elastin wurde bisher nicht untersucht.

Wir haben weiterhin die Sequenzen der einzelnen Peptidabschnitte mehrerer tetrafunktional quervernetzter Peptide ermittelt, bei denen alle zuordenbaren Peptidstränge aus KA-Domänen stammen. Für menschliches Elastin konnten wir nachweisen, dass die KA-Domäne 14, die nur einen einzelnen Lys-Rest aufweist, an der Bildung von DES oder IDES mit zwei weiteren KA-Domänen beteiligt ist. Damit gelang der Beweis, dass tetrafunktionale Quervernetzungen *in vivo*, anders als bisher angenommen ([Gray, 1977](#); [Mecham und Davis, 1994](#)), auch aus mehr als zwei Domänen hervorgehen können ([#Hedtke et al., 2019](#)). Dies kann beispielsweise durch Kondensation einer Intradomänen- mit einer Interdomänenquervernetzung erfolgen. Domäne 14 gehört zu dem zentralen, konservierten Abschnitt TEs (Domänen 8-14 in der Gruppe der Amnioten) ([Keeley, 2013](#)) und ist die einzige KA-Domäne, die nur über einen einzelnen Lys-Rest verfügt und damit keine Intradomänenquervernetzungen ausbilden kann. Eventuell spielt Domäne 14 bei der Quervernetzung der Monomere eine besondere Rolle.

Wir konnten zahlreiche bifunktionale Quervernetzungen innerhalb von KP-Domänen bzw. zwischen unterschiedlichen KP-Domänen oder zwischen KP- und KA-Domänen nachweisen. Damit wären KP-Domänen prinzipiell auch in der Lage, an der Bildung von tetrafunktionalen Quervernetzungen beteiligt zu sein. Eine Involvierung von KP-Domänen in DES/IDES konnten wir jedoch für keines der untersuchten Peptide nachweisen. Abgesehen von einer Ausnahme ([Baig et al., 1980](#)) wurden KP-Domänen in DES- und IDES-haltigen Peptiden bisher auch sonst nicht experimentell bestätigt. Dies legt nahe, dass sie quantitativ nur einen vernachlässigbaren Anteil an der Bildung von DES/IDES haben.

Insgesamt haben wir gezeigt, dass die verschiedenen Lys-Reste an allen Arten von Quervernetzungen beteiligt sind und zudem sogar unverändert bleiben können. Eines der vielen Beispiele für diese Vielfalt ist Lys-104 in der Domäne 6 (KA) in menschlichem Elastin (siehe **Abb. 10**) ([#Hedtke et al., 2019](#); [#Schmelzer et al., 2020](#)). Der Lys-Rest wurde in unverändertem Zustand (I) gefunden, aber auch intramolekular quervernetzt innerhalb der gleichen Domäne mit dem benachbarten Lys-Rest sowohl via AA (II) als auch via LNL (III). Darüber hinaus war Lys-104 an zwei unterschiedlichen Quervernetzungen intra- oder intermolekular mit den Domänen 13 und 14 via LNL (IV) bzw. via AA (V) sowie an der Bildung von DES/I-

DES (VI) beteiligt. Dieses Beispiel verdeutlicht sehr gut, dass es nicht nur sehr viele Möglichkeiten der Quervernetzung für jeden einzelnen Lys-Rest gibt, sondern dass diese *in vivo* tatsächlich parallel vorkommen.

Im Gegensatz zu einigen früheren Modellen zum Ablauf des Quervernetzungsschrittes der TE-Polymerisation zeigen diese Erkenntnisse, dass das Quervernetzungsmuster von Elastin sehr heterogen ist und, wenn überhaupt, offenbar nur wenigen Beschränkungen unterliegt. Nach gegenwärtigem Kenntnisstand besitzen die LOX und LOXL-Enzyme keine Spezifität für bestimmte Lys-Reste bzw. Sequenzmotive in TE. Dies wird durch die Tatsache gestützt, dass nach Totalhydrolyse von reifem Elastin bezogen auf das Monomer nur noch etwa 10 % der Lysinreste unmodifiziert nachgewiesen werden können ([#Schröder et al., 2018](#); [#Hedtke et al., 2019](#)). Der Quervernetzungsvorgang selbst ist nicht enzymatisch katalysiert oder anderweitig gesteuert, sondern basiert auf einfachen Kondensationsreaktionen, die wiederum nur davon abhängen, welche Domänen der Monomere sich sterisch nahekommen.

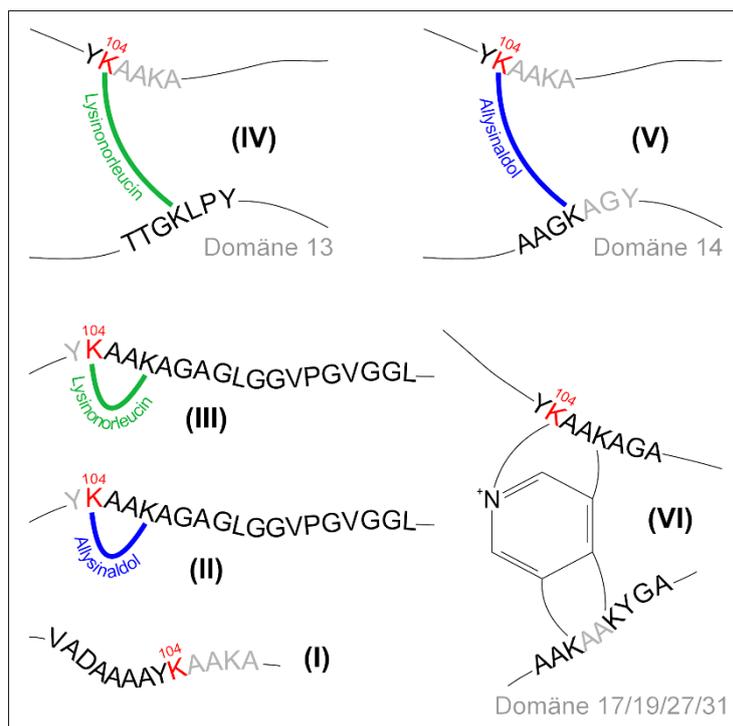


Abb. 10: Die Analyse von quervernetzten Peptiden aus enzymatischen Verdauen menschlichen Elastins ergab, dass einzelne Lysinreste an unterschiedlichen Arten von Quervernetzungen beteiligt sind sowie teilweise unverändert blieben. Dies ist am Beispiel des Lysinrests 104 (rot hervorgehoben) des Quervernetzungsmotivs der Domäne 6 (KA) gezeigt. Dieser Rest wurde in unverändertem Zustand (I) und via Allysinaldol (II) sowie Lysinonorleucin (III) mit dem benachbarten Lysinrest der Domäne 6 quervernetzt gefunden.

Darüber hinaus wurden Quervernetzungen zwischen Lys-104 mit Lys-Resten der Domäne 13 (IV) und 14 (V) über Lysinonorleucin bzw. Allysinaldol sowie seine Beteiligung an der DES-/IDES-Bildung (V) nachgewiesen. Die grau dargestellten Aminosäurereste waren nicht Teil der identifizierten Peptide und wurden zum besseren Verständnis ergänzt [aus [#Schmelzer et al., 2020](#)].

Nicht weiterkondensierte Zwischenstufen werden teilweise reduziert (Δ LNL zu LNL und Δ MDES zu MDES) und bleiben als stabile bi- bzw. trifunktionale Quervernetzungen im reifen Elastin erhalten. Sie erhöhen die Vielfalt deutlich und sind ein weiterer Beleg für ein komplexes Quervernetzungsmuster. Unsere Schlussfolgerungen aus diesen Studien bezüglich dieser insgesamt heterogen verlaufenden Quervernetzung der TE-Monomere und damit letztlich heterogenen Assemblierung stehen im Einklang mit kürzlich veröffentlichten Ergebnissen von Studien zur Selbstorganisation von TE und zum strukturellen Einfluss der Derivatisierung von Lys zu Lya. Tarakanova *et al.* haben auf Basis des zuvor erwähnten atomistischen TE-Modells ein sogenanntes grobkörniges Modell abgeleitet und dieses zur Modellierung des der Quervernetzung vorangehenden Koazervationsprozesses verwendet. Dabei beobachteten sie nicht nur Kopf-Schwanz-Anordnungen, die die Grundlage für das sogenannte Kopf-Schwanz-Modell sind ([Baldock et al., 2011](#)), sondern auch Kopf-Kopf-, Schwanz-Schwanz- sowie laterale Interaktionen der TE-Moleküle ([Tarakanova et al., 2019](#)). Diese Diversität bei der Koazervation ist vermutlich zumindest teilweise verantwortlich für die Heterogenität bei der Quervernetzung. Weitere Bestätigung und Verwendung fanden unsere Erkenntnisse im Rahmen einer Studie zum Einfluss der Modifikation von Lys- zu Lya-Resten auf die Sekundärstruktur TEs, für die gezeigt werden konnte, dass die Beweglichkeit und Zugänglichkeit einzelner Domänen sowie des gesamten Moleküls verändert wird. Zudem resultiert aus der Erhöhung der Anzahl der Allysinreste pro TE-Molekül eine Zunahme der Strukturvariabilität ([Ozsvar et al., 2019](#)). Diese Ergebnisse legen nahe, dass diese PTMs bereits vor der Quervernetzung Funktionen bei der Assemblierung zu Elastin zukommen. Unsere Erkenntnisse zu den Positionen der Quervernetzungen werden für zukünftige genauere Simulationen von Bedeutung sein.

2.3 Die Eigenschaften Elastins

2.3.1 Vorkommen und Morphologie

Die Quervernetzungen sind eine Voraussetzung für die Bildung dreidimensionaler, makromolekularer Netzwerke aus TE-Molekülen. Die strukturelle Organisation reifer elastischer Fasern ebenso wie der Elastingehalt variiert allerdings stark in den einzelnen Geweben. Die Unterschiede in der Konfiguration hängen dabei eng mit der Funktion der Organe und der Stärke und Richtung der reversiblen Verformung der Bindegewebe zusammen. So ist beispielsweise das Elastin in der medialen Schicht der Aorta in konzentrischen fenestrierten Lamellen angeordnet, wohingegen die Fasern in elastischem Knorpel dreidimensionale wabenartige Strukturen bilden. Die unterschiedliche Morphologie ist dabei auch das Ergebnis des komplexen Wechselspiels zwischen den unterschiedlichen Bestandteilen der EZM mit den Zellen. Die folgende Übersicht (**Tabelle 1**) zeigt die strukturellen Besonderheiten elastinhaltiger Gewebe.

Tabelle 1: Strukturelle Konfiguration elastischer Fasern in verschiedenen menschlichen Geweben und Elastingehalt bezogen auf das Trockengewicht der Gewebe.

Gewebeart	Elastin- gehalt	Strukturelle Konfiguration	Literatur
Aorta	<57 %	Konzentrische Lamellen	(Scarselli, 1961 ; Spina et al., 1983)
Bandscheibe (<i>anulus fibrosus</i>)	2 %	Dicht gruppiert mit zufälliger Ausrichtung	(Mikawa et al., 1986)
Bandscheibe (<i>nucleus pulposus</i>)	2 %	Radial angeordnete Fasernetzwerke	(Mikawa et al., 1986)
Elastischer Knorpel^e	19 %	Wabenartige Strukturen	(Peters und Smillie, 1971)
Elastische Bänder	<75 %	Seilartige Fasern	(Uitto, 1979)
Haut (Dermis)	<5 %	Seilartige Fasern	(Starcher, 1977)
Lunge (Parenchym)	<30 %	Lamellare, die Alveolen umgebende Schichten	(Chrzanowski et al., 1980)
Lunge (Atemwegschleimhaut)	<5 %	Gekräuselte, lamellare Anordnung	(Mecham, 2018)
Sehnen	4 %	Bündel langer Fasern	(Greenlee et al., 1966 ; Uitto, 1979)

^e Gehalt wurde für Rinderelastin bestimmt

2.3.2 Alterungsbeständigkeit und proteolytische Stabilität

Unter nicht pathologischen Bedingungen ist Elastin über die Lebensdauer der jeweiligen Spezies metabolisch stabil. Für den Menschen wurde die Halbwertszeit Elastins unter Verwendung von Asparaginsäure-Racemisierungsanalysen sowie Messungen des ^{14}C -Gehalts in Post-Mortem-Geweben auf mehr als 70 Jahre bestimmt ([Shapiro et al., 1991](#); [Powell et al., 1992](#)). Die hohe Langlebigkeit ist biologisch von großer Relevanz, da Elastin, im Gegensatz zu den meisten anderen Proteinen, zeitlebens nicht erneuert wird. Generell gehören elastische Fasern aufgrund ihrer Größe, ihrer molekularen Komplexität und zahlreicher, an der Elastogenese beteiligter weiterer Proteine zu den am schwierigsten zu reparierenden EZM-Strukturen. Dies wird zum Beispiel bei dem in Folge einer Verletzung entstehenden Narbengewebes deutlich, bei dem kaum elastische Fasern gebildet werden ([Roten et al., 1996](#)).

Einer der Gründe für die außergewöhnliche Haltbarkeit des Elastins ist seine hohe Beständigkeit gegenüber Enzymen, die hauptsächlich durch seine stark vernetzte Natur und die extrem dichte Packung der Moleküle ermöglicht wird. Unter den vielen verschiedenen Proteasen im menschlichen Körper sind jedoch einige in der Lage, Elastin zu hydrolysieren. Die strukturelle Integrität von Elastin kann durch diese als Elastasen bezeichneten Enzyme, aber auch durch andere Ursachen im Verlauf von Krankheiten oder der Alterung beeinträchtigt werden. Hierauf wird im Kapitel 2.4 näher eingegangen.

2.3.3 Biologische Eigenschaften

Die primäre biologische Funktion Elastins besteht darin, Geweben und Organen Elastizität zu verleihen. Elastin spielt jedoch nicht nur als Strukturprotein eine Rolle, das die Architektur und biomechanischen Eigenschaften der EZM maßgeblich beeinflusst, sondern es steht auch im Zusammenhang mit verschiedenen physiologischen Prozessen ([Debelle und Tamburro, 1999](#)). So werden im Zuge der im Laufe des Lebens auftretenden Schädigungen teils große Mengen von EDPs freigesetzt. Diese können in den Blutkreislauf gelangen und eine breite Palette biologischer Aktivitäten aufweisen ([Maurice et al., 2013](#)).

Die biologische Wirkung der Elastokine wird dabei über die Bindung an Rezeptoren der Zelloberfläche vermittelt, von denen bisher mindestens vier verschiedene identifiziert wurden ([Toupance et al., 2012](#)). Der bekannteste Rezeptor ist der bereits erwähnte ERC, dessen Bestandteil EBP im Verlauf der Elastogenese als Chaperon für TE fungiert. EBP kann überdies auch an EDPs binden, wodurch die Sialidase-Aktivität der Neu-1 stimuliert wird. Dies scheint für die intrazelluläre Signalübertragung wesentlich zu sein, in deren Rahmen

es zur Initiierung mehrerer Signalkaskaden kommt, die für verschiedene Zelltypen wiederum sehr unterschiedlich sind ([Duca et al., 2007](#)). Der ERC erkennt die Konsensussequenz XGXXPG, bei der es sich um ein Motiv handelt, das die Bildung von β -Turns des Typs VIII begünstigt. Dieses wiederum ist für die Bindung des Substrates an das EBP essenziell ([Floquet et al., 2004](#); [Blanchevoye et al., 2013](#)).

Ein weiterer Rezeptor für EDPs ist das ca. 31 kDa große Galectin-3, das mit einer Vielzahl von EZM-Proteinen, darunter Elastin und Laminin, interagiert ([Ochieng et al., 2004](#)). Galectin-3 wird in gewöhnlichen und Tumorzellen exprimiert und weist u.a. unterschiedliche biologische Funktionen im Zusammenhang mit Entzündungsreaktionen auf. Es wurde auch gezeigt, dass seine Interaktion mit EDPs die Tumorentwicklung im Falle von Melanomen begünstigen kann ([Pocza et al., 2008](#)).

Neben ERC bzw. EBP und Galectin-3 wurde zudem nachgewiesen, dass auch bestimmte α_v -Integrine mit TE oder EDPs interagieren können. Integrin $\alpha_v\beta_3$ erkennt dabei mit hoher Affinität die polybasische C-terminale TE-Domäne RKRK ([Rodgers und Weiss, 2005](#); [Bax et al., 2009](#)), wohingegen $\alpha_v\beta_5$ mit den TE-Domänen 17 und 18 interagieren kann ([Lee et al., 2014](#)).

Es wurde gezeigt, dass EDPs die Zellphysiologie verschiedener Zelltypen, einschließlich Fibroblasten, glatter Muskelzellen und Leukozyten, verändern [für eine Übersicht siehe ([Duca et al., 2004](#))]. In verschiedenen *In-vitro*- und *In-vivo*-Studien wurde die Beteiligung von EDPs an einer Reihe von pathologischen Zuständen nachgewiesen. So wurde zum Beispiel gezeigt, dass EDPs am Fortschreiten von Krebserkrankungen beteiligt sind ([Lapis und Timar, 2002](#); [Duca et al., 2004](#)) und in einer Studie von Blaise *et al.*, an der wir beteiligt waren, zeigte sich ein möglicher Zusammenhang zwischen EDPs und der Entwicklung einer Insulinresistenz bei Mäusen ([#Blaise et al., 2013](#)). In einer weiteren, ebenfalls von unserer Gruppe unterstützten Arbeit, konnten EDPs zudem mit der Entstehung der nichtalkoholischen Steatohepatitis in Verbindung gebracht werden ([#Romier et al., 2018](#)). EDPs fördern auch die Angiogenese durch Hochregulierung der MT1-MMP (engl. *membrane-type 1 matrix metalloproteinase*) ([Robinet et al., 2005](#)) und stehen mit der Regulierung zahlreicher zellulärer Aktivitäten wie Adhäsion, Chemotaxis, Proliferation, Proteaseaktivierung oder Apoptose in Verbindung ([Maquart et al., 2005](#); [Antonicelli et al., 2007](#)).

2.3.4 Mechanische Eigenschaften

Im Laufe des Lebens sind elastische Gewebe wie die Lunge, Blutgefäße oder elastische Bänder kontinuierlich mechanischen Verformungen ausgesetzt. Während EZM-Proteine wie Kollagene relativ unelastisch sind und im hydratisierten Zustand einen Elastizitätsmodul

zwischen 1 GPa und 2 GPa aufweisen ([Heim et al., 2006](#)), verfügen elastische Fasern über bemerkenswerte mechanische Eigenschaften. So können sie beispielsweise auf etwa 150 % ihrer Länge gedehnt werden, bevor sie reißen ([Gosline et al., 2002](#)). Aufgrund ihres niedrigen Elastizitätsmoduls von etwa 300 kPa bis 1500 kPa ([Koenders et al., 2009](#)) können einzelne elastische Fasern leicht gedehnt werden, bevor sie anschließend zu ihrer ursprünglichen Länge zurückzukehren. Elastin hat eine hohe Rückprallelastizität von ca. 90 %, aber eine geringe Zugfestigkeit von ca. 2 MPa ([Aaron und Gosline, 1981](#)). Wie in **Abb. 3** veranschaulicht wurde, handelt es sich bei getrocknetem Elastin um ein starres, hartes und sprödes Material, das elastomere Eigenschaften annimmt, sobald es hydratisiert wird ([Partridge, 1962](#)). Die Fähigkeit Elastins, nach dem Strecken wieder zu kontrahieren, wird hauptsächlich durch eine Zunahme der Entropie hervorgerufen und steht in Zusammenhang mit der Zunahme struktureller Unordnung ([Hoeve und Flory, 1958](#); [Gosline et al., 2002](#)). Die Verformung von Elastin wird außerdem durch die kovalenten Quervernetzungen erleichtert. Diese verteilen die Spannungs- und Dehnungskräfte über das Biopolymer und schließlich das gesamte Gewebe und ermöglichen somit die Aufrechterhaltung seiner Form. Während das Dehnen die strukturelle Organisation innerhalb des Elastinkerns elastischer Fasern erhöht, führt die anschließende Kontraktion und damit einhergehende Relaxation zur Rückkehr zur maximalen Entropie.

Im Laufe der Jahre wurden verschiedene phänomenologische Modelle vorgestellt, die darauf abzielten, die Eigenschaften Elastins möglichst gut zu beschreiben. Diese einzelnen Modelle unterscheiden sich hauptsächlich im Beitrag der geordneten Strukturen an den entropischen Eigenschaften des Moleküls. Hoeve und Flory schlugen als erste überhaupt vor, dass die Elastizität Elastins eine auf Entropie basierende Eigenschaft ist ([Hoeve und Flory, 1958](#)). Später etablierten sie ein einfaches isotropes Modell, das elastische Fasern als ungeordnete Netzwerke beschreibt ([Hoeve und Flory, 1974](#)). Anhand dieses Modells ist jedoch nicht erklärbar, warum Wasser für die Elastizität von Elastin benötigt wird. Obwohl TE viele Gly- (30 %) und Pro-Reste (12 %) aufweist, die die Bildung ausgedehnter Sekundärstrukturen verhindern, lieferten mehrere Studien Beweise für das Vorhandensein von β -Turns (Typ I, II und VIII) sowie Poly-Prolin-II-Helices ([Debelle und Alix, 1999](#); [Tamburro et al., 2003](#)). In mehreren anisotropen Modellen wurde versucht, den Beitrag dieser recht kurzen und labilen Strukturmerkmale zu erklären. Urry und Kollegen schlugen ein Librationsentropiemodell vor, bei dem sich die Elastinmoleküle zu leicht verformbaren β -Spiralen falten, die aus aufeinanderfolgenden β -Turns vom Typ II bestehen ([Urry und Parker, 2002](#)). Es gibt jedoch keine experimentellen Beweise für eine solche anisotrope Orientierung und auch die Molekulardynamiksimulationen von Li *et al.* unterstützen dieses Modell nicht ([Li et al., 2001](#); [Li und Daggett, 2002](#)). Ein weiteres interessantes Modell, das von Tamburro *et*

al. vorgeschlagen wurde, erklärt die Entropieerhöhung mit der Bildung von labilen β -Turns, die dynamisch entlang der Peptidkette gleiten können ([Leli et al., 1992](#); [Tamburro et al., 2005](#)). Insgesamt werden diese und weitere Modelle durch einige experimentelle Ergebnisse gestützt, keines aber liefert eine vollständige Erklärung für die Elastizität und den mit ihr in Verbindung stehenden Beobachtungen, wie z.B. die Notwendigkeit der Hydratation. Jüngere Molekulardynamiksimulationen von Peptiden, die von Elastin abgeleitet sind, aber auch Festkörper-NMR-Experimente mit reifem Elastin deuten darauf hin, dass hydratisiertes Elastin im relaxierten Zustand einen hohen Grad an dynamischer Unordnung aufweist ([Li und Daggett, 2002](#); [Pometun et al., 2004](#)). Somit wird immer deutlicher, dass die Flexibilität von Elastin eher auf einer ausgeprägten Dynamik als auf einer rigiden Struktur beruht. Diese Schlussfolgerungen wiederum lassen sich sehr gut mit der von uns nachgewiesenen Heterogenität der Netzwerke aus TE-Einheiten in Einklang bringen. Dennoch sind für das Verstehen des genauen Mechanismus, der der Flexibilität des Elastins zugrunde liegt, weitere Strukturuntersuchungen und molekulardynamische Simulationen erforderlich.

2.4 Alterung und Schädigung Elastins

(A7 Schmelzer *et al.*, 2012; A8 Sivan *et al.*, 2012; A13 Mora Huertas *et al.*, 2016; A14 Schmelzer *et al.*, 2016 ; A15 Gorisse *et al.*, 2016 ; A16 Mora Huertas *et al.*, 2018; A21 Panwar *et al.*, 2020)

Das Altern ist die allmähliche und fortschreitende Abnahme der Integrität von Organen und Geweben und wird durch intrinsische und extrinsische Faktoren hervorgerufen. Das intrinsische Altern ist ein natürlicher Prozess, der u.a. genetisch bedingt und die Folge langsamer Gewebedegeneration ist. Das extrinsische Altern hingegen, dessen Auswirkungen sich mit denen des intrinsischen Alterns überlagern, wird durch Umwelteinflüsse wie ultraviolette (UV) Strahlung, aber auch durch Noxen wie das Rauchen oder die Luftverschmutzung induziert bzw. beschleunigt ([Naylor *et al.*, 2011](#); [Vierkötter und Krutmann, 2012](#)). Obwohl Elastin insgesamt sehr resistent gegenüber intrinsischen und extrinsischen Faktoren ist, akkumuliert es im Laufe des Lebens Modifikationen und Schädigungen durch verschiedene biochemische, chemische und biophysikalische Einflüsse [siehe **Abb. 11** und Übersichtsartikel: ([Duca *et al.*, 2016](#))].

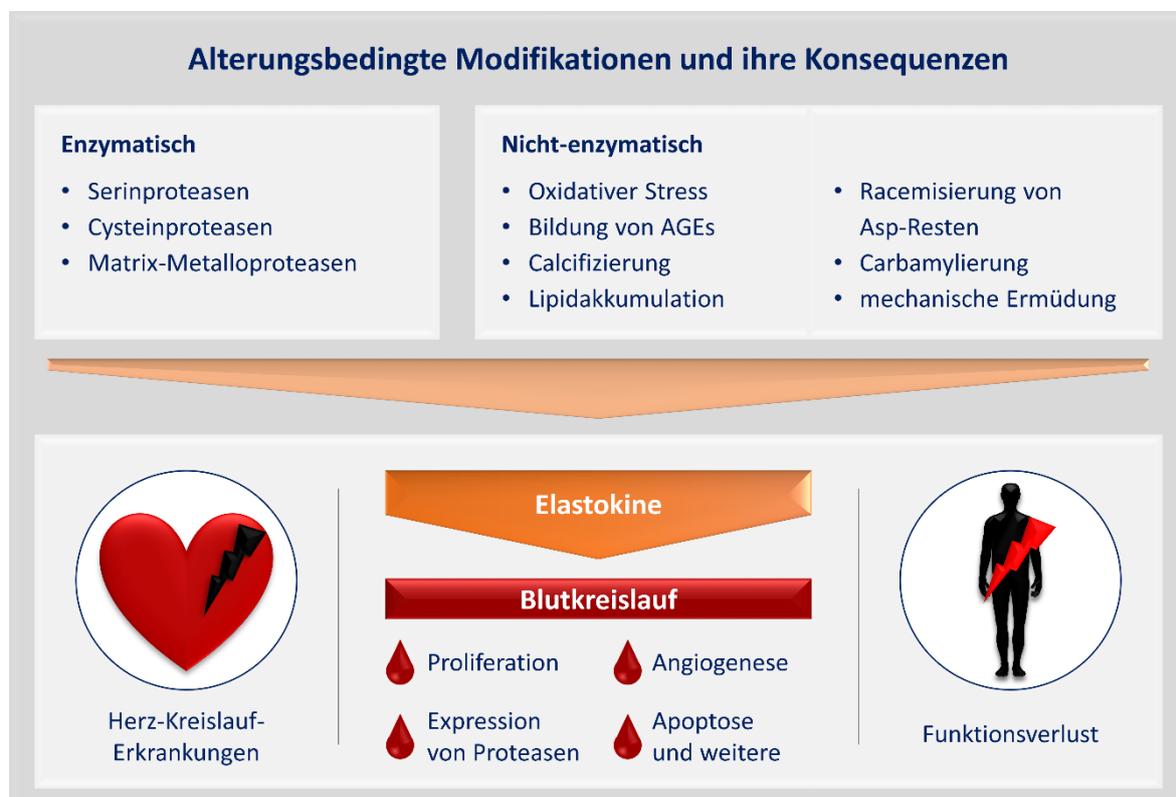


Abb. 11: Übersicht über enzymatisch und nicht-enzymatisch induzierte Alterungsprozesse Elastins und wichtige Auswirkungen auf den menschlichen Körper [modifiziert nach ([#Schmelzer und Duca, 2021](#))].

Die Alterungsprozesse bei Elastin sind morphologisch durch Fragmentierung und Verdünnung der Fasern in elastischen Geweben gekennzeichnet ([Pasquali-Ronchetti und Bacarani-Contrì, 1997](#)) und können zu einer Beeinträchtigung der Funktion elastischer Fasern und damit zu einer verminderten Gewebeelastizität oder sogar zu einem Funktionsverlust von Geweben und Organen führen. Dies resultiert schließlich in einer erhöhten Morbidität und Mortalität ([Green et al., 2014](#)). Im Falle der Hautalterung führt die durch UV-Strahlung induzierte, extrinsische Alterung (Photoalterung) zur Bildung von Falten, zur Abnahme der Elastizität sowie zu einer sichtbaren Verdickung der Haut, die aus der Ansammlung von elastotischem Material in der oberen und mittleren Dermis resultiert. Der letztere Vorgang wird als solare oder aktinische Elastose bezeichnet ([Sellheyer, 2003](#); [Naylor et al., 2011](#)).

Derartige morphologische Schädigungen sind anschaulich anhand von zwei rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen von Elastinfasern gezeigt, die aus der menschlichen Haut von Probanden unterschiedlichen Alters isoliert wurden (siehe **Abb. 12**) ([Schmelzer et al., 2012](#)). Während die Fasern aus der Haut eines 6-jährigen Jungen glatte Oberflächen aufweisen und vollkommen unversehrt erscheinen, sind jene einer 90-jährigen Probandin zerklüftet, porös und weisen zahlreiche Brüche auf. Derartige strukturelle Schäden haben auch einen großen Einfluss auf die Anfälligkeit Elastins gegenüber Elastasen ([Schmelzer et al., 2012](#); [Mora Huertas et al., 2016](#); [Schmelzer, 2016](#); [Mora Huertas et al., 2018](#); [Panwar et al., 2020](#)).

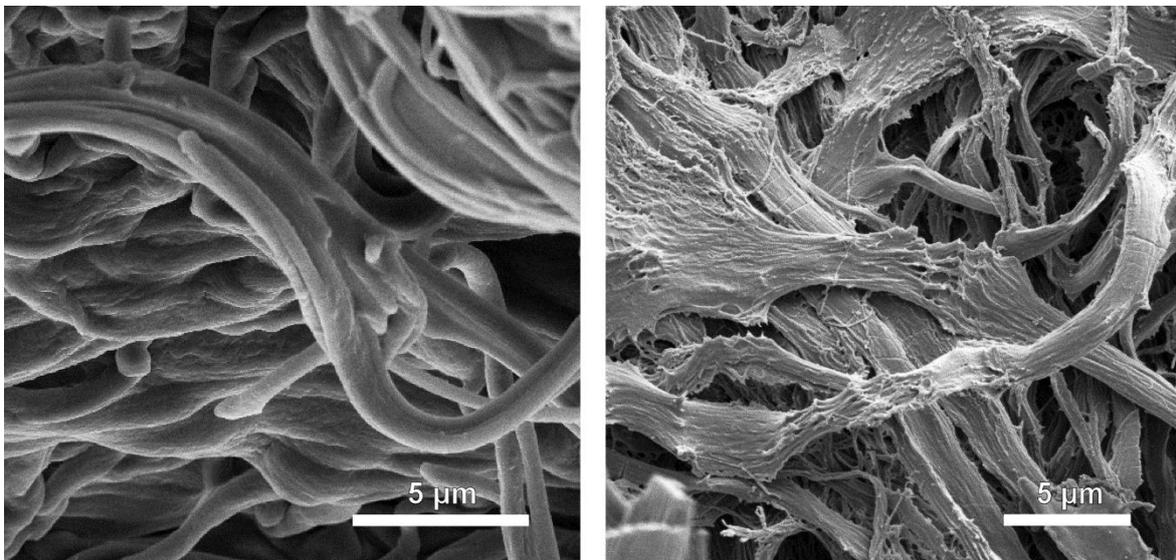


Abb. 12: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von fibrillärem Elastin (elastische Fasern ohne Mikrofibrillenmantel) isoliert aus der Vorhaut eines 6 Jahre alten Jungen (links) und der Haut (Thorax) einer 90 Jahre alten Frau (rechts). Die Fasern weisen Durchmesser von ca. 1 µm bis 2 µm auf und zeigen äußerst unterschiedliche Beschaffenheiten.

Auf molekularer Ebene werden Schädigungen insbesondere durch proteolytischen Abbau ([Antonicelli et al., 2007](#)), oxidativen Stress ([Cavinato und Jansen-Durr, 2017](#)), die Entstehung von *Advanced Glycation End Products* (AGEs) ([Konova et al., 2004](#); [Dao et al., 2005](#)), Calcifizierung ([Dao et al., 2005](#); [Zohora et al., 2020](#)), die Racemisierung von Asparaginsäureresten ([Powell et al., 1992](#)), ([#Sivan et al., 2012](#)), Lipidakkumulation ([Robert et al., 2008](#)) und mechanische Ermüdung ([O'Rourke, 2007](#)) hervorgerufen. Weiterhin haben wir gemeinsam mit einer französischen Arbeitsgruppe erstmals nachweisen können, dass auch die Carbamylierung langlebiger Matrixproteine wie Elastin und Kollagene ein Merkmal der Alterung ist ([#Gorisse et al., 2016](#)). Eine altersabhängige Veränderung des Hydroxylierungsgrades konnte von uns hingegen nicht festgestellt werden ([#Schmelzer et al., 2016](#)).

Der Fokus unserer im Folgenden diskutierten Studien lag auf durch Proteasen versuchte Schädigungen Elastins. Proteasen werden kontinuierlich exprimiert und viele davon werden auch in den EZM-Raum sezerniert, wo sie in vielfältige biologische Funktionen involviert sind. So sind sie für den Abbau aufgenommener Proteine bzw. solcher, deren Lebensende erreicht ist, verantwortlich und spielen insgesamt eine große Rolle beim Gewebeumbau und verschiedenen biologischen Prozessen wie der Wundheilung, Morphogenese oder Angiogenese. Zudem prozessieren sie bioaktive Peptide, die eine Vielzahl von Zellvorgängen steuern. Zu den Proteasen, von denen man annimmt, dass sie am Elastinabbau in menschlichen Geweben beteiligt sind, gehören neutrophile Serinproteasen (NSPs) wie Cathepsin G (CatG), Proteinase 3 (PR3) und die humane Leukozytenelastase (HLE) ([Korkmaz et al., 2008](#)), Matrix-Metalloproteasen (MMPs), einschließlich MMP-2, -7, -9, -12 und -14 ([Chakraborti et al., 2003](#)) und die Cysteinproteasen Cathepsin K, L, S und V ([Shi et al., 1992](#); [Brömme et al., 1996](#); [Antonicelli et al., 2007](#)). Diese Proteasen werden hauptsächlich von Fibroblasten, Mesenchymzellen, Thrombozyten, Makrophagen und Leukozyten gebildet. Allen Elastasen ist gemein, dass sie trotz unterschiedlicher katalytischer Mechanismen relativ unspezifisch spalten.

2.4.1 Matrix-Metalloproteasen

(A1 Taddese et al., 2008; A2 Taddese et al., 2009; A3 Heinz et al., 2010; A4 Taddese et al., 2010; A5 Heinz et al., 2011; A19 Miekus et al., 2019)

MMPs, auch Matrixine genannt, gehören zu einer größeren Proteasefamilie, den Metzinkinen, denen beispielsweise auch die Adamalysine, Astacine und Serralysine angehören ([Cerdà-Costa und Gomis-Rüth, 2014](#)). Wie bei den anderen Metzinkinen handelt es sich auch bei MMPs um aus unterschiedlichen Domänen zusammengesetzte Mosaikproteine.

MMPs sind sowohl zink- (daher das Präfix „Metallo“) als auch calciumabhängige Endopeptidasen, die entweder von den Zellen in die EZM sezerniert werden oder im Falle der MT-MMPs (engl. *membrane-type MMPs*) an der Plasmamembran verankert vorliegen. Im aktivierte Zustand können sie Proteine und Proteinverbände der EZM abbauen und spielen auf diese Weise eine wichtige Rolle bei der Umgestaltung von Bindegeweben. Sie sind an physiologischen und pathologischen Vorgängen wie der Morphogenese, Wachstums- und Wundheilungsprozessen, Angiogenese, Tumordinvasion und Metastasierung beteiligt. Insgesamt sind für Vertebraten 24 verschiedene MMPs bekannt, von denen bis auf MMP-18 alle im Menschen vorkommen ([Nagase et al., 2006](#)).

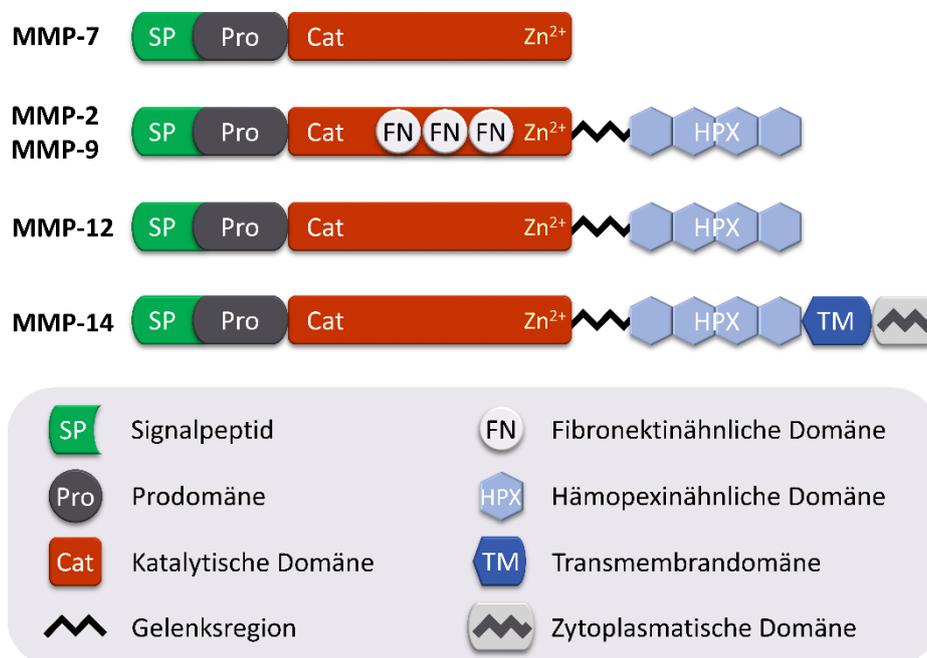


Abb. 13: Domänenstrukturen der elastinolytischen Matrix-Metalloproteasen 2, 7, 9, 12 und 14. Anders als andere MMPs besitzt die MMP-7 keine hämapexinähnliche Domäne. Die MMP-12 unterscheidet sich wiederum insofern von den übrigen MMPs, dass sie diese Domäne zwar besitzt, aber diese gewöhnlich durch Autoproteolyse im Zuge ihrer Aktivierung verliert. MMP-2 und -9 verfügen zudem über drei fibronectinähnliche Domänen innerhalb der katalytischen Domäne, die die Bindung von Gelatine ermöglicht. Die membranständige MMP-14 besitzt außerdem eine Transmembrandomäne, durch die sie an die Zellmembran gebunden ist, und eine zytosolische Domäne, der unterschiedliche regulatorische Funktionen zugeschrieben werden.

Alle MMPs besitzen eine hohe Sequenzhomologie zu MMP-1 und eine globuläre katalytische Domäne, die durch das zink-bindende, drei Histidinreste enthaltende Motiv HEXGHXXGXXH charakterisiert ist. N-terminal wird die katalytische Domäne von einem Propeptid flankiert, das ein Cystein-Switch-Motiv PRCGXPD besitzt (außer MMP-23). Dieser

Cys-Rest bindet an das Zinkion und hält dadurch die jeweilige MMP in ihrer inaktiven Pro-Form. C-terminal von der katalytischen Domäne befinden sich häufig Domänen (z.B. hämopexinähnliche Domänen), die für die Substraterkennung und andere Protein-Protein-Interaktionen von Bedeutung sind ([Visse und Nagase, 2003](#); [Itoh, 2015](#)). Die Domänenstrukturen der elastinolytischen (=elastinspaltende) MMPs sind in **Abb. 13** dargestellt.

Unter physiologischen Bedingungen wird die Aktivität der MMPs auf mindestens vier unterschiedliche Weisen gesteuert: (i) auf der Ebene der Transkription, (ii) durch Aktivierung aus der Pro-Form (Zymogen), (iii) durch Interaktionen mit anderen Bestandteilen der EZM, insbesondere durch Proteolyse (auch Autoproteolyse) und (iv) durch ihre spezifischen Inhibitoren, den sogenannten TIMPs (engl. *tissue inhibitors of metalloproteinases*) ([Chakraborti et al., 2003](#)).

Der Abbau von Elastin durch MMPs findet bei zahlreichen Vorgängen der Entwicklung, Wundheilung und während Entzündungskrankheiten statt ([Antonicelli et al., 2007](#)). Zu den humanen MMPs, für die eine elastinolytische Aktivität als sicher gilt, gehören MMP-2 (Gelatinase A), MMP-7 (Matrilysin-1), MMP-9 (Gelatinase B), MMP-12 (Makrophagenelastase) und MMP-14 (auch als MT1-MMP bezeichnet) ([Chakraborti et al., 2003](#); [Van Doren, 2015](#)). Schädigungen an elastischen Fasern, die zudem mit der Bildung von Elastokinen einhergehen, können dabei die Entstehung und das Fortschreiten einer Vielzahl pathologischer Zustände begünstigen. Es wurde zum Beispiel nachgewiesen, dass die Aortenstenose mit erhöhten Aktivitäten von MMP-2 und MMP-9 im Zusammenhang steht ([Helske et al., 2007](#)), Atherosklerose durch MMP-12 beeinflusst wird, die die Instabilität von atherosklerotischem Plaque fördert ([Johnson et al., 2005](#)) und auch die Entwicklung von Aortenaneurysmen wird durch MMP-2, MMP-9 und MMP-12 verstärkt ([Curci et al., 1998](#); [Longo et al., 2002](#)). Weitere Arbeiten zeigen außerdem, dass MMP-9 an Prozessen wie der Ventrikelruptur als Folge eines Myokardinfarkts ([Romanic et al., 2002](#)) und Photoalterung der Haut ([Kähäri und Saarialho-Kere, 1997](#)) beteiligt ist. Darüber hinaus wurde nachgewiesen, dass eine Überexpression von MMP-12 mit der Entwicklung und dem Fortschreiten des Lungenemphysems ([Hautamaki et al., 1997](#); [Gharib et al., 2018](#)), der Lichtalterung der Haut ([Chung et al., 2002](#)) und granulomatösen Hauterkrankungen ([Vaalamo et al., 1999](#)) in Verbindung steht. MMP-7 wird in Tumoren fast aller Organe des Körpers stark exprimiert und scheint eine wichtige Rolle bei der Tumorprogression und Angiogenese zu spielen ([Nagashima et al., 1997](#); [Wielockx et al., 2004](#)). Zusammengefasst zeigen diese Beispiele, dass es von großer Bedeutung ist, die durch MMPs hervorgerufenen Abbauprozesse Elastins zu verstehen. Zur Charakterisierung gehören insbesondere das Spaltungsverhalten von elastinolytischen MMPs und die Identität und Aktivität der beim Abbau freigesetzten EDPs. Dieser Ansatz kann bei der Entwicklung gerichteter Therapien zur Behandlung von Erkrankungen im

Zusammenhang mit der Elastinschädigung, der Überexpression von MMPs und der daraus resultierenden Freisetzung von Elastokinen sehr hilfreich sein. Allerdings wurden in nur wenigen Studien der enzymatische Abbau von Elastin oder seiner löslichen Vorstufe TE und die Freisetzung bioaktiver Peptide detailliert untersucht. Wir haben daher in fünf unterschiedlichen *In-vitro*-Studien das Abbauverhalten von humanem Tropoelastin und/oder reifem humanem Elastin durch vier MMPs charakterisiert.

Untersuchungen wurden zunächst mit der Makrophagenelastase (MMP-12) an reifem Elastin ([#Taddese et al., 2008](#)) vorgenommen. Dabei galt es, die Machbarkeit von Untersuchungen zur Charakterisierung der Spaltstellen mittels massenspektrometrischer Methoden zu überprüfen. Eine Herausforderung liegt in der geringen Spaltspezifität der MMPs, wodurch die Identifizierung der Peptide teilweise erheblich verkompliziert wird. Ferner erschweren die zuvor genannten, sich wiederholenden Sequenzmotive die Bestimmung bzw. machen eine eindeutige Zuordnung im Protein oftmals unmöglich. Für reifes Elastin wurden, bezogen auf das Vorläuferprotein, 36 Spaltstellen identifiziert, anhand derer die Präferenzen der entsprechenden Bindetaschen im Enzym (*Subsites*) nach dem Modell von Schechter und Berger analysiert wurden ([Schechter und Berger, 1967](#)). Dabei zeigte sich für die sehr bedeutende P₁'-S₁'-Interaktion, dass insbesondere Leu in P₁'-Position bevorzugt wird. Dies wurde zuvor schon anhand einer systematischen Studie mit synthetischen Oktaeptiden gezeigt ([Gronski et al., 1997](#)) und konnte in unserer Studie anhand eines natürlichen Substrats bestätigt und vertieft untersucht werden. Auch eine bereits früher für MMPs beschriebene Präferenz für Pro-Reste in der P₃-Position ([Verma und Hansch, 2007](#)) wurde für Elastin beobachtet und in den nachfolgend diskutierten Arbeiten eingehend untersucht.

Das in dieser Arbeit eingesetzte Elastin wurde aus humaner Haut mittels der in Kapitel 2.1 erwähnten Starcher-Methode isoliert und in der Peptidanalyse wurde eine größere Zahl von Kollagenpeptiden nachgewiesen. Dies zeigte nicht nur die Grenzen dieser Isolierungsmethode auf, die bei der späteren Entwicklung eigener Verfahren adressiert wurden, sondern legt zudem nahe, dass die Makrophagenelastase auch Aktivität gegenüber den beiden in der Haut vorkommenden Kollagentypen I und III aufweist. Dies konnten wir in einer separaten Studie belegen, in der wir die Hydrolyse dieser beiden Faserproteine durch die katalytische Domäne der MMP-12 näher untersuchten ([#Taddese et al., 2010](#)). Dabei gehören Kollagene nicht zu den natürlichen Substraten der MMP-12 ([Amar et al., 2017](#)). Es ist aber naheliegend, dass die Protease auch unter *In-Vivo*-Bedingungen beim *Turnover* der Kollagene eine Rolle spielt, wenn diese, durch den Einfluss anderer Enzyme hervorgerufen, bereits geschädigt vorliegen.

Die Spaltstellenanalyse erbrachte dabei Gemeinsamkeiten zwischen den Substraten Kollagen und (Tropo-)Elastin, wie die Präferenz für Leu in P₁ oder Pro in P₃, aber auch einige Unterschiede, die insbesondere durch Besonderheiten der Aminosäuresequenzen der Substrate zustande kommen (siehe **Tabelle 2**). So finden sich beispielsweise wegen des sich wiederholenden kollagentypischen Sequenzmotivs Gly-Xxx-Yyy^f in den Positionen P₄, P₁ und P₃ besonders häufig Gly-Reste.

Tabelle 2: Relative Häufigkeit ausgewählter Aminosäurereste in den Substratpositionen P₄-P₄' beim Verdau der Substrate Kollagen I (α-1 und α-2), Kollagen III (α-1) und Tropoelastin durch MMP-12 ([#Heinz et al., 2010](#); [#Taddese et al., 2010](#)). Die Spaltstelle befindet sich dabei zwischen den Resten in den Positionen P₁ und P₁' (durch blaue Linie gekennzeichnet).

Rest	Substrat	Häufigkeit des Vorkommens der Aminosäurereste (%)							
		P ₄	P ₃	P ₂	P ₁	P ₁ '	P ₂ '	P ₃ '	P ₄ '
Ala	α-1(I)	10	17	21	5	14	17	12	5
	α-2(I)	0	11	23	8	8	11	6	11
	α-1(III)	10	35	30	0	0	15	0	25
	TE	27	41	40	39	26	30	42	35
Gly	α-1(I)	50	26	21	55	26	17	50	29
	α-2(I)	66	15	21	64	13	26	62	17
	α-1(III)	80	15	5	80	15	5	80	25
	TE	27	15	32	33	7	34	24	21
Leu/Ile	α-1(I)	0	2	0	0	21	5	0	0
	α-2(I)	4	2	8	0	36	11	4	8
	α-1(III)	0	0	5	0	45	10	0	10
	TE	7	7	8	2	22	5	5	10
Pro/Hyp	α-1(I)	17	45	12	2	2	7	17	33
	α-2(I)	11	51	9	2	0	8	11	34
	α-1(III)	10	45	25	0	15	15	20	10
	TE	8	24	2	4	5	2	5	8

In zwei weiteren Arbeiten haben wir unter Nutzung des rekombinant hergestellten löslichen TEs systematisch das Spaltverhalten der MMP-12, MMP-7 und MMP-9 und die Bildung von Elastokinen untersucht ([#Taddese et al., 2009](#); [#Heinz et al., 2010](#)). Durch das Fehlen der Quervernetzungen ist TE deutlich leichter abbaubar und es können bei der anschließenden Peptididentifikation insgesamt hohe Sequenzabdeckungen erzielt werden. Auf diese Weise lassen sich detaillierte Rückschlüsse zum Spaltverhalten der eingesetzten Enzyme ziehen. MMP-12 hatte, gemessen an den identifizierten Peptiden, die höchste Aktivität der drei Proteasen. Dies ist in Übereinstimmung mit früheren Studien zu nativem

^f Bei Xxx und Yyy kann es sich um beliebige Aminosäurereste handeln; besonders häufig befinden sich dort jedoch Prolin- (Xxx) und Hydroxyprolinreste (Yyy).

Elastin ([Shapiro und Senior, 1998](#)). Der Vergleich der MMPs zeigte, dass alle drei Proteasen in ähnlicher Weise hydrophobe und aliphatische Aminosäurereste in P'₁-Position tolerieren und im Falle der MMP-7 eine hohe Präferenz für Leu in dieser Position aufweisen. MMP-12 hatte wiederum die insgesamt höchste Toleranz für sperrige geladene und aliphatische Aminosäurereste. Ergänzend zu bereits beschriebenen akzeptierten Aminosäureresten in P'₁ fanden wir insbesondere für MMP-12 und MMP-9 häufig auch Lys-Reste in dieser Position. Anhand eines ausgewählten Hexapeptids konnten wir mittels molekularer Modellierung zeigen, dass beide Enzyme Lys in P'₁ akzeptieren. Zudem zeigte sich anhand zahlreicher Peptide für alle drei MMPs die bereits zuvor beobachtete Präferenz für Pro in P₃.

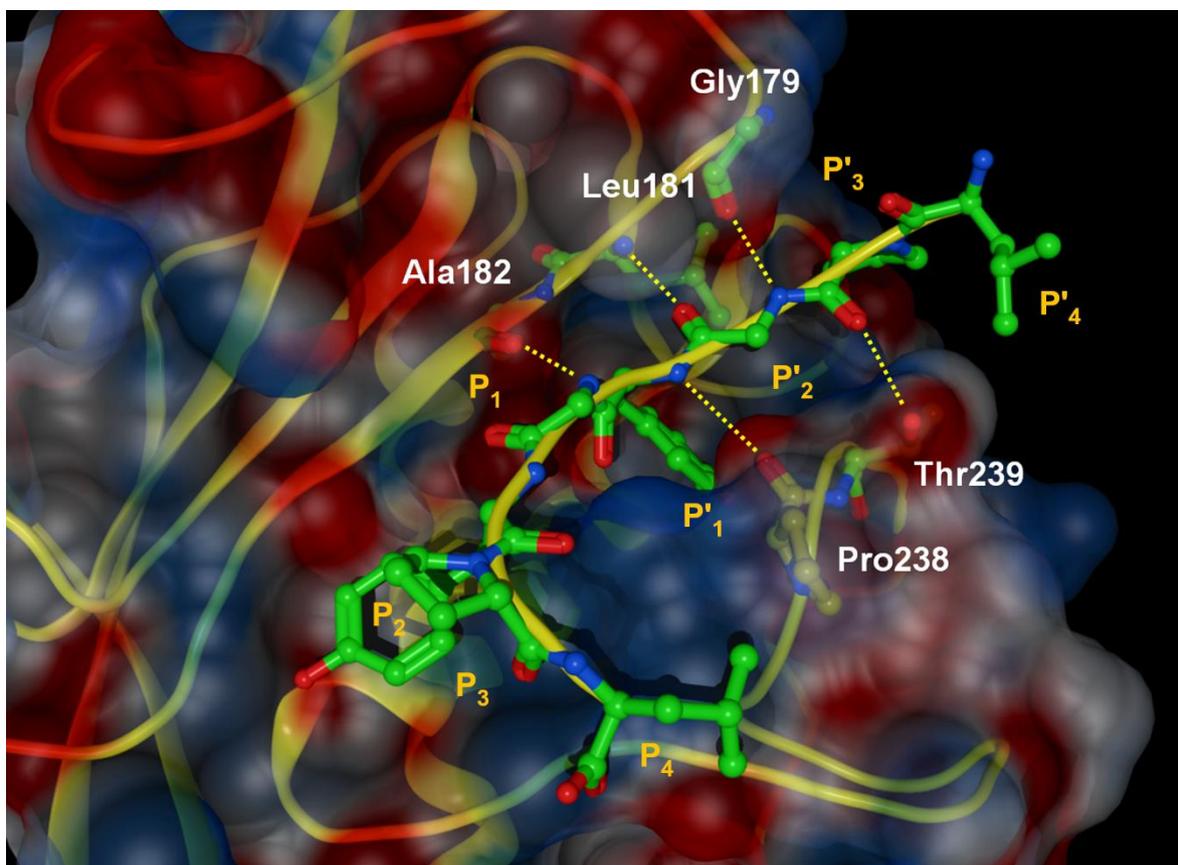


Abb. 14: Interaktion des natürlichen Substrats LPYGYGPG (Aminosäurereste 226 bis 233 aus Tropoelastin Isoform 2) mit dem aktiven Zentrum der Makrophagenelastase (MMP-12). Die Moleküloberfläche der Bindungstasche ist entsprechend ihres elektrostatischen Potentials farblich hervorgehoben (rot für negatives und blau für positives Potenzial). Die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Resten des Substrates und den Bindungsstellen der MMP-12 sind mit gelb gestrichelten Linien dargestellt.

Anhand molekularer Modellierung wurde die Interaktion eines entsprechenden Oktapeptides mit dem katalytischen Zentrum der MMP-12 untersucht (siehe **Abb. 14**). Es zeigte

sich, dass das Peptidrückrat aufgrund des Pro-Restes in P₃ in eine gekrümmte Konformation gezwungen wird, die die Bindung an das aktive Zentrum begünstigt ([#Heinz et al., 2010](#)).

Neben diesen umfangreichen Untersuchungen zu den Spaltstellen lag ein weiterer Schwerpunkt auf der Freisetzung bioaktiver Peptide. Hierzu wurden Peptide von ausgewählten, Elastokine enthaltenden Bereichen der Domäne 24 synthetisiert und deren Hydrolyse analysiert ([#Taddese et al., 2009](#)). Weiterhin wurden einige durch die MMPs aus den Substraten freigesetzte und bis dahin nicht als Elastokine beschriebene Peptide hergestellt und mittels Gelatinezymographie auf ihre Aktivität hin getestet. Hierbei machten wir uns zu Nutze, dass humane Hautfibroblasten eine Zunahme der Sekretion von Pro-MMP-2 zeigen, wenn diese mit Elastokinen inkubiert werden ([#Duca et al., 2004](#)). Für alle untersuchten Peptide konnte eine hohe biologische Aktivität nachgewiesen werden ([#Heinz et al., 2010](#)).

Zwei weitere Studien widmeten sich detailliert Matrilysin-1 (MMP-7) ([#Heinz et al., 2011](#)) und der MT-MMP-1 (MMP-14) ([#Miekus et al., 2019](#)), wobei als Substrate sowohl TE als auch isoliertes und damit quervernetztes Elastin verwendet wurden. Die Ergebnisse erweitern das Bild zur Spaltung nativen Elastins durch MMPs. Insgesamt zeigte sich in allen MMP-Studien, dass in reifem Elastin die Mehrzahl der Spaltstellen in den N- und C-terminalen Bereichen auftraten, wohingegen in den Domänen 14 bis 24 vergleichsweise wenig Schnittstellen nachgewiesen wurden. Dies liegt vermutlich an einer schlechten sterischen Zugänglichkeit der MMPs für diese Molekülregionen.

2.4.2 Serinproteasen

(A6 [Heinz et al., 2012](#); A7 [Schmelzer et al., 2012](#))

Zu den Serinproteasen, die Elastin abbauen können, gehören neben der Gruppe der Pancreaselastasen ([#Getie et al., 2005](#); [#Joshi et al., 2018](#)) vor allem die neutrophilen Serinproteasen humane Leukozytenelastase (HLE), Proteinase 3 (PR3) und Cathepsin G (CatG). Alle drei Enzyme gehören zur Familie der Chymotrypsine, die durch das Vorhandensein einer katalytischen Triade, bestehend aus His57, Asp102 und Ser195, gekennzeichnet ist[§]. Die NSPs weisen in ihren biochemischen Wirkungen ein hohes Maß an Übereinstimmung auf, unterscheiden sich aber in ihren Substratspezifitäten. NSPs nehmen wichtige Funktionen bei einer Vielzahl physiologischer Prozesse ein. Zu ihnen gehören die Abwehr von Infektionen, der Abbau von Bestandteilen der EZM im Verlaufe von Entzündungsprozessen, der Gewebeumbau, die Wundheilung, Koagulation und Fibrinolyse. Darüber hinaus sind NSPs

[§] Die Nummerierung entsprechend der Aminosäuresequenz Chymotrypsins.

wichtige Regulatoren der angeborenen Immunantwort, indem sie die zelluläre Signalübertragung durch proteolytische Aktivierung oder Inaktivierung von Zytokinen (Interleukinen) und spezifischen Zellrezeptoren kontrollieren ([Korkmaz et al., 2008](#)).

HLE, PR3 und CatG werden von humanen polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten sezerniert und in ihrer aktiven Form in den azurophilen Granula gespeichert, aus denen sie als Reaktion auf Entzündungsprozesse freigesetzt werden. Alle drei NSPs hydrolysieren verschiedene Proteine der EZM sowie Plasmaproteine und sind darüber hinaus am Abbau aufgenommener Pathogene beteiligt ([Stapels et al., 2015](#)). Die HLE, die auch als neutrophile Elastase bezeichnet wird, ist ein stark kationisches Glykoprotein. Sie ist die wichtigste Protease, die am Abbau von EZM-Bestandteilen durch Neutrophile beteiligt ist und katalysiert die Hydrolyse einer Vielzahl extrazellulärer Makromoleküle wie Elastin, Kollagene, Fibronektin und Laminine. Außerdem baut sie Plasmaproteine wie Immunglobuline oder Tumornekrosefaktor- α ab ([Owen und Campbell, 1999](#)). CatG weist eine 37 %ige Sequenzhomologie mit HLE auf und spaltet eine Vielzahl von Substraten, darunter Elastin, Typ-IV-Kollagen, Fibronektin, Laminine und Plasmabestandteile wie Immunglobuline ([Owen und Campbell, 1999](#)). Die PR3, die 54 % Sequenzhomologie mit der HLE aufweist, wird auch als Myeloblastin bezeichnet und baut Elastin, Typ-IV-Kollagen, Fibronektin und Laminine ab ([Früh et al., 1996](#)).

Obwohl NSPs eine Vielzahl physiologischer Funktionen besitzen, kann eine aus dem Gleichgewicht geratene Aktivität auch zu Gewebeschäden führen und Entzündungsreaktionen verstärken, z. B. durch die Erhöhung der Expression von Wachstumsfaktoren, Chemokinen und Zytokinen ([Moraes et al., 2003](#)). NSPs werden mit verschiedenen Entzündungskrankheiten in Verbindung gebracht, darunter die chronisch obstruktive Lungenerkrankung, Lungenemphysem und Arthritis ([Korkmaz et al., 2008](#)). Es wird auch angenommen, dass akute Lungenerkrankungen als Folge eines Ungleichgewichts zwischen Elastasen und Elastase-Inhibitoren auftreten, wodurch es zum Abbau Elastins kommt. Das resultiert wiederum in einem Funktionsverlust der elastischen Fasern, in einer Schädigung der alveolären Strukturen und dies kann die Bildung von Lungenödemem nach sich ziehen ([Boudier et al., 1991](#)).

Zur Untersuchung des Spaltverhaltens von HLE, PR3 und CatG setzten wir, wie bei den MMP-Studien, sowohl den löslichen Vorläufer als auch reifes Elastin ein. Neben der Identifizierung der Spaltstellen galt es, strukturelle Erklärungen für die Präferenzen der Enzyme zu finden und die Freisetzung von Elastokinen zu untersuchen ([#Heinz et al., 2012](#)).

Die wichtigste Interaktion für die Spaltung durch NSPs ist jene zwischen P_1 und S_1 . Die aus Massenspektrometriedaten erhaltenen Peptidsequenzen zeigten, dass HLE und PR3 besonders kleine aliphatische und/oder hydrophobe Aminosäurereste wie Ala, Val, Gly in

P₁ bevorzugen. Die Spaltung an anderen, insbesondere sperrigen Aminosäureresten spielt dagegen kaum eine Rolle. Im Gegensatz dazu wurden für CatG besonders die geladene Aminosäure Lys, aber auch aliphatische Aminosäurereste wie Ala, Leu und Val und sogar sperrige Aminosäurereste wie Phe oder Tyr in P₁ nachgewiesen. Der Vergleich der Ergebnisse beider Substrate zeigte eine hohe Übereinstimmung. Die Hauptunterschiede lagen hier bei den Spaltungen durch CatG, da es im Falle des unlöslichen Elastins durch die Abwesenheit freier Lys-Reste zu deutlich weniger Spaltungen kam.

Die Ergebnisse sind besonders mit Blick auf strukturelle Erkenntnisse aus Untersuchungen zu den Kristallstrukturen der drei NSPs schlüssig. Diese zeigen insgesamt vergleichbare Geometrien der S₁-Taschen, die jedoch leicht in Größe, Flexibilität, Polarität und Anordnungen der Bindungen zwischen den Aminosäureresten variieren ([Bode et al., 1989](#); [Fujinaga et al., 1996](#); [Hof et al., 1996](#)). HLE und PR3 weisen halbkugelförmige Bindungsstellen mit hydrophobem Charakter auf, die Aminosäurereste mit zwei oder drei Kohlenstoffseitenketten in der S₁-Tasche aufnehmen können. Im Vergleich zur HLE ist die Bindungsstelle der PR3 dabei geringfügig polarer und in der Größe stärker beschränkend, da insbesondere ihre S₁-Tasche kleiner ausgeprägt ist ([Fujinaga et al., 1996](#)). Die Bindungsstelle der CatG ist hingegen voluminöser und flexibler und kann große aliphatische sowie hydrophobe aromatische und basische Aminosäurereste in der S₁-Tasche aufnehmen ([Hof et al., 1996](#)).

Hinsichtlich der bevorzugten Aminosäuren in P'₁-P'₄ und P₂-P₄ zeigten sich starke Ähnlichkeiten zwischen den drei NSPs. Sowohl für Tropoelastin als auch für Elastin wurden in P'₁-P'₄ und P₂-P₄ für alle drei Enzyme vorwiegend die Aminosäurereste Ala, Gly, Val und Pro gefunden, die besonders häufig in Tropoelastin vorkommen und ca. 80 % der Sequenz ausmachen. Auffällig war jedoch eine Präferenz für Pro in P₂ und P'₄. Für HLE wurde gezeigt, dass die S₂-Tasche hydrophob ist und mittelgroße hydrophobe Reste wie Pro toleriert, wobei der Pyrrolidinring die S₂-Tasche vollständig ausfüllt ([Bode et al., 1989](#)). Vermutlich induziert der Pro-Rest eine konformative Schleife, die wiederum die optimale Interaktion mit der Spalte des aktiven Zentrums ermöglicht ([Hof et al., 1996](#); [Réhault et al., 1999](#)). Insgesamt lässt sich zusammenfassen, dass es zwar Präferenzen der *Subsites* für bestimmte Aminosäurereste aufgrund von Unterschieden in Polarität und Größe in den Bindungsstellen gibt, dass aber praktisch jede Art von Rest an den entsprechenden *Subsites* aufgenommen werden kann.

In den drei Hydrolysaten Hautelastins konnten insgesamt 90 Peptide identifiziert werden, die Sequenzmotive mit potenziell bioaktiven Motiven enthielten. Aus dieser Liste möglicher Elastokine wurden wiederum zehn Peptide ausgewählt, synthetisiert und hinsichtlich ihrer Aktivität getestet. Hierbei machten wir es uns zunutze, dass einerseits die Elastinolyse die Kollagenolyse fördert und andererseits Fibroblasten für die Kollagenolyse

von großer Bedeutung sind, da sie große Mengen der interstitiellen Kollagenase MMP-1 sezernieren können ([Brassart et al., 2001](#); [Hornebeck et al., 2002](#)). Die Verwendung einer humanen Fibroblastenzellkultur eignet sich daher hervorragend, um den Einfluss von Liganden des EBP auf Umbauprozesse der Matrix zu untersuchen. Für alle getesteten Peptide wurde eine deutliche Stimulation der pro-MMP-1-Sekretion nachgewiesen. Interessanterweise zeigten langkettige Peptide, die beispielsweise mehrere GXXPG-Motive enthielten, keine höhere Aktivität als kurzkettige Peptide, die das Motiv nur einmal aufwiesen. Es gelang uns zudem, drei neue Motive zu identifizieren, für die zuvor keine Aktivität beschrieben wurde ([#Heinz et al., 2012](#)).

Auf diesen Erkenntnissen aufbauend, untersuchten wir in einer weiteren Studie erstmals das elastinolytische Potenzial von HLE und CatG unter Verwendung von reinem, fibrillärem Elastin ([#Schmelzer et al., 2012](#)). Dieses isolierten wir aus menschlicher Haut von Probanden unterschiedlichen Alters. Als weitere Substrate kamen mittels der Starcher-Methode isoliertes humanes Elastin sowie rekombinant hergestelltes humanes Tropoelastin zum Einsatz. Ein Aspekt war dabei die Untersuchung der zeitabhängigen Hydrolyse. Hierbei zeigte sich für TE, dass für beide Enzyme bei vergleichsweise niedrigen Enzymkonzentrationen bereits nach einer Minute kein intaktes Protein mehr nachweisbar war. Über einen Zeitraum von zehn Stunden wurden dann die anfangs bis etwa 17 kDa großen Peptide weiter gespalten, bis nur noch Peptide kleiner 5 kDa vorhanden waren. Anhand dieser Untersuchungen ließen sich sehr gut die besonders für Spaltungen präferierten Peptidbindungen identifizieren.

Weiterhin konnten wir zeigen, dass die HLE selbst bei sehr hohen, nicht physiologischen Konzentrationen intaktes, reifes Elastin nicht abbauen kann. Dies ist überraschend, da die Schädigung Elastins durch die HLE in der Fachliteratur häufig als maßgeblich im Zusammenhang mit verschiedenen pathologischen Zuständen genannt wurde ([Moroy et al., 2012](#); [Duca et al., 2016](#)). Wir wiesen zudem nach, dass die Unversehrtheit des isolierten Elastins einen erheblichen Einfluss auf seine Abbaubarkeit hat. Dies wurde insbesondere im direkten Vergleich mit Starcher-Elastin deutlich. Dieses wies bereits vor der Inkubation eine stark zerklüftete Struktur auf, wie anhand von elektronenmikroskopischen Untersuchungen deutlich wurde. Im Gegensatz zu dem fibrillär vorliegenden Elastin ließ sich das Starcher-Elastin durch die HLE leicht abbauen. Von noch größerer Bedeutung ist jedoch, dass sich ein direkter Zusammenhang zwischen dem biologischen Alter des Spendergewebes mit der Stabilität des isolierten Elastins nachweisen ließ. Schäden, die, wie im vorherigen Kapitel erläutert, im Laufe des Lebens entstehen, machten das Material angreifbar für Proteasen. Dies deutet darauf hin, dass elastische Fasern mit zunehmendem Alter ihre Widerstands-

fähigkeit gegenüber Proteasen verlieren. Dies ist vermutlich eine Erklärung für den beschleunigten Zerfall elastischer Fasern mit zunehmendem Alter und dem damit einhergehenden Funktionsverlust.

Insgesamt erscheint es unmöglich, dass die HLE eine treibende Kraft bei der Initiierung des Abbaus von Elastin ist. Wie jedoch in unseren ([#Heinz et al., 2012](#); [#Schmelzer et al., 2012](#)) sowie in anderen Studien ([Reilly et al., 1984](#); [Morrison et al., 1999](#)) gezeigt wurde, ist die HLE dennoch eine potente Protease, die beispielsweise TE schnell und umfassend hydrolysiert, aber auch geschädigte Elastinfasern abbauen kann. Daneben ist bekannt, dass die HLE auch effektiv das Fibrillin der Mikrofibrillen hydrolysieren kann ([Kielty et al., 1994](#)), die den Elastinkern wie einen Mantel umschließen. Alle diese Erkenntnisse legen nahe, dass die Protease dennoch an der fortschreitenden Schädigung des elastischen Fasernetzwerks beteiligt ist. Von besonderer Bedeutung ist zudem die Erkenntnis, dass CatG im Gegensatz zu HLE intaktes fibrilläres Hautelastin unter identischen Bedingungen hydrolysiert. Die Protease wird in großen Mengen in Neutrophilen gespeichert, weshalb ihre Abgabe in den extrazellulären Raum während der Phagozytose und des *Turnovers* der neutrophilen Granulozyten eine direkte Schädigung des elastischen Fasernetzwerks verursachen könnte. Dies wiederum würde die Stabilität Elastins herabsetzen und es für weitere Proteasen angreifbar machen.

Werb *et al.* definierten den Begriff Elastase als „Protease, die in der Lage ist, ohne weitere Beteiligung unlösliche Elastinfasern zu solubilisieren und abzubauen“ ([Werb et al., 1982](#))^h. Nach dieser Definition muss man in Anbetracht unserer Ergebnisse schlussfolgern, dass es sich bei der HLE nicht um eine Elastase handelt. Für eine bessere Einordnung der unterschiedlichen Proteasen in Bezug auf ihre elastinolytische Aktivität schlage ich die Einführung einer Klassifizierung vor, die vergleichbar mit derer der Kollagenasen und Gelatinasen ist. Unterschieden werden sollte zwischen echten Elastasen (engl. *genuine elastases*) und Pseudoelastasen (engl. *pseudo elastases*). Während es sich bei echten Elastasen um Proteasen handelt, die intaktes fibrilläres Elastin unter physiologischen Bedingungen abbauen können, vermögen Pseudoelastasen Elastin nur im denaturierten bzw. partiell hydrolysierten Zustand zu spalten.

Die Fähigkeit von Enzymen elastische Fasern zu schädigen bzw. Elastin zu hydrolysieren, wurde in der Vergangenheit fast ausschließlich in *In-vitro*-Studien bestimmt, in denen das verwendete Elastin zuvor mit relativ harschen Verfahren isoliert wurde. Mit den Erkennt-

^h Zitat im Original: „We define as an elastase any proteinase that is able to solubilize and degrade insoluble elastin fibers alone.“

nissen aus unseren Studien erscheint es sinnvoll, weitere Mitglieder der Familie der Elastasen im Hinblick auf ihre Interaktion mit Elastinfasern von hoher Integrität hin erneut zu überprüfen, um das tatsächliche elastinolytische Potenzial besser bewerten zu können.

2.4.3 Cysteinproteasen

(A7 Schmelzer *et al.*, 2012; A21 Panwar *et al.*, 2020)

Neben MMPs und NSPs beinhaltet auch die Familie der Cysteinproteasen einige Elastasen. Allen Cysteinproteasen ist eine aus den Aminosäuren Cystein und Histidin bestehende katalytische Diade gemein. Eine wichtige Unterfamilie bilden die Papain-ähnlichen Cysteinproteasen (Clan CA, Familie C1), deren Mitglieder im gesamten Tier- und Pflanzenreich weit verbreitet sind und auch in Viren und Bakterien nachgewiesen wurden. Im Falle der Säugetiere sind die Proteasen auch als thiolabhängige Cysteincathepsine (CCs) bekannt. Für den Menschen wurden elf CCs identifiziert, bei denen es sich um lysosomale Proteasen handelt (Lecaille *et al.*, 2002), die wichtige Funktionen beim intrazellulären Proteinabbau und der MHC II-vermittelten Immunantwort übernehmen. CCs kommen auch im Cytoplasma und Zellkern vor und werden in den Extrazellularraum sezerniert, wo sie am pathophysiologischen Abbau von EZM-Proteinen beteiligt sind (Sage *et al.*, 2014; Vizovišek *et al.*, 2019). Ihre dysregulierte und erhöhte Aktivität in der EZM ist kennzeichnend für zahlreiche Krankheiten, darunter verschiedene entzündliche Erkrankungen, mehrere Krebserkrankungen, rheumatoide Arthritis sowie Knochen- und Herzerkrankungen (Vizovišek *et al.*, 2019). Zu den Elastin hydrolysierenden CCs werden die Cathepsine K, L, S und V gezählt. Deren elastinolytische Potenziale liegen dabei teilweise deutlich über denen relevanter MMPs und einiger NSPs (Yasuda *et al.*, 2004).

Gemeinsam mit einer Arbeitsgruppe aus British Columbia (Kanada) untersuchten wir die altersabhängige Expression der Cathepsine K (CatK), S (CatS) und V (CatV) in der Haut sowie ihren Einfluss auf die Integrität des elastischen Fasernetzwerks. Hierzu kamen neben bovinen Hautproben auch Proben menschlicher Haut von Probanden im Alter zwischen 6 und 86 Jahren zum Einsatz, die in drei Gruppen (6-10, 30-40 und 70-86 Jahren) eingeteilt wurden. An den Hautproben wurden histologische Untersuchungen vorgenommen sowie Elastin aus ihnen mit unserer Isolationsmethode isoliert (Schmelzer *et al.*, 2012). Das wurde vor und nach der Inkubation mit den drei CCs mit unterschiedlichen Methoden hinsichtlich proteolytischer Resistenz, Freisetzung von Elastokinen und, im Falle der bovinen Elastinproben, auch mittels Zugversuchen hinsichtlich mechanischer Eigenschaften charakterisiert (Panwar *et al.*, 2020).

Histologische Untersuchungen zeigten mit zunehmendem Alter der Probanden eine Abnahme der Dicke der Epidermis, den Verlust der dermalen Papillen und eine signifikante Verringerung des Elastingehalts in der Dermis. Dies ist in guter Übereinstimmung zu einer früheren Arbeit, in der gezeigt wurde, dass sich der Elastingehalt im Laufe des Lebens ungefähr halbiert ([Seite et al., 2006](#)). Altersabhängige Einflüsse auf das Netzwerk der Elastinfasern zeigten sich zudem sehr deutlich bei morphologischen Untersuchungen mittels Elektronenmikroskopie. Das biologisch jüngere Elastin wies ein dichtes Netz dünner Fasern auf, wohingegen das Netzwerk des älteren Elastins poröser und durch Aggregation dünnerer Fasern gekennzeichnet war. Die immunhistochemische Analyse zeigte mit zunehmendem Alter abnehmende Expressionsraten für CatK, CatS und CatV in Epidermis und Dermis. Dies ist in Übereinstimmung mit den Ergebnissen einer früheren Studie ([Sage et al., 2014](#)) und lässt sich mit einer reduzierten Zellularität der Cathepsine exprimierenden Zellen in der gealterten Haut erklären.

Der mit dem Alter korrelierende Verlust von Elastin und Kollagen trat vor allem in den papillären und oberen retikulären Hautschichten auf. Das sind die Bereiche, die den CC-reichen Epidermalschichten *Stratum spinosum* und *Stratum basale* am nächsten liegen. Der genaue Mechanismus der Beteiligung von CCs am Matrixabbau an diesen Stellen ist noch immer unklar. Während ein möglicher Mechanismus die Phagozytose von Elastin- und Kollagenfasern ([Rünger et al., 2007](#)) durch in der Dermis vorkommende Zellen wie Fibroblasten, Makrophagen, Mastzellen oder dendritische Zellen ist, kann der langsame und im Alter fortschreitende Verlust von elastischen Fasern auch durch die Interaktionen mit sezernierten CCs aus dem epidermalen *Stratum basale* in die Dermis verursacht werden. Zudem ist es wahrscheinlich, dass die anderen zuvor genannten elastinolytischen NSPs und MMPs zur Schädigung elastischer Fasern beitragen.

Die Schäden an den Elastinfasern konnten für die drei Altersgruppen eindrucksvoll anhand elektronenmikroskopischer Untersuchungen visualisiert (siehe **Abb. 15** beispielhaft für eine Altersgruppe) und mittels DES/IDES-Bestimmungen auch quantifiziert werden. Dabei zeigte sich mit steigendem Alter der Probanden für alle drei CCs eine Zunahme des abgegebenen DES/IDES.

Die MS-Analysen der freigesetzten Peptide ergaben weiterhin, dass alle drei Cathepsine bevorzugt in hydrophoben Domänen spalteten. Es konnte eine detaillierte Spaltstellenanalyse durchgeführt werden. Die Daten zeigten zudem eine unterschiedliche Zugänglichkeit des reifen Elastins durch die drei CCs. Während bei der Inkubation von Hautelastin mit CatK und CatV eine vergleichbare Anzahl von Spaltprodukten unterschiedlicher Länge unabhängig vom Alter des Hautelastins freigegeben wurden, erzeugte CatS längere Peptide und dies insbesondere bei dem Elastin älterer Probanden. Dies könnte darauf hinweisen, dass die

Proteasen unterschiedliche *Exosites*ⁱ für die Bindung an Elastin verwenden. Im Gegensatz dazu sind die Spezifitäten der *Subsites* aller drei CCs sehr ähnlich. Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass die Spezifitäten der aktiven Zentren weniger entscheidend für die Länge der freigesetzten Peptide sind als ihre *Exosites*.

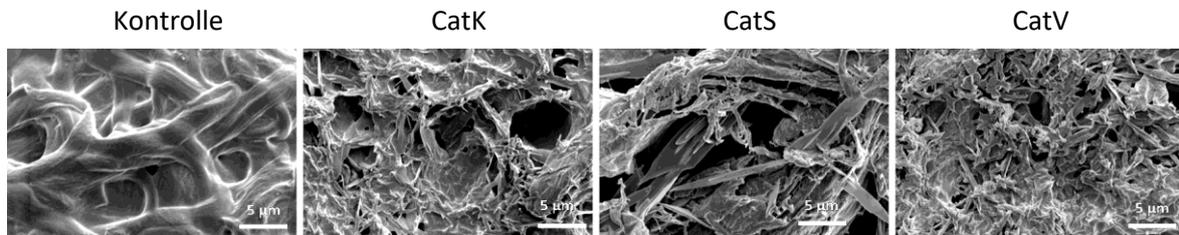


Abb. 15: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von humanem Hautelastin eines 30jährigen Probanden nach zehnstündiger Inkubation mit den Cathepsinen K, S und V (Skala=5 µm).

Anhand der Ergebnisse der LC-MS-Analysen, der Auswertung der Peptiddaten und der elektronenmikroskopischen Untersuchungen der humanen Elastinfasern wurde deutlich, dass CatV die potenteste Elastase dieser drei CCs ist, gefolgt von CatK und CatS. Dies war in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der biomechanischen Analysen der teilweise hydrolysierten bovinen Elastinfasern. Auch hier zeigte sich anhand der bestimmten Parameter Bruchspannung, Bruchdehnung und Elastizitätsmodul für CatV der stärkste Einfluss auf die Abnahme der mechanischen Stabilität. So verringerte sich beispielsweise der elastische Modul bei einer sechsstündigen Inkubation mit 1 µM CatV von 1,1 MPa auf 0,3 MPa. Es konnte zudem nachgewiesen werden, dass die Elastinolyse durch die Verwendung eines ektosterischen Inhibitors effizient gehemmt werden kann. Darüber hinaus führte der Abbau von Elastinfasern zur Freisetzung bioaktiver Peptide, die in unserer Studie identifiziert wurden und die in anderen Arbeiten, wie zuvor erwähnt, mit verschiedenen Erkrankungen in Verbindung gebracht wurden. Die untersuchten Cathepsine sind aggressive, elastinabbauende Enzyme und in der Lage, Elastinfasern in ihrer Stabilität zu beeinträchtigen und dabei eine Vielzahl von Elastokinen zu erzeugen. Sie stellen wichtige Zielmoleküle dar, um Strategien zur Verringerung von EZM-Schäden im Rahmen von Alterungsprozessen und Erkrankungen zu entwickeln.

ⁱ Eine *Exosite* ist eine sekundäre, vom aktiven Zentrum entfernte Bindungsstelle.

3 ZUSAMMENFASSUNG

Die in dieser kumulativen Habilitationsschrift vorgestellten Arbeiten widmeten sich der Entstehung, den Eigenschaften und der Schädigung des abundanten und mit einzigartigen Eigenschaften ausgestatteten Strukturproteins Elastin. Als Hauptkomponente elastischer Fasern trägt es erheblich zur strukturellen Integrität und Biomechanik dynamischer Gewebe von Vertebraten bei. Beispielsweise wären der geschlossene Blutkreislauf und die mechanische Funktion der Lungen ohne Elastin nicht möglich und folglich hat das Erscheinen dieses Proteins ganz wesentlich zum evolutionären Erfolg der Wirbeltiere beigetragen.

Die außergewöhnlichen Eigenschaften Elastins haben die Untersuchung seiner Bildung und Struktur zu einer der anspruchsvollsten Aufgaben in der Matrixbiologie gemacht. Wesentliche Fortschritte in den Biowissenschaften, der instrumentellen Analytik und Bioinformatik ermöglichten in den vergangenen Jahren Untersuchungen, die das Wissen über die Genexpression und Synthese der monomeren Form Tropoelastin sowie dessen Assemblierung zu reifem Elastin deutlich erweitert haben.

Unsere Arbeiten zur Elastogenese schließen hier an und geben neue Einblicke in die für die Funktion vertebraler Gewebe essenziellen posttranslationalen Modifikationen Elastins. Hierfür entwickelten wir mehrere Workflows, die auf unterschiedlichen biochemischen Methoden, analytischen Techniken sowie neuartigen Softwarealgorithmen basieren. Sie gestatteten die Identifizierung einer großen Anzahl nativer bi- und tetrafunktionaler Quervernetzungen, die einen detaillierten Einblick in die molekulare Komplexität des für die Assemblierung Elastins bedeutenden Quervernetzungsprozesses geben. Sie zeigen, dass die Interaktionen der Lysinreste und die durch Lysyloxidasen erzeugten Allysinreste sowohl intra- als auch intermolekular ablaufen. Anders als einige Modelle zur Assemblierung der Monomere vorschlagen, verlaufen diese äußerst heterogen und nach keinem erkennbaren Muster. Im Detail bedeutet dies, dass jeder einzelne Allysin- und nicht modifizierte Lysinrest in verschiedene Quervernetzungen mit anderen Resten involviert sein kann.

Weiterhin konnten wir nachweisen, dass die Aminoxidase LOXL2 in der Lage ist, mit Tropoelastin zu interagieren und dabei die Bildung der für Elastin einzigartigen Quervernetzungen inklusive Desmosin zu induzieren. Unsere Erkenntnisse deuten insgesamt darauf hin, dass LOXL2 neben LOX und LOXL1 eine unterstützende Rolle bei der Elastogenese spielt. Die Aminoxidase ermöglicht zudem *ex vivo* die biomimetische Erzeugung von elastinähnlichen Biomaterialien mit entsprechenden günstigen Eigenschaften, ohne dabei die Nachteile der für zellbasierte Ansätze problematische Toxizität klassischer chemischer Quervernetzer aufzuweisen. Das von uns erzeugte künstliche Elastin weist in Hinsicht auf

die proteolytische Stabilität und die mechanischen Eigenschaften große Ähnlichkeit mit nativem Elastin auf.

Eine weitere, im Rahmen der Elastogenese stattfindende, posttranslationale Modifikation ist die Prolylhydroxylierung, die wir für mehrere Gewebe unterschiedlicher Spezies detailliert untersuchten. Dafür wurde die Modifikation an ausgewählten Aminosäureresten quantifiziert. Wir konnten auf diese Weise einen klaren Zusammenhang zwischen dem Grad der Modifikation ausgewählter Reste und der jeweiligen Gewebeart zeigen. Obgleich die genaue Bedeutung dieser Modifikation für die Bildung bzw. Funktion Elastins noch unklar ist, ist ein Einfluss der Hydroxylierungen auf die Struktur bzw. Morphologie des reifen Elastins wahrscheinlich und verdient weitere Aufmerksamkeit.

Die Menge, Funktionalität und Morphologie elastischer Fasern ist trotz der Langlebigkeit Elastins von irreversiblen Veränderungen geprägt, die sich auch unter nicht pathologischen Bedingungen langfristig auf die Leistungsfähigkeit von Organen negativ auswirken. Die schwerwiegendsten Schädigungen Elastins werden höchstwahrscheinlich durch extrazellulär vorkommende Proteasen hervorgerufen. Der Abbau Elastins bzw. seines Vorläufers wurde für nach derzeitigem Kenntnisstand alle relevanten Proteasen aus den Familien der Matrix-Metallo-, Serin- und Cysteinproteasen hinsichtlich Spaltspezifitäten und der Freisetzung von bioaktiven Peptiden systematisch charakterisiert. Dabei zeigte sich u.a., dass manche beschriebene Elastase Elastin nur unter bestimmten Bedingungen hydrolysieren kann.

Um ein vollständiges Bild von der Bildung und dem Zerfall elastischer Fasernetzwerke zu erhalten, müssen noch viele offene Fragen beantwortet werden. Obwohl mittlerweile zahlreiche Moleküle, die direkt oder indirekt an der Elastogenese beteiligt sind, identifiziert wurden, ist teilweise nur wenig über ihre genaue Rolle und die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen bekannt. Zukünftig muss man sich daher auf diese und bisher noch unbekannte Wechselwirkungen, ihre Reihenfolge, ihren zeitlichen Ablauf und gewebespezifische Unterschiede konzentrieren. Auch die von uns und anderen Arbeitsgruppen gezeigten Variationen und Veränderungen des Elastinmonomers, die durch alternatives Spleißen und verschiedene Modifikationen hervorgerufen werden, müssen hinsichtlich Ihrer Auswirkungen auf die Bildung und Eigenschaften des Biopolymers eingehend untersucht werden.

4 LITERATUR

- Aaron, B. B. und Gosline, J. M.** (1981) Elastin as a Random-Network Elastomer - a Mechanical and Optical Analysis of Single Elastin Fibers. *Biopolymers* **20** (6): 1247-1260.
- Akagawa, M., Yamazaki, K. und Suyama, K.** (1999) Cyclopentenosine, major trifunctional crosslinking amino acid isolated from acid hydrolysate of elastin. *Arch Biochem Biophys* **372** (1): 112-120.
- Akagawa, M. und Suyama, K.** (2000) Mechanism of formation of elastin crosslinks. *Connect Tissue Res* **41** (2): 131-141.
- Akagawa, M. und Suyama, K.** (2001) Characterization of a model compound for the lysine tyrosylquinone cofactor of lysyl oxidase. *Biochemical and biophysical research communications* **281** (1): 193-199.
- Amar, S., Smith, L. und Fields, G. B.** (2017) Matrix metalloproteinase collagenolysis in health and disease. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* **1864** (11 Pt A): 1940-1951.
- Antonicelli, F., Bellon, G., Debelle, L. und Hornebeck, W.** (2007) Elastin-elastases and inflammaging. *Curr Top Dev Biol* **79**: 99-155.
- Baig, K. M., Vlaovic, M. und Anwar, R. A.** (1980) Amino acid sequences C-terminal to the crosslinks in bovine elastin. *Biochem J* **185** (3): 611-616.
- Baldock, C., Oberhauser, A. F., Ma, L., Lammie, D., Siegler, V., Mithieux, S. M., Tu, Y., Chow, J. Y., Suleman, F., Malfois, M., Rogers, S., Guo, L., Irving, T. C., Wess, T. J. und Weiss, A. S.** (2011) Shape of tropoelastin, the highly extensible protein that controls human tissue elasticity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108** (11): 4322-4327.
- Baldwin, A. K., Simpson, A., Steer, R., Cain, S. A. und Kielty, C. M.** (2013) Elastic fibres in health and disease. *Expert Rev Mol Med* **15**: e8.
- Bax, D. V., Mahalingam, Y., Cain, S., Mellody, K., Freeman, L., Younger, K., Shuttleworth, C. A., Humphries, M. J., Couchman, J. R. und Kielty, C. M.** (2007) Cell adhesion to fibrillin-1: identification of an Arg-Gly-Asp-dependent synergy region and a heparin-binding site that regulates focal adhesion formation. *J Cell Sci* **120** (Pt 8): 1383-1392.
- Bax, D. V., Rodgers, U. R., Bilek, M. M. und Weiss, A. S.** (2009) Cell adhesion to tropoelastin is mediated via the C-terminal GRKRK motif and integrin alphaVbeta3. *J Biol Chem* **284** (42): 28616-28623.
- Bentley, J. P. und Hanson, A. N.** (1969) Hydroxyproline of elastin. *Biochimica et Biophysica Acta* **175** (2): 339-344.
- Blaise, S., Romier, B., Kawecki, C., Ghirardi, M., Rabenoelina, F., Baud, S., Duca, L., Maurice, P., Heinz, A., Schmelzer, C. E. H., Tarpin, M., Martiny, L., Garbar, C., Dauchez, M., Debelle, L. und Durlach, V.** (2013) Elastin-derived peptides are new regulators of insulin resistance development in mice. *Diabetes* **62** (11): 3807-3816.
- Blanchevoye, C., Floquet, N., Scandolera, A., Baud, S., Maurice, P., Bocquet, O., Blaise, S., Ghoneim, C., Cantarelli, B., Delacoux, F., Dauchez, M., Efremov, R. G., Martiny, L., Duca, L. und Debelle, L.** (2013) Interaction between the elastin peptide VGVAPG and human elastin binding protein. *J Biol Chem* **288** (2): 1317-1328.
- Bochicchio, B., Laurita, A., Heinz, A., Schmelzer, C. E. H. und Pepe, A.** (2013) Investigating the role of (2S,4R)-4-hydroxyproline in elastin model peptides. *Biomacromolecules* **14** (12): 4278-4288.
- Bode, W., Meyer, E., Jr. und Powers, J. C.** (1989) Human leukocyte and porcine pancreatic elastase: X-ray crystal structures, mechanism, substrate specificity, and mechanism-based inhibitors. *Biochemistry* **28** (5): 1951-1963.

- Boudier, C., Godeau, G., Hornebeck, W., Robert, L. und Bieth, J. G.** (1991) The Elastolytic Activity of Cathepsin-G - an Exvivo Study with Dermal Elastin. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* **4** (6): 497-503.
- Brassart, B., Fuchs, P., Huet, E., Alix, A. J., Wallach, J., Tamburro, A. M., Delacoux, F., Haye, B., Emonard, H., Hornebeck, W. und Debelle, L.** (2001) Conformational dependence of collagenase (matrix metalloproteinase-1) up-regulation by elastin peptides in cultured fibroblasts. *J Biol Chem* **276** (7): 5222-5227.
- Bressan, G. M., Daga-Gordini, D., Colombatti, A., Castellani, I., Marigo, V. und Volpin, D.** (1993) Emilin, a component of elastic fibers preferentially located at the elastin-microfibrils interface. *J Cell Biol* **121** (1): 201-212.
- Brocker, C. N., Vasiliou, V. und Nebert, D. W.** (2009) Evolutionary divergence and functions of the ADAM and ADAMTS gene families. *Hum Genomics* **4** (1): 43-55.
- Broekelmann, T. J., Kozel, B. A., Ishibashi, H., Werneck, C. C., Keeley, F. W., Zhang, L. und Mecham, R. P.** (2005) Tropoelastin interacts with cell-surface glycosaminoglycans via its COOH-terminal domain. *J Biol Chem* **280** (49): 40939-40947.
- Broekelmann, T. J., Ciliberto, C. H., Shifren, A. und Mecham, R. P.** (2008) Modification and functional inactivation of the tropoelastin carboxy-terminal domain in cross-linked elastin. *Matrix Biol* **27** (7): 631-639.
- Brömme, D., Okamoto, K., Wang, B. B. und Biroc, S.** (1996) Human cathepsin O2, a matrix protein-degrading cysteine protease expressed in osteoclasts. Functional expression of human cathepsin O2 in *Spodoptera frugiperda* and characterization of the enzyme. *J Biol Chem* **271** (4): 2126-2132.
- Brown-Augsburger, P., Tisdale, C., Broekelmann, T., Sloan, C. und Mecham, R. P.** (1995) Identification of an elastin cross-linking domain that joins three peptide chains. Possible role in nucleated assembly. *J Biol Chem* **270** (30): 17778-17783.
- Brown-Augsburger, P., Broekelmann, T., Rosenbloom, J. und Mecham, R. P.** (1996) Functional domains on elastin and microfibril-associated glycoprotein involved in elastic fibre assembly. *Biochem J* **318** (Pt 1): 149-155.
- Bultmann-Mellin, I., Conradi, A., Maul, A. C., Dinger, K., Wempe, F., Wohl, A. P., Imhof, T., Wunderlich, F. T., Bunck, A. C., Nakamura, T., Koli, K., Bloch, W., Ghanem, A., Heinz, A., von Melchner, H., Sengle, G. und Sterner-Kock, A.** (2015) Modeling autosomal recessive cutis laxa type 1C in mice reveals distinct functions for Ltbp-4 isoforms. *Disease models & mechanisms* **8** (4): 403-415.
- Cavinato, M. und Jansen-Durr, P.** (2017) Molecular mechanisms of UVB-induced senescence of dermal fibroblasts and its relevance for photoaging of the human skin. *Exp Gerontol* **94**: 78-82.
- Cerdà-Costa, N. und Gomis-Rüth, F. X.** (2014) Architecture and function of metallopeptidase catalytic domains. *Protein Sci* **23** (2): 123-144.
- Chakraborti, S., Mandal, M., Das, S., Mandal, A. und Chakraborti, T.** (2003) Regulation of matrix metalloproteinases: an overview. *Mol Cell Biochem* **253** (1-2): 269-285.
- Charbonneau, N. L., Carlson, E. J., Tufa, S., Sengle, G., Manalo, E. C., Carlberg, V. M., Ramirez, F., Keene, D. R. und Sakai, L. Y.** (2010) In vivo studies of mutant fibrillin-1 microfibrils. *J Biol Chem* **285** (32): 24943-24955.
- Choudhury, R., McGovern, A., Ridley, C., Cain, S. A., Baldwin, A., Wang, M. C., Guo, C., Mironov, A., Jr., Drymoussi, Z., Trump, D., Shuttleworth, A., Baldock, C. und Kielty, C. M.** (2009) Differential regulation of elastic fiber formation by fibulin-4 and -5. *J Biol Chem* **284** (36): 24553-24567.
- Chrzanowski, P., Keller, S., Cerreta, J., Mandl, I. und Turino, G. M.** (1980) Elastin content of normal and emphysematous lung parenchyma. *Am J Med* **69** (3): 351-359.

- Chung, J. H., Seo, J. Y., Lee, M. K., Eun, H. C., Lee, J. H., Kang, S., Fisher, G. J. und Voorhees, J. J.** (2002) Ultraviolet modulation of human macrophage metalloelastase in human skin in vivo. *J Invest Dermatol* **119** (2): 507-512.
- Chung, M. I., Miao, M., Stahl, R. J., Chan, E., Parkinson, J. und Keeley, F. W.** (2006) Sequences and domain structures of mammalian, avian, amphibian and teleost tropoelastins: Clues to the evolutionary history of elastins. *Matrix Biol* **25** (8): 492-504.
- Clarke, A. W., Arnsperg, E. C., Mithieux, S. M., Korkmaz, E., Braet, F. und Weiss, A. S.** (2006) Tropoelastin massively associates during coacervation to form quantized protein spheres. *Biochemistry* **45** (33): 9989-9996.
- Corson, G. M., Charbonneau, N. L., Keene, D. R. und Sakai, L. Y.** (2004) Differential expression of fibrillin-3 adds to microfibril variety in human and avian, but not rodent, connective tissues. *Genomics* **83** (3): 461-472.
- Cox, B. A., Starcher, B. C. und Urry, D. W.** (1974) Communication: Coacervation of tropoelastin results in fiber formation. *J Biol Chem* **249** (3): 997-998.
- Curci, J. A., Liao, S., Huffman, M. D., Shapiro, S. D. und Thompson, R. W.** (1998) Expression and localization of macrophage elastase (matrix metalloproteinase-12) in abdominal aortic aneurysms. *J Clin Invest* **102** (11): 1900-1910.
- Daamen, W. F., Hafmans, T., Veerkamp, J. H. und Van Kuppevelt, T. H.** (2001) Comparison of five procedures for the purification of insoluble elastin. *Biomaterials* **22** (14): 1997-2005.
- Daamen, W. F., Hafmans, T., Veerkamp, J. H. und van Kuppevelt, T. H.** (2005) Isolation of intact elastin fibers devoid of microfibrils. *Tissue Eng* **11** (7-8): 1168-1176.
- Daamen, W. F.** (2006) Elastin as a biomaterial for tissue engineering, *Dissertation*, Radboud University, Nijmegen.
- Dao, H. H., Essalihi, R., Bouvet, C. und Moreau, P.** (2005) Evolution and modulation of age-related medial elastocalcinosis: impact on large artery stiffness and isolated systolic hypertension. *Cardiovasc Res* **66** (2): 307-317.
- Davis, E. C., Roth, R. A., Heuser, J. E. und Mecham, R. P.** (2002) Ultrastructural properties of ciliary zonule microfibrils. *J Struct Biol* **139** (2): 65-75.
- Davis, N. R. und Anwar, R. A.** (1970) On the mechanism of formation of desmosine and isodesmosine cross-links of elastin. *J Am Chem Soc* **92** (12): 3778-3782.
- Debelle, L. und Alix, A. J.** (1999) The structures of elastins and their function. *Biochimie* **81** (10): 981-994.
- Debelle, L. und Tamburro, A. M.** (1999) Elastin: molecular description and function. *Int J Biochem Cell Biol* **31** (2): 261-272.
- Devy, J., Duca, L., Cantarelli, B., Joseph-Pietras, D., Scandolera, A., Rusciani, A., Parent, L., Thevenard, J., Pasco, S. B., Tarpin, M., Martiny, L. und Debelle, L.** (2010) Elastin-derived peptides enhance melanoma growth in vivo by upregulating the activation of Mcol-A (MMP-1) collagenase. *Br J Cancer* **103** (10): 1562-1570.
- Duca, L., Floquet, N., Alix, A. J., Haye, B. und Debelle, L.** (2004) Elastin as a matrikine. *Crit Rev Oncol Hematol* **49** (3): 235-244.
- Duca, L., Blanchevoys, C., Cantarelli, B., Ghoneim, C., Dedieu, S., Delacoux, F., Hornebeck, W., Hinek, A., Martiny, L. und Debelle, L.** (2007) The elastin receptor complex transduces signals through the catalytic activity of its Neu-1 subunit. *J Biol Chem* **282** (17): 12484-12491.
- Duca, L., Blaise, S., Romier, B., Laffargue, M., Gayral, S., El Btaouri, H., Kawecki, C., Guillot, A., Martiny, L., Debelle, L. und Maurice, P.** (2016) Matrix ageing and vascular impacts: focus on elastin fragmentation. *Cardiovasc Res* **110** (3): 298-308.
- Dyksterhuis, L. B., Baldock, C., Lammie, D., Wess, T. J. und Weiss, A. S.** (2007) Domains 17-27 of tropoelastin contain key regions of contact for coacervation and contain an unusual turn-containing crosslinking domain. *Matrix Biol* **26** (2): 125-135.

- Eyre, D. R., Paz, M. A. und Gallop, P. M.** (1984) Cross-linking in collagen and elastin. *Annu Rev Biochem* **53**: 717-748.
- Fernandes, R. J. und Eyre, D. R.** (1999) The elastin-like protein matrix of lamprey branchial cartilage is cross-linked by lysyl pyridinoline. *Biochem Biophys Res Commun* **261** (3): 635-640.
- Floquet, N., Hery-Huynh, S., Dauchez, M., Derreumaux, P., Tamburro, A. M. und Alix, A. J.** (2004) Structural characterization of VGVAPG, an elastin-derived peptide. *Biopolymers* **76** (3): 266-280.
- Früh, H., Kostoulas, G., Michel, B. A. und Baici, A.** (1996) Human myeloblastin (leukocyte proteinase 3): reactions with substrates, inactivators and activators in comparison with leukocyte elastase. *Biol Chem* **377** (9): 579-586.
- Fujinaga, M., Chernaia, M. M., Halenbeck, R., Koths, K. und James, M. N.** (1996) The crystal structure of PR3, a neutrophil serine proteinase antigen of Wegener's granulomatosis antibodies. *J Mol Biol* **261** (2): 267-278.
- Gerber, G. E. und Anwar, R. A.** (1974) Structural studies on cross-linked regions of elastin. *J Biol Chem* **249** (16): 5200-5207.
- Gerber, G. E. und Anwar, R. A.** (1975) Comparative studies of the cross-linked regions of elastin from bovine ligamentum nuchae and bovine, porcine and human aorta. *Biochem J* **149** (3): 685-695.
- Getie, M., Schmelzer, C. E. H. und Neubert, R. H. H.** (2005) Characterization of peptides resulting from digestion of human skin elastin with elastase. *Proteins* **61** (3): 649-657.
- Gharib, S. A., Manicone, A. M. und Parks, W. C.** (2018) Matrix metalloproteinases in emphysema. *Matrix Biol* **73**: 34-51.
- Gorisse, L., Pietrement, C., Vuiblet, V., Schmelzer, C. E. H., Köhler, M., Duca, L., Debelle, L., Fornes, P., Jaisson, S. und Gillery, P.** (2016) Protein carbamylation is a hallmark of aging. *Proc Natl Acad Sci U S A* **113** (5): 1191-1196.
- Gorres, K. L. und Raines, R. T.** (2010) Prolyl 4-hydroxylase. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **45** (2): 106-124.
- Gosline, J., Lillie, M., Carrington, E., Guerette, P., Ortlepp, C. und Savage, K.** (2002) Elastic proteins: biological roles and mechanical properties. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **357** (1418): 121-132.
- Götze, M., Pettelkau, J., Schaks, S., Bosse, K., Ihling, C. H., Krauth, F., Fritzsche, R., Kühn, U. und Sinz, A.** (2011) StavroX-a software for analyzing crosslinked products in protein interaction studies. *J Am Soc Mass Spectrom* **23** (1): 76-87.
- Gray, W. R.** (1977) Some kinetic aspects of crosslink biosynthesis. *Adv Exp Med Biol* **79**: 285-290.
- Green, E. M., Mansfield, J. C., Bell, J. S. und Winlove, C. P.** (2014) The structure and micromechanics of elastic tissue. *Interface focus* **4** (2): 20130058.
- Greenlee, T. K., Jr., Ross, R. und Hartman, J. L.** (1966) The fine structure of elastic fibers. *J Cell Biol* **30** (1): 59-71.
- Gronski, T. J., Jr., Martin, R. L., Kobayashi, D. K., Walsh, B. C., Holman, M. C., Huber, M., Van Wart, H. E. und Shapiro, S. D.** (1997) Hydrolysis of a broad spectrum of extracellular matrix proteins by human macrophage elastase. *J Biol Chem* **272** (18): 12189-12194.
- Hautamaki, R. D., Kobayashi, D. K., Senior, R. M. und Shapiro, S. D.** (1997) Requirement for macrophage elastase for cigarette smoke-induced emphysema in mice. *Science* **277** (5334): 2002-2004.
- Hedtke, T., Schröder, C. U., Heinz, A., Hoehenwarter, W., Brinckmann, J., Groth, T. und Schmelzer, C. E. H.** (2019) A comprehensive map of human elastin cross-linking during elastogenesis. *FEBS J* **286** (18): 3594-3610.
- Heim, A. J., Matthews, W. G. und Koob, T. J.** (2006) Determination of the elastic modulus of native collagen fibrils via radial indentation. *Appl Phys Lett* **89** (18): 181902.

- Heim, R. A., Pierce, R. A., Deak, S. B., Riley, D. J., Boyd, C. D. und Stolle, C. A. (1991) Alternative splicing of rat tropoelastin mRNA is tissue-specific and developmentally regulated. *Matrix* **11** (5): 359-366.
- Heinz, A., Jung, M. C., Duca, L., Sippl, W., Taddese, S., Ihling, C., Rusciani, A., Jahreis, G., Weiss, A. S., Neubert, R. H. H. und Schmelzer, C. E. H. (2010) Degradation of tropoelastin by matrix metalloproteinases--cleavage site specificities and release of matrikines. *FEBS J* **277** (8): 1939-1956.
- Heinz, A., Taddese, S., Sippl, W., Neubert, R. H. H. und Schmelzer, C. E. H. (2011) Insights into the degradation of human elastin by matrilysin-1. *Biochimie* **93** (2): 187-194.
- Heinz, A., Jung, M. C., Jahreis, G., Rusciani, A., Duca, L., Debelle, L., Weiss, A. S., Neubert, R. H. H. und Schmelzer, C. E. H. (2012) The action of neutrophil serine proteases on elastin and its precursor. *Biochimie* **94** (1): 192-202.
- Heinz, A., Ruttkies, C. K., Jahreis, G., Schröder, C. U., Wichapong, K., Sippl, W., Keeley, F. W., Neubert, R. H. H. und Schmelzer, C. E. H. (2013) In vitro cross-linking of elastin peptides and molecular characterization of the resultant biomaterials. *Biochim Biophys Acta* **1830** (4): 2994-3004.
- Heinz, A., Schröder, C. U., Baud, S., Keeley, F. W., Mithieux, S. M., Weiss, A. S., Neubert, R. H. H. und Schmelzer, C. E. H. (2014) Molecular-level characterization of elastin-like constructs and human aortic elastin. *Matrix Biol* **38**: 12-21.
- Helske, S., Kupari, M., Lindstedt, K. A. und Kovanen, P. T. (2007) Aortic valve stenosis: an active atheroinflammatory process. *Curr Opin Lipidol* **18** (5): 483-491.
- Hinek, A. und Rabinovitch, M. (1994) 67-kD elastin-binding protein is a protective "companion" of extracellular insoluble elastin and intracellular tropoelastin. *J Cell Biol* **126** (2): 563-574.
- Hinek, A. (1995) The 67 kDa spliced variant of beta-galactosidase serves as a reusable protective chaperone for tropoelastin. *Ciba Found Symp* **192**: 185-196.
- Hinek, A., Keeley, F. W. und Callahan, J. (1995) Recycling of the 67-kDa elastin binding protein in arterial myocytes is imperative for secretion of tropoelastin. *Exp Cell Res* **220** (2): 312-324.
- Hoeve, C. A. und Flory, P. J. (1974) The elastic properties of elastin. *Biopolymers* **13** (4): 677-686.
- Hoeve, C. A. J. und Flory, P. J. (1958) The Elastic Properties of Elastin. *Journal of the American Chemical Society* **80** (24): 6523-6526.
- Hof, P., Mayr, I., Huber, R., Korzus, E., Potempa, J., Travis, J., Powers, J. C. und Bode, W. (1996) The 1.8 Å crystal structure of human cathepsin G in complex with Suc-Val-Pro-PheP-(OPH)₂: a Janus-faced proteinase with two opposite specificities. *EMBO J* **15** (20): 5481-5491.
- Horiguchi, M., Inoue, T., Ohbayashi, T., Hirai, M., Noda, K., Marmorstein, L. Y., Yabe, D., Takagi, K., Akama, T. O., Kita, T., Kimura, T. und Nakamura, T. (2009) Fibulin-4 conducts proper elastogenesis via interaction with cross-linking enzyme lysyl oxidase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106** (45): 19029-19034.
- Hornebeck, W., Emonard, H., Monboisse, J. C. und Bellon, G. (2002) Matrix-directed regulation of pericellular proteolysis and tumor progression. *Semin Cancer Biol* **12** (3): 231-241.
- Hsiao, H., Stone, P. J., Toselli, P., Rosenbloom, J., Franzblau, C. und Schreiber, B. M. (1999) The role of the carboxy terminus of tropoelastin in its assembly into the elastic fiber. *Connect Tissue Res* **40** (2): 83-95.
- Hubmacher, D., El-Hallous, E. I., Nelea, V., Kaartinen, M. T., Lee, E. R. und Reinhardt, D. P. (2008) Biogenesis of extracellular microfibrils: Multimerization of the fibrillin-1 C terminus into bead-like structures enables self-assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105** (18): 6548-6553.
- Isogai, Z., Ono, R. N., Ushiro, S., Keene, D. R., Chen, Y., Mazziere, R., Charbonneau, N. L., Reinhardt, D. P., Rifkin, D. B. und Sakai, L. Y. (2003) Latent transforming growth factor beta-binding protein 1 interacts with fibrillin and is a microfibril-associated protein. *J Biol Chem* **278** (4): 2750-2757.
- Itoh, Y. (2015) Membrane-type matrix metalloproteinases: Their functions and regulations. *Matrix Biol* **44-46**: 207-223.

- Jensen, S. A., Aspinall, G. und Handford, P. A. (2014) C-terminal propeptide is required for fibrillin-1 secretion and blocks premature assembly through linkage to domains cbEGF41-43. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111** (28): 10155-10160.
- Johnson, J. L., George, S. J., Newby, A. C. und Jackson, C. L. (2005) Divergent effects of matrix metalloproteinases 3, 7, 9, and 12 on atherosclerotic plaque stability in mouse brachiocephalic arteries. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102** (43): 15575-15580.
- Joshi, R., Heinz, A., Fan, Q., Guo, S., Monia, B., Schmelzer, C. E. H., Weiss, A. S., Batie, M., Parameshwaran, H. und Varisco, B. M. (2018) Role for Cela1 in Postnatal Lung Remodeling and Alpha-1 Antitrypsin-Deficient Emphysema. *Am J Respir Cell Mol Biol* **59** (2): 167-178.
- Kaelin, W. G. und Ratcliffe, P. J. (2008) Oxygen sensing by metazoans: The central role of the HIF hydroxylase pathway. *Molecular Cell* **30** (4): 393-402.
- Kähäri, V.-M. und Saarialho-Kere, U. (1997) Matrix metalloproteinases in skin. *Exp Dermatol* **6** (5): 199-213.
- Kajiya, H., Tanaka, N., Inazumi, T., Seyama, Y., Tajima, S. und Ishibashi, A. (1997) Cultured human keratinocytes express tropoelastin. *J Invest Dermatol* **109** (5): 641-644.
- Keeley, F. (2013) The Evolution of Elastin. in: *Evolution of Extracellular Matrix*. Keeley, F. W. und Mecham, R. P. (Hrsg.), Springer, Berlin Heidelberg: 73-119.
- Keeley, F. W. (1979) The synthesis of soluble and insoluble elastin in chicken aorta as a function of development and age. Effect of a high cholesterol diet. *Can J Biochem* **57** (11): 1273-1280.
- Kielty, C. M., Woolley, D. E., Whittaker, S. P. und Shuttleworth, C. A. (1994) Catabolism of intact fibrillin microfibrils by neutrophil elastase, chymotrypsin and trypsin. *FEBS Lett* **351** (1): 85-89.
- Koenders, M. M., Yang, L., Wismans, R. G., van der Werf, K. O., Reinhardt, D. P., Daamen, W., Bennink, M. L., Dijkstra, P. J., van Kuppevelt, T. H. und Feijen, J. (2009) Microscale mechanical properties of single elastic fibers: the role of fibrillin-microfibrils. *Biomaterials* **30** (13): 2425-2432.
- Konova, E., Baydanoff, S., Atanasova, M. und Velkova, A. (2004) Age-related changes in the glycation of human aortic elastin. *Exp Gerontol* **39** (2): 249-254.
- Korkmaz, B., Moreau, T. und Gauthier, F. (2008) Neutrophil elastase, proteinase 3 and cathepsin G: physicochemical properties, activity and physiopathological functions. *Biochimie* **90** (2): 227-242.
- Kozel, B. A., Wachi, H., Davis, E. C. und Mecham, R. P. (2003) Domains in tropoelastin that mediate elastin deposition in vitro and in vivo. *J Biol Chem* **278** (20): 18491-18498.
- Kozel, B. A., Rongish, B. J., Czirok, A., Zach, J., Little, C. D., Davis, E. C., Knutsen, R. H., Wagenseil, J. E., Levy, M. A. und Mecham, R. P. (2006) Elastic fiber formation: a dynamic view of extracellular matrix assembly using timer reporters. *J Cell Physiol* **207** (1): 87-96.
- Lansing, A. I., Rosenthal, T. B., Alex, M. und Dempsey, E. W. (1952) The structure and chemical characterization of elastic fibers as revealed by elastase and by electron microscopy. *Anat Rec* **114** (4): 555-575.
- Lapis, K. und Timar, J. (2002) Role of elastin-matrix interactions in tumor progression. *Semin Cancer Biol* **12** (3): 209-217.
- Lecaille, F., Kaleta, J. und Brömme, D. (2002) Human and parasitic papain-like cysteine proteases: their role in physiology and pathology and recent developments in inhibitor design. *Chem Rev* **102** (12): 4459-4488.
- Lee, P., Bax, D. V., Bilek, M. M. und Weiss, A. S. (2014) A novel cell adhesion region in tropoelastin mediates attachment to integrin alphaVbeta5. *J Biol Chem* **289** (3): 1467-1477.
- Lelj, F., Tamburro, A. M., Villani, V., Grimaldi, P. und Guantieri, V. (1992) Molecular dynamics study of the conformational behavior of a representative elastin building block: Boc-Gly-Val-Gly-Gly-Leu-OMe. *Biopolymers* **32** (2): 161-172.
- Li, B., Alonso, D. O., Bennion, B. J. und Daggett, V. (2001) Hydrophobic hydration is an important source of elasticity in elastin-based biopolymers. *J Am Chem Soc* **123** (48): 11991-11998.

- Li, B. und Daggett, V.** (2002) Molecular basis for the extensibility of elastin. *J Muscle Res Cell Motil* **23** (5-6): 561-573.
- Lin, G., Tiedemann, K., Vollbrandt, T., Peters, H., Batge, B., Brinckmann, J. und Reinhardt, D. P.** (2002) Homo- and heterotypic fibrillin-1 and -2 interactions constitute the basis for the assembly of microfibrils. *J Biol Chem* **277** (52): 50795-50804.
- Liu, X. Q., Zhao, Y., Gao, J. G., Pawlyk, B., Starcher, B., Spencer, J. A., Yanagisawa, H., Zuo, J. und Li, T. S.** (2004) Elastic fiber homeostasis requires lysyl oxidase-like 1 protein. *Nature Genetics* **36** (2): 178-182.
- Longo, G. M., Xiong, W., Greiner, T. C., Zhao, Y., Fiotti, N. und Baxter, B. T.** (2002) Matrix metalloproteinases 2 and 9 work in concert to produce aortic aneurysms. *J Clin Invest* **110** (5): 625-632.
- Maquart, F. X., Bellon, G., Pasco, S. und Monboisse, J. C.** (2005) Matrikines in the regulation of extracellular matrix degradation. *Biochimie* **87** (3-4): 353-360.
- Marson, A., Rock, M. J., Cain, S. A., Freeman, L. J., Morgan, A., Mellody, K., Shuttleworth, C. A., Baldock, C. und Kielty, C. M.** (2005) Homotypic fibrillin-1 interactions in microfibril assembly. *J Biol Chem* **280** (6): 5013-5021.
- Maurice, P., Blaise, S., Gayral, S., Debelle, L., Laffargue, M., Hornebeck, W. und Duca, L.** (2013) Elastin fragmentation and atherosclerosis progression: the elastokine concept. *Trends Cardiovasc Med* **23** (6): 211-221.
- McGrath, A. P., Mithieux, S. M., Collyer, C. A., Bakhuis, J. G., van den Berg, M., Sein, A., Heinz, A., Schmelzer, C., Weiss, A. S. und Guss, J. M.** (2011) Structure and Activity of *Aspergillus nidulans* Copper Amine Oxidase. *Biochemistry* **50** (25): 5718-5730.
- Mecham, R. P., Madaras, J., McDonald, J. A. und Ryan, U.** (1983) Elastin production by cultured calf pulmonary artery endothelial cells. *J Cell Physiol* **116** (3): 282-288.
- Mecham, R. P., Levy, B. D., Morris, S. L., Madaras, J. G. und Wrenn, D. S.** (1985) Increased cyclic GMP levels lead to a stimulation of elastin production in ligament fibroblasts that is reversed by cyclic AMP. *J Biol Chem* **260** (6): 3255-3258.
- Mecham, R. P. und Davis, E. C.** (1994) Elastic Fiber Structure and Assembly. in: *Extracellular Matrix Assembly and Structure*. Mecham, R. P. (Hrsg.), Academic Press: 281-314.
- Mecham, R. P.** (2008) Methods in elastic tissue biology: elastin isolation and purification. *Methods* **45** (1): 32-41.
- Mecham, R. P. und Gibson, M. A.** (2015) The microfibril-associated glycoproteins (MAGPs) and the microfibrillar niche. *Matrix Biol* **47**: 13-33.
- Mecham, R. P.** (2018) Elastin in lung development and disease pathogenesis. *Matrix Biol*.
- Miao, M., Reichheld, S. E., Muiznieks, L. D., Sitarz, E. E., Sharpe, S. und Keeley, F. W.** (2017) Single nucleotide polymorphisms and domain/splice variants modulate assembly and elastomeric properties of human elastin. Implications for tissue specificity and durability of elastic tissue. *Biopolymers* **107** (5): e23007.
- Miekus, N., Luise, C., Sippl, W., Baczek, T., Schmelzer, C. E. H. und Heinz, A.** (2019) MMP-14 degrades tropoelastin and elastin. *Biochimie* **165**: 32-39.
- Mikawa, Y., Hamagami, H., Shikata, J. und Yamamuro, T.** (1986) Elastin in the human intervertebral disk. A histological and biochemical study comparing it with elastin in the human yellow ligament. *Arch Orthop Trauma Surg* **105** (6): 343-349.
- Milewicz, D. M., Grossfield, J., Cao, S. N., Kielty, C., Covitz, W. und Jewett, T.** (1995) A mutation in FBN1 disrupts profibrillin processing and results in isolated skeletal features of the Marfan syndrome. *J Clin Invest* **95** (5): 2373-2378.
- Mora Huertas, A. C., Schmelzer, C. E. H., Hoehenwarter, W., Heyroth, F. und Heinz, A.** (2016) Molecular-level insights into aging processes of skin elastin. *Biochimie* **128-129**: 163-173.
- Mora Huertas, A. C., Schmelzer, C. E. H., Luise, C., Sippl, W., Pietzsch, M., Hoehenwarter, W. und Heinz, A.** (2018) Degradation of tropoelastin and skin elastin by neprilysin. *Biochimie* **146**: 73-78.

- Moraes, T. J., Chow, C. W. und Downey, G. P.** (2003) Proteases and lung injury. *Crit Care Med* **31** (4 Suppl): S189-194.
- Moroy, G., Alix, A. J., Sapi, J., Hornebeck, W. und Bourguet, E.** (2012) Neutrophil elastase as a target in lung cancer. *Anti-cancer agents in medicinal chemistry* **12** (6): 565-579.
- Morrison, H. M., Welgus, H. G., Owen, C. A., Stockley, R. A. und Campbell, E. J.** (1999) Interaction between leukocyte elastase and elastin: quantitative and catalytic analyses. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* **1430** (2): 179-190.
- Muiznieks, L. D., Sharpe, S., Pomes, R. und Keeley, F. W.** (2018) Role of Liquid-Liquid Phase Separation in Assembly of Elastin and Other Extracellular Matrix Proteins. *J Mol Biol* **430** (23): 4741-4753.
- Nagai, Y.** (1983) A novel pyridinium derivative of elastin from bovine ligamentum nuchae. *Connective Tissue* **14**: 112-113.
- Nagase, H., Visse, R. und Murphy, G.** (2006) Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc Res* **69** (3): 562-573.
- Nagashima, Y., Hasegawa, S., Koshikawa, N., Taki, A., Ichikawa, Y., Kitamura, H., Misugi, K., Kihira, Y., Matuo, Y., Yasumitsu, H. und Miyazaki, K.** (1997) Expression of matrilysin in vascular endothelial cells adjacent to matrilysin-producing tumors. *Int J Cancer* **72** (3): 441-445.
- Nagel, M.** (2013) Isolierung, Charakterisierung und Vergleich von Elastin aus verschiedenen Vertebratengeweben, *Master Thesis*, Martin Luther University Halle-Wittenberg, Halle (Saale).
- Nakamura, F., Yamazaki, K. und Suyama, K.** (1992) Isolation and structural characterization of a new crosslinking amino acid, cyclopentenosine, from the acid hydrolysate of elastin. *Biochem Biophys Res Commun* **186** (3): 1533-1538.
- Nakamura, T.** (2018) Roles of short fibulins, a family of matricellular proteins, in lung matrix assembly and disease. *Matrix Biol* **73**: 21-33.
- Narayanan, A. S., Sandberg, L. B., Ross, R. und Layman, D. L.** (1976) The smooth muscle cell. III. Elastin synthesis in arterial smooth muscle cell culture. *J Cell Biol* **68** (3): 411-419.
- Narayanan, A. S., Page, R. C., Kuzan, F. und Cooper, C. G.** (1978) Elastin cross-linking in vitro. Studies on factors influencing the formation of desmosines by lysyl oxidase action on tropoelastin. *Biochem J* **173** (3): 857-862.
- Naylor, E. C., Watson, R. E. und Sherratt, M. J.** (2011) Molecular aspects of skin ageing. *Maturitas* **69** (3): 249-256.
- Noda, K., Dabovic, B., Takagi, K., Inoue, T., Horiguchi, M., Hirai, M., Fujikawa, Y., Akama, T. O., Kusumoto, K., Zilberberg, L., Sakai, L. Y., Koli, K., Naitoh, M., von Melchner, H., Suzuki, S., Rifkin, D. B. und Nakamura, T.** (2013) Latent TGF-beta binding protein 4 promotes elastic fiber assembly by interacting with fibulin-5. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110** (8): 2852-2857.
- Nonaka, R., Sato, F. und Wachi, H.** (2014) Domain 36 of tropoelastin in elastic fiber formation. *Biol Pharm Bull* **37** (4): 698-702.
- O'Rourke, M. F.** (2007) Arterial aging: pathophysiological principles. *Vasc Med* **12** (4): 329-341.
- Ochieng, J., Furtak, V. und Lukyanov, P.** (2004) Extracellular functions of galectin-3. *Glycoconj J* **19** (7-9): 527-535.
- Ono, M., Matsubara, J., Honda, K., Sakuma, T., Hashiguchi, T., Nose, H., Nakamori, S., Okusaka, T., Kosuge, T., Sata, N., Nagai, H., Ioka, T., Tanaka, S., Tsuchida, A., Aoki, T., Shimahara, M., Yasunami, Y., Itoi, T., Moriyasu, F., Negishi, A., Kuwabara, H., Shoji, A., Hirohashi, S. und Yamada, T.** (2009) Prolyl 4-hydroxylation of alpha-fibrinogen: a novel protein modification revealed by plasma proteomics. *J Biol Chem* **284** (42): 29041-29049.
- Owen, C. A. und Campbell, E. J.** (1999) The cell biology of leukocyte-mediated proteolysis. *Journal of Leukocyte Biology* **65** (2): 137-150.

- Ozsvar, J., Tarakanova, A., Wang, R., Buehler, M. J. und Weiss, A. S. (2019) Allysine modifications perturb tropoelastin structure and mobility on a local and global scale. *Matrix Biology Plus* **2**: 100002.
- Panwar, P., Hedtke, T., Heinz, A., Andrault, P. M., Hoehenwarter, W., Granville, D. J., Schmelzer, C. E. H. und Brömme, D. (2020) Expression of elastolytic cathepsins in human skin and their involvement in age-dependent elastin degradation. *Biochim Biophys Acta Gen Subj* **1864** (5): 129544.
- Parks, W. C., Secrist, H., Wu, L. C. und Mecham, R. P. (1988) Developmental regulation of tropoelastin isoforms. *J Biol Chem* **263** (9): 4416-4423.
- Parks, W. C. und Deak, S. B. (1990) Tropoelastin heterogeneity: implications for protein function and disease. *Am J Respir Cell Mol Biol* **2** (5): 399-406.
- Partridge, S. M., Davis, H. F. und Adair, G. S. (1955) The chemistry of connective tissues. 2. Soluble proteins derived from partial hydrolysis of elastin. *Biochem J* **61** (1): 11-21.
- Partridge, S. M. (1962) Elastin. *Adv Protein Chem* **17** (33333): 227-302.
- Partridge, S. M., Elsdon, D. F. und Thomas, J. (1963) Constitution of the cross-linkages in elastin. *Nature* **197**: 1297-1298.
- Partridge, S. M., Elsdon, D. F., Thomas, J., Dorfman, A., Telser, A. und Ho, P. L. (1966) Incorporation of labelled lysine into the desmosine cross-bridges in elastin. *Nature* **209** (5021): 399-400.
- Pasquali-Ronchetti, I. und Bacarani-Contri, M. (1997) Elastic fiber during development and aging. *Microsc Res Tech* **38** (4): 428-435.
- Peters, T. J. und Smillie, I. S. (1971) Studies on Chemical Composition of Menisci from Human Knee-Joint. *P Roy Soc Med* **64** (3): 261-262.
- Piha-Gossack, A., Sossin, W. und Reinhardt, D. P. (2012) The evolution of extracellular fibrillins and their functional domains. *PLoS One* **7** (3): e33560.
- Pocza, P., Suli-Vargha, H., Darvas, Z. und Falus, A. (2008) Locally generated VGVAPG and VAPG elastin-derived peptides amplify melanoma invasion via the galectin-3 receptor. *Int J Cancer* **122** (9): 1972-1980.
- Pometun, M. S., Chekmenev, E. Y. und Wittebort, R. J. (2004) Quantitative observation of backbone disorder in native elastin. *J Biol Chem* **279** (9): 7982-7987.
- Powell, J. T., Vine, N. und Crossman, M. (1992) On the accumulation of D-aspartate in elastin and other proteins of the ageing aorta. *Atherosclerosis* **97** (2-3): 201-208.
- Privitera, S., Prody, C. A., Callahan, J. W. und Hinek, A. (1998) The 67-kDa enzymatically inactive alternatively spliced variant of beta-galactosidase is identical to the elastin/laminin-binding protein. *J Biol Chem* **273** (11): 6319-6326.
- Qian, R. Q. und Glanville, R. W. (1997) Alignment of fibrillin molecules in elastic microfibrils is defined by transglutaminase-derived cross-links. *Biochemistry* **36** (50): 15841-15847.
- Raghunath, M., Putnam, E. A., Ritty, T., Hamstra, D., Park, E. S., Tschodrich-Rotter, M., Peters, R., Rehemtulla, A. und Milewicz, D. M. (1999) Carboxy-terminal conversion of profibrillin to fibrillin at a basic site by PACE/furin-like activity required for incorporation in the matrix. *J Cell Sci* **112** (Pt 7): 1093-1100.
- Raju, K. und Anwar, R. A. (1987) Primary structures of bovine elastin a, b, and c deduced from the sequences of cDNA clones. *J Biol Chem* **262** (12): 5755-5762.
- Ramirez, F. (2000) Pathophysiology of the microfibril/elastic fiber system: introduction. *Matrix Biol* **19** (6): 455-456.
- Rauscher, S., Baud, S., Miao, M., Keeley, F. W. und Pomes, R. (2006) Proline and glycine control protein self-organization into elastomeric or amyloid fibrils. *Structure* **14** (11): 1667-1676.
- Réhault, S., Brillard-Bourdet, M., Juliano, M. A., Juliano, L., Gauthier, F. und Moreau, T. (1999) New, sensitive fluorogenic substrates for human cathepsin G based on the sequence of serpin-reactive site loops. *J Biol Chem* **274** (20): 13810-13817.

- Reichheld, S. E., Muiznieks, L. D., Keeley, F. W. und Sharpe, S. (2017) Direct observation of structure and dynamics during phase separation of an elastomeric protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **114** (22): E4408-E4415.
- Reichheld, S. E., Muiznieks, L. D., Lu, R., Sharpe, S. und Keeley, F. W. (2019) Sequence variants of human tropoelastin affecting assembly, structural characteristics and functional properties of polymeric elastin in health and disease. *Matrix Biol* **84**: 68-80.
- Reilly, C. F., Fukunaga, Y., Powers, J. C. und Travis, J. (1984) Effect of neutrophil cathepsin G on elastin degradation by neutrophil elastase. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* **365** (9): 1131-1135.
- Reinhardt, D. P., Keene, D. R., Corson, G. M., Poschl, E., Bachinger, H. P., Gambee, J. E. und Sakai, L. Y. (1996) Fibrillin-1: organization in microfibrils and structural properties. *J Mol Biol* **258** (1): 104-116.
- Reinhardt, D. P., Gambee, J. E., Ono, R. N., Bachinger, H. P. und Sakai, L. Y. (2000) Initial steps in assembly of microfibrils. Formation of disulfide-cross-linked multimers containing fibrillin-1. *J Biol Chem* **275** (3): 2205-2210.
- Rifkin, D. B., Rifkin, W. J. und Zilberberg, L. (2018) LTBP in biology and medicine: LTBP diseases. *Matrix Biol* **71-72**: 90-99.
- Ritz-Timme, S., Laumeier, I. und Collins, M. J. (2003) Aspartic acid racemization: evidence for marked longevity of elastin in human skin. *Br J Dermatol* **149** (5): 951-959.
- Robert, L., Robert, A. M. und Fülöp, T. (2008) Rapid increase in human life expectancy: will it soon be limited by the aging of elastin? *Biogerontology* **9** (2): 119-133.
- Robertson, I., Jensen, S. und Handford, P. (2011) TB domain proteins: evolutionary insights into the multifaceted roles of fibrillins and LTBP. *Biochem J* **433** (2): 263-276.
- Robinet, A., Fahem, A., Cauchard, J. H., Huet, E., Vincent, L., Lorimier, S., Antonicelli, F., Soria, C., Crepin, M., Hornebeck, W. und Bellon, G. (2005) Elastin-derived peptides enhance angiogenesis by promoting endothelial cell migration and tubulogenesis through upregulation of MT1-MMP. *J Cell Sci* **118** (Pt 2): 343-356.
- Robson, P., Wright, G. M., Sitarz, E., Maiti, A., Rawat, M., Youson, J. H. und Keeley, F. W. (1993) Characterization of lamprin, an unusual matrix protein from lamprey cartilage. Implications for evolution, structure, and assembly of elastin and other fibrillar proteins. *J Biol Chem* **268** (2): 1440-1447.
- Rodgers, U. R. und Weiss, A. S. (2005) Cellular interactions with elastin. *Pathol Biol (Paris)* **53** (7): 390-398.
- Romanic, A. M., Harrison, S. M., Bao, W., Burns-Kurtis, C. L., Pickering, S., Gu, J., Grau, E., Mao, J., Sathe, G. M., Ohlstein, E. H. und Yue, T. L. (2002) Myocardial protection from ischemia/reperfusion injury by targeted deletion of matrix metalloproteinase-9. *Cardiovasc Res* **54** (3): 549-558.
- Romier, B., Ivaldi, C., Sartelet, H., Heinz, A., Schmelzer, C. E. H., Garnotel, R., Guillot, A., Jonquet, J., Bertin, E., Gueant, J. L., Alberto, J. M., Bronowicki, J. P., Amoyel, J., Hocine, T., Duca, L., Maurice, P., Bennasroune, A., Martiny, L., Debelle, L., Durlach, V. und Blaise, S. (2018) Production of Elastin-Derived Peptides Contributes to the Development of Nonalcoholic Steatohepatitis. *Diabetes* **67** (8): 1604-1615.
- Roten, S. V., Bhat, S. und Bhawan, J. (1996) Elastic fibers in scar tissue. *J Cutan Pathol* **23** (1): 37-42.
- Rucker, R. B., Kosonen, T., Clegg, M. S., Mitchell, A. E., Rucker, B. R., Uriu-Hare, J. Y. und Keen, C. L. (1998) Copper, lysyl oxidase, and extracellular matrix protein cross-linking. *Am J Clin Nutr* **67** (5 Suppl): 996S-1002S.
- Rünger, T. M., Quintanilla-Dieck, M. J. und Bhawan, J. (2007) Role of cathepsin K in the turnover of the dermal extracellular matrix during scar formation. *J Invest Dermatol* **127** (2): 293-297.
- Sabatier, L., Miosge, N., Hubmacher, D., Lin, G., Davis, E. C. und Reinhardt, D. P. (2011) Fibrillin-3 expression in human development. *Matrix Biol* **30** (1): 43-52.

- Sabatier, L., Djokic, J., Hubmacher, D., Dzafik, D., Nelea, V. und Reinhardt, D. P.** (2014) Heparin/heparan sulfate controls fibrillin-1, -2 and -3 self-interactions in microfibril assembly. *FEBS Lett* **588** (17): 2890-2897.
- Sage, H. und Gray, W. R.** (1979) Studies on the Evolution of Elastin .1. Phylogenetic Distribution. *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology* **64** (4): 313-327.
- Sage, J., De Queral, D., Leblanc-Noblesse, E., Kurfurst, R., Schnebert, S., Perrier, E., Nizard, C., Lalmanach, G. und Lecaille, F.** (2014) Differential expression of cathepsins K, S and V between young and aged Caucasian women skin epidermis. *Matrix Biol* **33**: 41-46.
- Sato, F., Wachi, H., Ishida, M., Nonaka, R., Onoue, S., Urban, Z., Starcher, B. C. und Seyama, Y.** (2007) Distinct steps of cross-linking, self-association, and maturation of tropoelastin are necessary for elastic fiber formation. *J Mol Biol* **369** (3): 841-851.
- Scandolera, A., Odoul, L., Salesse, S., Guillot, A., Blaise, S., Kawecki, C., Maurice, P., El Btaouri, H., Romier-Crouzet, B., Martiny, L., Debelle, L. und Duca, L.** (2016) The Elastin Receptor Complex: A Unique Matricellular Receptor with High Anti-tumoral Potential. *Front Pharmacol* **7**: 32.
- Scarselli, V.** (1961) Increase in elastin content of the human aorta during growth. *Nature* **191**: 710-711.
- Schechter, I. und Berger, A.** (1967) On the size of the active site in proteases. I. Papain. *Biochem Biophys Res Commun* **27** (2): 157-162.
- Schmelzer, C. E. H., Getie, M. und Neubert, R. H. H.** (2005) Mass spectrometric characterization of human skin elastin peptides produced by proteolytic digestion with pepsin and thermolysin. *J Chromatogr A* **1083** (1-2): 120-126.
- Schmelzer, C. E. H., Jung, M. C., Wohlrab, J., Neubert, R. H. H. und Heinz, A.** (2012) Does human leukocyte elastase degrade intact skin elastin? *FEBS J* **279** (22): 4191-4200.
- Schmelzer, C. E. H.** (2016) Chapter 1: Assembly and Properties of Elastic Fibers. in: *Elastic Fiber Matrices: Biomimetic Approaches to Regeneration and Repair*. Ramamurthi, A. und Kothapalli, C. R. (Hrsg.), CRC Press Boca Raton, FL: 1-30.
- Schmelzer, C. E. H., Nagel, M. B., Dziomba, S., Merkher, Y., Sivan, S. S. und Heinz, A.** (2016) Prolyl hydroxylation in elastin is not random. *Biochim Biophys Acta* **1860** (10): 2169-2177.
- Schmelzer, C. E. H., Heinz, A., Troilo, H., Lockhart-Cairns, M. P., Jowitt, T. A., Marchand, M. F., Bidault, L., Bignon, M., Hedtke, T., Barret, A., McConnell, J. C., Sherratt, M. J., Germain, S., Hulmes, D. J. S., Baldock, C. und Muller, L.** (2019) Lysyl oxidase-like 2 (LOXL2)-mediated cross-linking of tropoelastin. *FASEB J* **33** (4): 5468-5481.
- Schmelzer, C. E. H., Hedtke, T. und Heinz, A.** (2020) Unique molecular networks: Formation and role of elastin cross-links. *IUBMB Life* **72** (5): 842-854.
- Schmelzer, C. E. H. und Duca, L.** (2021) Elastic fibers: formation, function, and fate during aging and disease. *The FEBS Journal* **in press**.
- Schröder, C.** (2016) Einzigartig vernetzt - Strukturelle Charakterisierung des Faserproteins Elastin mittels Massenspektrometrie, *Dissertation*, Martin Luther University Halle-Wittenberg, Halle (Saale).
- Schröder, C. U., Heinz, A., Majovsky, P. und Schmelzer, C. E. H.** (2015) Fingerprinting desmosome-containing elastin peptides. *J Am Soc Mass Spectrom* **26** (5): 762-773.
- Schröder, C. U., Heinz, A., Majovsky, P., Karaman Mayack, B., Brinckmann, J., Sippl, W. und Schmelzer, C. E. H.** (2018) Elastin is heterogeneously cross-linked. *J Biol Chem* **293** (39): 15107-15119.
- Seite, S., Zucchi, H., Septier, D., Igondjo-Tchen, S., Senni, K. und Godeau, G.** (2006) Elastin changes during chronological and photo-ageing: the important role of lysozyme. *J Eur Acad Dermatol Venereol* **20** (8): 980-987.
- Sellheyer, K.** (2003) Pathogenesis of solar elastosis: synthesis or degradation? *J Cutan Pathol* **30** (2): 123-127.

- Shapiro, S. D., Endicott, S. K., Province, M. A., Pierce, J. A. und Campbell, E. J.** (1991) Marked longevity of human lung parenchymal elastic fibers deduced from prevalence of D-aspartate and nuclear weapons-related radiocarbon. *J Clin Invest* **87** (5): 1828-1834.
- Shapiro, S. D. und Senior, R. M.** (1998) Macrophage elastase (MMP-12). in: *Matrix Metalloproteinases*. Parks, W. C. und Mecham, R. P. (Hrsg.), Academic Press, San Diego: 185-196.
- Shi, G. P., Munger, J. S., Meara, J. P., Rich, D. H. und Chapman, H. A.** (1992) Molecular cloning and expression of human alveolar macrophage cathepsin S, an elastinolytic cysteine protease. *J Biol Chem* **267** (11): 7258-7262.
- Shuttleworth, C. A., Berry, L. und Kielty, C. M.** (1992) Microfibrillar components in dental pulp: presence of both type VI collagen- and fibrillin-containing microfibrils. *Arch Oral Biol* **37** (12): 1079-1084.
- Sivan, S. S., Van El, B., Merkher, Y., Schmelzer, C. E. H., Zuurmond, A. M., Heinz, A., Wachtel, E., Varga, P. P., Lazary, A., Brayda-Bruno, M. und Maroudas, A.** (2012) Longevity of elastin in human intervertebral disc as probed by the racemization of aspartic acid. *Biochim Biophys Acta* **1820** (10): 1671-1677.
- Smith-Mungo, L. I. und Kagan, H. M.** (1998) Lysyl oxidase: properties, regulation and multiple functions in biology. *Matrix Biol* **16** (7): 387-398.
- Soskel, N. T. und Sandburg, L. B.** (1983) A comparison of six methods of extracting elastin residue from hamster lungs. *Exp Lung Res* **4** (2): 109-119.
- Spina, M., Garbisa, S., Hinnie, J., Hunter, J. C. und Serafini-Fracassini, A.** (1983) Age-related changes in composition and mechanical properties of the tunica media of the upper thoracic human aorta. *Arteriosclerosis* **3** (1): 64-76.
- Stapels, D. A., Geisbrecht, B. V. und Rooijackers, S. H.** (2015) Neutrophil serine proteases in antibacterial defense. *Curr Opin Microbiol* **23**: 42-48.
- Starcher, B. und Percival, S.** (1985) Elastin turnover in the rat uterus. *Connect Tissue Res* **13** (3): 207-215.
- Starcher, B., Cook, G., Gallop, P., Hensen, E. und Shoulders, B.** (1987) Isolation and characterization of a pentameric amino acid from elastin. *Connect Tissue Res* **16** (1): 15-25.
- Starcher, B. C. und Galione, M. J.** (1976) Purification and comparison of elastins from different animal species. *Anal Biochem* **74** (2): 441-447.
- Starcher, B. C.** (1977) Determination of the elastin content of tissues by measuring desmosine and isodesmosine. *Anal Biochem* **79** (1-2): 11-15.
- Sugitani, H., Hirano, E., Knutsen, R. H., Shifren, A., Wagenseil, J. E., Ciliberto, C., Kozel, B. A., Urban, Z., Davis, E. C., Broekelmann, T. J. und Mecham, R. P.** (2012) Alternative splicing and tissue-specific elastin misassembly act as biological modifiers of human elastin gene frameshift mutations associated with dominant cutis laxa. *J Biol Chem* **287** (26): 22055-22067.
- Suyama, K. und Nakamura, F.** (1990) Isolation and characterization of new cross-linking amino acid "allodesmosine" from hydrolysate of elastin. *Biochem Biophys Res Commun* **170** (2): 713-718.
- Szabo, Z., Levi-Minzi, S. A., Christiano, A. M., Struminger, C., Stoneking, M., Batzer, M. A. und Boyd, C. D.** (1999) Sequential loss of two neighboring exons of the tropoelastin gene during primate evolution. *J Mol Evol* **49** (5): 664-671.
- Taddese, S., Weiss, A. S., Neubert, R. H. H. und Schmelzer, C. E. H.** (2008) Mapping of macrophage elastase cleavage sites in insoluble human skin elastin. *Matrix Biol* **27** (5): 420-428.
- Taddese, S., Weiss, A. S., Jahreis, G., Neubert, R. H. H. und Schmelzer, C. E. H.** (2009) In vitro degradation of human tropoelastin by MMP-12 and the generation of matrikines from domain 24. *Matrix Biol* **28** (2): 84-91.

- Taddese, S., Jung, M. C., Ihling, C., Heinz, A., Neubert, R. H. H. und Schmelzer, C. E. H.** (2010) MMP-12 catalytic domain recognizes and cleaves at multiple sites in human skin collagen type I and type III. *Biochim Biophys Acta* **1804** (4): 731-739.
- Tamburro, A. M., Bochicchio, B. und Pepe, A.** (2003) Dissection of human tropoelastin: exon-by-exon chemical synthesis and related conformational studies. *Biochemistry* **42** (45): 13347-13362.
- Tamburro, A. M., Bochicchio, B. und Pepe, A.** (2005) The dissection of human tropoelastin: from the molecular structure to the self-assembly to the elasticity mechanism. *Pathol Biol (Paris)* **53** (7): 383-389.
- Tarakanova, A., Yeo, G. C., Baldock, C., Weiss, A. S. und Buehler, M. J.** (2018) Molecular model of human tropoelastin and implications of associated mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A* **115** (28): 7338-7343.
- Tarakanova, A., Ozsvar, J., Weiss, A. S. und Buehler, M. J.** (2019) Coarse-grained model of tropoelastin self-assembly into nascent fibrils. *Materials Today Bio* **3**: 100016.
- Thomas, J., Elsdon, D. F. und Partridge, S. M.** (1963) Partial Structure of Two Major Degradation Products from the Cross-Linkages in Elastin. *Nature* **200**: 651-652.
- Thomson, J., Singh, M., Eckersley, A., Cain, S. A., Sherratt, M. J. und Baldock, C.** (2019) Fibrillin microfibrils and elastic fibre proteins: Functional interactions and extracellular regulation of growth factors. *Semin Cell Dev Biol* **89**: 109-117.
- Toupance, S., Brassart, B., Rabenoelina, F., Ghoneim, C., Vallar, L., Polette, M., Debelle, L. und Birembaut, P.** (2012) Elastin-derived peptides increase invasive capacities of lung cancer cells by post-transcriptional regulation of MMP-2 and uPA. *Clin Exp Metastasis* **29** (5): 511-522.
- Trackman, P. C.** (2016) Lysyl Oxidase Isoforms and Potential Therapeutic Opportunities for Fibrosis and Cancer. *Expert Opin Ther Targets* **20** (8): 935-945.
- Uitto, J.** (1979) Biochemistry of the elastic fibers in normal connective tissues and its alterations in diseases. *J Invest Dermatol* **72** (1): 1-10.
- Umana-Diaz, C., Pichol-Thievend, C., Marchand, M. F., Atlas, Y., Salza, R., Malbouyres, M., Barret, A., Teillon, J., Ardidie-Robouant, C., Ruggiero, F., Monnot, C., Girard, P., Guilluy, C., Ricard-Blum, S., Germain, S. und Muller, L.** (2020) Scavenger Receptor Cysteine-Rich domains of Lysyl Oxidase-Like2 regulate endothelial ECM and angiogenesis through non-catalytic scaffolding mechanisms. *Matrix Biol* **88**: 33-52.
- Urry, D. W. und Parker, T. M.** (2002) Mechanics of elastin: molecular mechanism of biological elasticity and its relationship to contraction. *J Muscle Res Cell Motil* **23** (5-6): 543-559.
- Vaalamo, M., Kariniemi, A. L., Shapiro, S. D. und Saarialho-Kere, U.** (1999) Enhanced expression of human metalloelastase (MMP-12) in cutaneous granulomas and macrophage migration. *J Invest Dermatol* **112** (4): 499-505.
- Vallet, S. D. und Ricard-Blum, S.** (2019) Lysyl oxidases: from enzyme activity to extracellular matrix cross-links. *Essays Biochem* **63** (3): 349-364.
- Van Doren, S. R.** (2015) Matrix metalloproteinase interactions with collagen and elastin. *Matrix Biol* **44-46**: 224-231.
- Verma, R. P. und Hansch, C.** (2007) Matrix metalloproteinases (MMPs): chemical-biological functions and (Q)SARs. *Bioorg Med Chem* **15** (6): 2223-2268.
- Vierkötter, A. und Krutmann, J.** (2012) Environmental influences on skin aging and ethnic-specific manifestations. *Dermatoendocrinol* **4** (3): 227-231.
- Visse, R. und Nagase, H.** (2003) Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res* **92** (8): 827-839.
- Vizovišek, M., Fonović, M. und Turk, B.** (2019) Cysteine cathepsins in extracellular matrix remodeling: Extracellular matrix degradation and beyond. *Matrix Biol* **75-76**: 141-159.
- Wahart, A., Hocine, T., Albrecht, C., Henry, A., Sarazin, T., Martiny, L., El Btaouri, H., Maurice, P., Bennisroune, A., Romier-Crouzet, B., Blaise, S. und Duca, L.** (2019) Role of elastin peptides

- and elastin receptor complex in metabolic and cardiovascular diseases. *FEBS J* **286** (15): 2980-2993.
- Werb, Z., Banda, M. J., McKerrow, J. H. und Sandhaus, R. A.** (1982) Elastases and elastin degradation. *J Invest Dermatol* **79 Suppl 1**: 154s-159s.
- Wielockx, B., Libert, C. und Wilson, C.** (2004) Matrilysin (matrix metalloproteinase-7): a new promising drug target in cancer and inflammation? *Cytokine Growth Factor Rev* **15** (2-3): 111-115.
- Wrenn, D. S., Parks, W. C., Whitehouse, L. A., Crouch, E. C., Kucich, U., Rosenbloom, J. und Mecham, R. P.** (1987) Identification of multiple tropoelastins secreted by bovine cells. *J Biol Chem* **262** (5): 2244-2249.
- Yanagisawa, H. und Davis, E. C.** (2010) Unraveling the mechanism of elastic fiber assembly: The roles of short fibulins. *Int J Biochem Cell Biol* **42** (7): 1084-1093.
- Yasuda, Y., Li, Z., Greenbaum, D., Bogyo, M., Weber, E. und Bromme, D.** (2004) Cathepsin V, a novel and potent elastolytic activity expressed in activated macrophages. *J Biol Chem* **279** (35): 36761-36770.
- Yeo, G. C., Keeley, F. W. und Weiss, A. S.** (2011) Coacervation of tropoelastin. *Adv Colloid Interface Sci* **167** (1-2): 94-103.
- Yeo, G. C., Baldock, C., Wise, S. G. und Weiss, A. S.** (2017) Targeted Modulation of Tropoelastin Structure and Assembly. *ACS Biomater Sci Eng* **3** (11): 2832-2844.
- Zhang, H., Apfelroth, S. D., Hu, W., Davis, E. C., Sanguineti, C., Bonadio, J., Mecham, R. P. und Ramirez, F.** (1994) Structure and expression of fibrillin-2, a novel microfibrillar component preferentially located in elastic matrices. *J Cell Biol* **124** (5): 855-863.
- Zohora, F.-T., Nosoudi, N., Karamched, S. R. und Vyavahare, N.** (2020) The Role of Elastin Degradation in Vascular Calcification: Possibilities to Repair Elastin and Reverse Calcification. in: *Cardiovascular Calcification and Bone Mineralization*. Aikawa, E. und Hutcheson, J. D. (Hrsg.), Springer Nature Switzerland AG, Cham.

5 LEBENSLAUF

Dr. rer. nat. Christian E. H. Schmelzer

PERSÖNLICHE DATEN

Geburtsdatum/-ort: 17. Mai 1978 in Wippra (Deutschland)

Staatsangehörigkeit: deutsch

Familienstand: eine Tochter: Alexandra Schmelzer (*2004)

AKADEMISCHER WERDEGANG

- 08/2018-heute Leiter der Abteilung „Biologische und makromolekulare Materialien“ am Fraunhofer-Institut für Mikrostruktur von Werkstoffen und Systemen IMWS, Halle (Saale)
- 10/2018-heute Leiter der Gruppe „Biofunktionale Materialien für Medizin und Umwelt“ am Fraunhofer-Institut für Mikrostruktur von Werkstoffen und Systemen IMWS, Halle (Saale)
- 07/2016-09/2018 Leiter der Arbeitsgruppe „SkinNext“ am Fraunhofer-Institut für Mikrostruktur von Werkstoffen und Systemen IMWS, Halle (Saale)
- 02/2013-05/2013 & 10/2013-01/2014 Postdoc-Forschungsaufenthalt am Fachbereich Biologie, Technion – Israel Institute of Technology, Haifa, Israel
- 06/2007-06/2016 Wissenschaftlicher Mitarbeiter und Habilitand am Institut für Pharmazie der Naturwissenschaftlichen Fakultät I, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Leitung des Teams „Elastin“ in der AG Biopharmazie
- 04.05.2007 Disputation der Arbeit „Massenspektrometrische Charakterisierung von Proteinhydrolysaten: Verdaustudien an β -Casein und Strukturuntersuchungen an Elastin“, Promotion zum Dr. rer. nat., Note: *magna cum laude*
- 04/2003-04/2007 Promotion in der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Dr. h. c. R. Neubert am Institut für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- 03/2002-02/2003 Diplomarbeit an der Universität Gdańsk (Polen) und der Hochschule Merseburg mit dem Thema „Experimentelle Untersuchungen zu molekularakustischen Eigenschaften von Mischungen aus Wasser und Nichtelektrolyten“ (Note: sehr gut)
- 10/1998-03/2003 Studium der Physikalischen Technik und Informationsverarbeitung, Hochschule Merseburg, Abschluss: Dipl.-Ing. (FH)

LEHRERFAHRUNG

- 2009-heute Vorlesungen und Seminare/Praktika in der Lehrveranstaltung „Bioinformatics for structure analysis“ und „Fundamentals of Mass Spectrometry and Proteomics“ im internationalen Master-Studiengang „Pharmaceutical Biotechnology“ an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- 2003-2016 Assistent in den Studentenpraktika „Arzneiformenlehre I“ und „Arzneiformenlehre II / Biopharmazie“ im Studiengang Pharmazie (Laborpraktikum und Seminare)

STIPENDIEN UND PREISE

- 2021 Sieger des IQ Innovationspreis Halle (Saale) 2021
- 2020 Hugo-Junkers-Preis, 2. Platz in der Kategorie „Innovativste Projekte der angewandten Forschung“
- 2011 - 2016 Galenus Support der Galenus Privatstiftung
- 2008 „Wissenschaftspreis 2007“, verliehen durch die Bayer Bitterfeld GmbH
- 06/2005-06/2007 Promotionsstipendium der Graduiertenförderung des Landes Sachsen-Anhalt
- 2003 „Beste Diplomarbeit des Jahres 2003“ verliehen durch den Fachbereich Informatik und angewandte Naturwissenschaften der Hochschule Merseburg
- 04/2002-08/2002 SOCRATES/ERASMUS-Stipendium, Auslandsaufenthalt am Institut für Experimentalphysik der University of Gdańsk, Polen

6 PUBLIKATIONSLISTE

ARTIKEL IN FACHZEITSCHRIFTEN MIT GUTACHTERSYSTEM

- [62] **C. E. H. Schmelzer**, L. Duca: Elastic fibers: formation, function and fate during aging and disease, Review article, *FEBS Journal*, 2021, im Druck
- [61] N. K. Karamanos, A. D. Theocharis, Z. Piperigkou, D. Manou, A. Passi, S. S. Skandalis, D. H. Vynios, V. Orian-Rousseau, S. Ricard-Blum, **C. E. H. Schmelzer**, L. Duca, M. Durbeej-Hjalt, G. Orend, N. A. Afratis, L. Troeberg, M. Franchi, V. Masola, M. Onisto: A Guide to the Composition and Functions of the Extracellular Matrix, *FEBS Journal*, 2021, im Druck
- [60] A. Jeanne, T. Sarazin, M. Charlé, C. Kawecki, A. Kauskot, T. Hedtke, **C. E. H. Schmelzer**, L. Martiny, P. Maurice, S. Dedieu, Towards the therapeutic use of TSP-1/CD47 targeting TAX2 peptide as an antithrombotic agent, *ATVB*, 2021, 41(1), e1-17
- [59] S. Stojanović, H. AlKhoury, M. Radenković, V. Cvetković, M. Jabłońska, **C. E. H. Schmelzer**, F. Syrowatka, J. Živković, T. Groth, S. Najman: Tissue response to biphasic calcium phosphate co-valently modified with either heparin or hyaluronic acid in a mouse subcutaneous implantation model, *J. Biomed. Mater. Res A*, 2021, 109(8), 1353-1365
- [58] A. M. Ruiz-Zapata, A. Heinz, M. H. Kerkhof, C. van de Westerlo-van Rijt, **C. E. H. Schmelzer**, R. Stoop, K. B. Kluivers, E. Oosterwijk: Extracellular Matrix Stiffness and Composition Regulate the Myofibroblast Differentiation of Vaginal Fibroblasts, *Int J Mol Sci*, 2020, 21(13)
- [57] Y. A. Brito Barrera, G. Hause, M. Menzel, **C. E. H. Schmelzer**, E. Lehner, K. Mäder, C. Wölk, T. Groth: Engineering osteogenic microenvironments by combination of multilayers from collagen type I and chondroitin sulfate with novel cationic liposomes, *Materials Today Bio*, 2020, 7, 100071
- [56] C. Santos de Oliveira, A. Gonzalez, T. Hedtke, T. Kürbitz, A. Heilmann, **C. E. H. Schmelzer**, J. Martins de Souza e Silva: Direct three-dimensional imaging for morphological analysis of electrospun fibers with laboratory-based Zernike X-ray phase-contrast computed tomography, *Materials Science & Engineering C*, 2020, 111045
- [55] P. Panwar, T. Hedtke, A. Heinz, P.-M. Andrault, W. Hoehenwarter, D. Granville, **C. E. H. Schmelzer**, D. Brömme: Expression of elastolytic cathepsins in human skin and their involvement in age-dependent elastin degradation, *BBA General Subjects*, 2020, 1864(5), 129544
- [54] **C. E. H. Schmelzer**, T. Hedtke, A. Heinz: Unique Molecular Networks: Formation and Role of Elastin Cross-links, *IUBMB Life*, 2020, 72(5), 842-854
- [53] C. Janich, A. Friedmann, J. Martins de Souza e Silva, C. Santos de Oliveira, L. E. de Souza, D. Rujescu, C. Hildebrandt, M. Beck-Broichsitter, **C. E. H. Schmelzer**, K. Mäder: Risperidone-Loaded PLGA-Lipid Particles with Improved Release Kinetics: Manufacturing and Detailed Characterization by Electron Microscopy and Nano-CT, *Pharmaceutics*, 2019, 11, 665
- [52] J. Reichenwallner, T. Hauenschild, **C. E. H. Schmelzer**, M. Hülsmann, A. Godt, D. Hinderberger: Fatty Acid Triangulation in Albumins Using a Landmark Spin Label, *Israel Journal of Chemistry*, 2019, 59, 1059-1074

- [51] G. Apte, A. Repanas, C. Willems, A. Mutjaba, **C. E. H. Schmelzer**, A. Raichur, F. Syrowatka, T. Groth: Effect of Different Crosslinking Strategies on Physical Properties and Biocompatibility of Freestanding Multilayer Films Made of Alginate and Chitosan, *Macromolecular Bioscience*, 2019, 1900181
- [50] N. Miekus, C. Luise, W. Sippl, T. Bączek, **C. E. H. Schmelzer**, A. Heinz: MMP-14 degrades tropoelastin and elastin, *Biochimie*, 2019, 156, 32-39
- [49] M. Götze, T. Kürbitz, O. Krimig, **C. E. H. Schmelzer**, A. Heilmann, G. Hillrichs: Investigation of Laser processing of biodegradable nanofiber nonwovens, *Journal of Laser Micro/Nanoengineering*, 2019, 14(1), 66-73
- [48] T. Hedtke, C. U. Schröder, A. Heinz, W. Hoehenwarter, J. Brinckmann, T. Groth, **C. E. H. Schmelzer**: A comprehensive map of human elastin cross-linking during elastogenesis, *FEBS Journal*, 2019, 286(18), 3594-3610
- [47] J. Reichenwallner, A. Thomas, T. Steinbach, J. Eisermann, **C. E. H. Schmelzer**, F. Wurm, D. Hinderberger: Ligand-Binding Cooperativity Effects in Polymer-Protein Conjugation, *Biomacromolecules*, 2019, 20(2), 1118-1131
- [46] **C. E. H. Schmelzer**, A. Heinz, H. Troilo, M. P. Lockhart-Cairns, T. A. Jowitt, M. Marchand, L. Bidault, T. Hedtke, A. Barret, M. J. Sherratt, S. Germain, D. J. S. Hulmes, C. Baldock, L. Muller: LOXL2-mediated cross-linking of tropoelastin, *FASEB Journal*, 2019, 33(4), 5468-5481
- [45] M. S. Niepel, B. K. Ekambaram, **C. E. H. Schmelzer**, T. Groth: Polyelectrolyte Multilayers of Poly (L-lysine) and Hyaluronic Acid on Nanostructured Surfaces Affect Stem Cell Response, *Nanoscale*, 2019, 11(6), 2878-2891
- [44] C. Kawecki, O. Bocquet; **C. E. H. Schmelzer**; A. Heinz; C. Ihling; A. Wahart; B. Romier; A. Bennisroune; S. Blaise; C. Terryn; K. J. Linton; L. Martiny; L. Duca; P. Maurice: Identification of CD36 as a new interaction partner of membrane NEU1: potential implication in the pro-atherogenic effects of the elastin receptor complex, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2019, 76(4), 791-807
- [43] J. Reichenwallner, M.-T. Oehmichen, **C. E. H. Schmelzer**, T. Hauenschild, A. Kerth, D. Hinderberger: Exploring the pH-induced Functional Phase Space of Human Serum Albumin by EPR Spectroscopy, *Magnetochemistry*, 2018, 4, 47
- [42] C. U. Schröder, A. Heinz, P. Majovsky, B. Karaman Mayack, J. Brinckmann, W. Sippl, **C. E. H. Schmelzer**: Elastin is heterogeneously cross-linked, *Journal of Biological Chemistry*, 2018, 293(39) 15107–15119
- [41] B. Romier, C. Ivaldi, H. Sartelet, H. Sartelet, A. Heinz, **C. E. H. Schmelzer**, R. Garnotel, A. Guillot, J. Jonquet, E. Bertin, J.-L. Guéant, J.-M. Alberto, J.-P. Bronowicki, J. Amoyel, T. Hocine, L. Duca, P. Maurice, A. Bennisroune, L. Martiny, L. Debelle, V. Durlach, S. Blaise: Production of Elastin-Derived Peptides Contributes to the Development of Nonalcoholic Steatohepatitis, *Diabetes*, 2018, 67, 1604-1615
- [40] R. Joshi, A. Heinz, Q. Fan, S. Guo, B. Monia, **C. E. H. Schmelzer**, A. S. Weiss, M. Batie, H. Parameswaran, B. M. Varisco: Role for Cela1 in Postnatal Lung Remodeling and Alpha-1 Antitrypsin-Deficient Emphysema, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 2018, 59, 167–178
- [39] A. C. Mora Huertas, **C. E. H. Schmelzer**, C. Luise, W. Sippl, M. Pietzsch, W. Hoehenwarter, A. Heinz: Degradation of tropoelastin and skin elastin by neprilysin, *Biochimie*, 2018, 146, 73-78

- [38] E. N. Tessema, T. Gebre-Mariam, **C. E. H. Schmelzer**, R. H. H. Neubert: Isolation and Structural Characterization of Glucosylceramides from Ethiopian Plants by LC/APCI-MS/MS, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2017, 141, 241–249
- [37] A. C. Mora Huertas, **C. E. H. Schmelzer**, W. Hoehenwarter, F. Heyroth, A. Heinz: Molecular-level insights into aging processes of skin elastin, *Biochimie*, 2016, 128-129, 163-173
- [36] **C. E. H. Schmelzer**, M. Nagel, S. Dziomba, Y. Merkher, S. S. Sivan, A. Heinz: Prolyl hydroxylation in elastin is not random, *BBA - General Subjects*, 2016, 1860, 2169-2177
- [35] A. Heinz, A. C. Mora Huertas, C. U. Schröder, R. Pankau, A. Gosch, **C. E. H. Schmelzer**: Elastins From Patients with Williams–Beuren Syndrome and Healthy Individuals Differ on the Molecular Level, *American Journal of Medical Genetics*, 2016, 170, 1832-1842
- [34] L. Gorisse, C. Pietrement, V. Vuible, **C. E. H. Schmelzer**, M. Köhler, L. Duca, L. Debelle, P. Fornes, S. Jaisson, P. Gillery: Protein carbamylation is a hallmark of aging, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2016, 113, 1191-1196
- [33] E. Andresen, S. Kappel, H.-J. Stärk, U. Riegger, J. Borovec, J. Mattusch, A. Heinz, **C. E. H. Schmelzer**, Š. Matoušková, B. Dickinson, H. Küpper: Cadmium toxicity investigated at the physiological and biophysical levels under environmentally relevant conditions using the aquatic model plant *Ceratophyllum demersum*, *New Phytologist*, 2016, 210, 1244-1258
- [32] C. U. Schröder, A. Heinz, P. Majovsky, **C. E. H. Schmelzer**: Fingerprinting Desmosine-Containing Elastin Peptides, *Journal of the American Society of Mass Spectrometry*, 2015, 26, 762-773
- [31] J. Matysiak, J. Hajduk, L. Pietrzak, **C. E. H. Schmelzer**, Z. J. Kokot: Shotgun proteome analysis of honeybee venom using targeted enrichment strategies, *Toxicon*, 2014, 90, 255-264
- [30] A. Heinz, C. U. Schröder, S. Baud, F. W. Keeley, S. M. Mithieux, A. S. Weiss, R. H. H. Neubert, **C. E. H. Schmelzer**: Molecular-level characterization of elastin-like constructs and human aortic elastin, *Matrix Biology*, 2014, 38, 12-21
- [29] D. Bourdetsky, **C. E. H. Schmelzer**, A. Admon: The contribution of the DRiPome to the HLA peptidome, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2014, 04/2014; 111(16)
- [28] B. Bochicchio, A. Laurita, A. Heinz, **C. E. H. Schmelzer**, A. Pepe: Investigating the role of (2S,4R)-4-hydroxyproline in elastin model peptides, *Biomacromolecules*, 2013, 14, 4278-4288
- [27] S. Blaise, B. Romier, C. Kawecki, M. Ghirardi, F. Rabenoelina, S. Baud, L. Duca, P. Maurice, A. Heinz, **C. E. H. Schmelzer**, M. Tarpin, L. Martiny, C. Garbar, M. Dauchez, L. Debelle, V. Durlach: Elastin-derived peptides, new regulators of insulin resistance development in mice, *Diabetes*, 2013, 62, 3807-3816
- [26] A. Heinz, C. K. H. Ruttkies, G. Jahreis, C. U. Schröder, K. Wichapong, W. Sippl, F. W. Keeley, R. H. H. Neubert, **C. E. H. Schmelzer**: In vitro cross-linking of elastin peptides and molecular characterization of the resultant biomaterials, *BBA - General Subjects*, 2013, 1830, 2994-3004
- [25] **C. E. H. Schmelzer**, M. C. Jung, J. Wohlrab, R. H. H. Neubert, A. Heinz: Does human leukocyte elastase degrade intact skin elastin?, *FEBS Journal*, 2012, 279, 4191-4200
- [24] S. S. Sivan, B. Van El, Y. Merkher, **C. E. H. Schmelzer**, A.-M. Zuurmond, A. Heinz, E. Wachtel, P.-P. Varga, A. Lazary, M. Brayda-Bruno, A. Maroudas: Longevity of elastin in human intervertebral disc as probed by the racemization of aspartic acid, *BBA - General Subjects*, 2012, 1820, 1671-1677

- [23] S. Smesny, **C. E. H. Schmelzer**, A. Hinder, A. Köhler, C. Schneider, M. Rudzok, U. Schmidt, B. Milleit, C. Milleit, I. Nenadic, H. Sauer, R. H. H. Neubert, J. Fluhr: Skin ceramide alterations in first-episode schizophrenia indicate abnormal sphingolipid metabolism, *Schizophrenia Bulletin*, 2013, 39, 933-941
- [22] A. Heinz, M. C. Jung, G. Jahreis, A. Rusciani, L. Duca, L. DeBelle, A. S. Weiss, R. H. H. Neubert, **C. E. H. Schmelzer**: The action of neutrophil serine proteases on elastin and its precursor, *Biochimie*, 2012, 94, 192-202
- [21] C. Sommer, T. C. Hertel, **C. E. H. Schmelzer**, M. Pietzsch: Investigations on the activation of recombinant microbial pro-transglutaminase: in contrast to proteinase K, dispase removes the histidine-tag, *Amino Acids*, 2012, 42, 997-1006
- [20] A. P. McGrath, S. M. Mithieux, C. A. Collyer, J. G. Bakhuis, M. van den Berg, A. Sein, A. Heinz, **C. Schmelzer**, A. S. Weiss, J. M. Guss: Structure and Activity of *Aspergillus nidulans* Copper Amine Oxidase, *Biochemistry*, 2011, 50, 5718–5730
- [19] A. Heinz, S. Taddese, W. Sippl, R. H. H. Neubert, **C. E. H. Schmelzer**: Insights into the degradation of human elastin by matrilysin-1, *Biochimie*, 2011, 93, 2, 187-194
- [18] A. Hinder, **C. E. H. Schmelzer**, A. V. Rawlings, R. H. H. Neubert: Investigation of the molecular structure of the human stratum corneum ceramides [NP] and [EOS] by mass spectrometry, *Skin Pharmacology and Physiology*, 2011, 24, 3, 127-135
- [17] J. Matysiak, **C. E. H. Schmelzer**, R. H. H. Neubert, Z. J. Kokot: Characterization of honeybee venom by MALDI-TOF and nanoESI-QqTOF mass spectrometry, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2011, 54, 2, 273-278
- [16] A. Heinz, M. C. Jung, L. Duca, W. Sippl, S. Taddese, C. Ihling, A. Rusciani, G. Jahreis, A. S. Weiss, R. H. H. Neubert, **C. E. H. Schmelzer**: Degradation of tropoelastin by matrix metalloproteinases: cleavage site specificities and release of matrikines, *FEBS Journal*, 2010, 277, 8, 1939-1956
- [15] S. Taddese, M. C. Jung, C. Ihling, A. Heinz, R. H. H. Neubert, **C. E. H. Schmelzer**: MMP-12 catalytic domain recognizes and cleaves at multiple sites in human skin collagen type I and type III, *BBA - Proteins and Proteomics*, 2010, 1804, 4, 731-739
- [14] S. Taddese, A. S. Weiss, G. Jahreis, R. H. H. Neubert, **C. E. H. Schmelzer**: In vitro degradation of human tropoelastin by MMP-12 and the generation of matrikines from domain 24, *Matrix Biol.*, 2009, 28, 2, 84-91
- [13] N. Nass, R. Schöps, R. Ulbrich-Hofmann, A. Simm, L. Hohndorf, **C. E. H. Schmelzer**, K. Raith, R. H. H. Neubert, K. Eder: Screening for nutritive peptides that modify cholesterol 7- α -hydroxylase expression, *J. Agric. Food Chemistry*, 2008, 56, 13, 4987-4994
- [12] S. Taddese, A. S. Weiss, R. H. H. Neubert, **C. E. H. Schmelzer**: Mapping of macrophage elastase cleavage sites in insoluble human skin elastin, *Matrix Biol.*, 2008, 27, 5, 420-428
- [11] S. Gerber, K. Kirchhof, J. Kressler, **C. E. H. Schmelzer**, C. Scholz, T. C. Hertel, M. Pietzsch: Cloning, Expression, Purification and Characterization of a Designer Protein with Repetitive Sequences, *Protein Expr. Purif.*, 2008, 59, 2, 203-215
- [10] H. Farwanah, B. Pierstorff, **C. E. H. Schmelzer**, K. Raith, R. H. H. Neubert, T. Kolter, K. Sandhoff: Separation and mass spectrometric characterization of covalently bound skin ceramides using LC/APCI-MS and Nano-ESI-MS, *J. Chromatogr. B*, 2007, 584, 1-2, 562-570

- [9] **C. E. H. Schmelzer**, R. Schöps, L. Reynell, R. Ulbrich-Hofmann, R. H. H. Neubert, K. Raith: Peptic digestion of β -casein - Time course and fate of possible bioactive peptides, *J. Chromatogr. A*, 2007, 1166, 1-2, 108-115
- [8] A. Huenerbein, **C. E. H. Schmelzer**, R. H. H. Neubert: Real-time monitoring of peptic and tryptic digestions of bovine β -casein using quartz crystal microbalance, *Anal. Chim. Acta*, 2007, 584, 1, 72-77
- [7] A. Jäckel, **C. E. H. Schmelzer**, S. Wartewig, R. H. H. Neubert: Sublimation of antimycotic agents as proved by various analytical methods, *Pharmazie*, 2006, 61, 12, 1045-1047
- [6] K. Raith, **C. E. H. Schmelzer**, R. H. H. Neubert: Towards a molecular characterization of pharmaceutical excipients: mass spectrometric investigation of ethoxylated surfactants, *Int. J. Pharm.*, 2006, 319, 1-2, 1-12
- [5] M. Getie, **C. E. H. Schmelzer**, A. S. Weiss, R. H. H. Neubert: Complementary mass spectrometric techniques to achieve complete sequence coverage of recombinant human tropoelastin, *Rapid Comm. Mass Spectrom.*, 2005, 19, 20, 2989-2993
- [4] **C. E. H. Schmelzer**, M. Getie, R. H. H. Neubert: Mass spectrometric characterization of human skin elastin peptides produced by proteolytic digestion with pepsin and thermolysin, *J. Chromatogr. A*, 2005, 1083, 1-2, 120-126
- [3] M. Getie, **C. E. H. Schmelzer**, R. H. H. Neubert: Characterization of peptides resulting from digestion of human skin elastin with elastase, *Proteins*, 2005, 61, 3, 649-657
- [2] **C. E. H. Schmelzer**, R. Schöps, R. Ulbrich-Hofmann, R. H. H. Neubert, and K. Raith: Mass spectrometric characterization of peptides derived by peptic cleavage of bovine β -casein, *J. Chromatogr. A*, 2004, 1055, 1-2, 87-92
- [1] **C. E. H. Schmelzer**, W. Zwirbla, E. Rosenfeld, B. B. J. Linde: Acoustic investigations of pseudo-stable structures in aqueous solutions of polyethylene glycols, *J. Mol. Struct.*, 2004, 699, 1-3, 47-51

BUCHKAPITEL

- [2] A. Wahart, A. Bennisroune, **C. E. H. Schmelzer**, M. Laffargue, S. Blaise, B. Romier-Crouzet, H. Sartelet, L. Martiny, P. Gillery, S. Jaisson, P. Maurice, L. Duca: "Chapter: Role of elastin and elastin-derived peptides in arterial stiffness: from synthesis to potential therapeutic interventions" in "Arterial Stiffness and Pulsatile Hemodynamics in Health", Editor: Julio Chirinos, Academic Press, 2021, ISBN 9780128202937
- [1] **C. E. H. Schmelzer**: "Chapter 1: Assembly and Properties of Elastic Fibers" in "Elastic Fiber Matrices: Biomimetic Approaches to Regeneration and Repair", Editoren: A. Ramamurthi und C. Kothapalli, CRC Press, Taylor & Francis Group, 2016, ISBN 9781498721905

7 ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich gemäß der Habilitationsordnung der Naturwissenschaftlichen Fakultät I (Biowissenschaften) der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg an Eides statt, dass ich die vorgelegte Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Weiterhin habe ich keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht.

Zudem versichere ich, dass ich diese Arbeit keiner anderen Universität oder Hochschule vorgelegt habe.

Halle (Saale), 04.11.2020

Christian Schmelzer

8 ANHANG: DER HABILITATIONSSCHRIFT ZU GRUNDE LIEGENDE VERÖFFENTLICHUNGEN

- A1 Taddese, S., Weiss, A. S., Neubert, R. H. H. und **Schmelzer, C. E. H.*** (2008) Mapping of macrophage elastase cleavage sites in insoluble human skin elastin. *Matrix Biol* 27 (5): 420-428, <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2008.02.001>

- A2 Taddese, S., Weiss, A. S., Jahreis, G., Neubert, R. H. H. und **Schmelzer, C. E. H.***
(2009) In vitro degradation of human tropoelastin by MMP-12 and the generation
of matrikines from domain 24. *Matrix Biol* 28 (2): 84-91,
<https://doi.org/10.1016/j.matbio.2008.12.002>

- A3 Heinz, A., Jung, M. C., Duca, L., Sippl, W., Taddese, S., Ihling, C., Rusciani, A., Jahreis, G., Weiss, A. S., Neubert, R. H. H. und **Schmelzer, C. E. H.*** (2010) Degradation of tropoelastin by matrix metalloproteinases - cleavage site specificities and release of matrikines. *FEBS J* 277 (8): 1939-1956,
<https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2010.07616.x>

- A4 Taddese, S., Jung, M. C., Ihling, C., Heinz, A., Neubert, R. H. H. und **Schmelzer, C. E. H.*** (2010) MMP-12 catalytic domain recognizes and cleaves at multiple sites in human skin collagen type I and type III. *Biochim Biophys Acta Gen Subj* 1804 (4): 731-739, <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2009.11.014>

- A5 Heinz, A., Taddese, S., Sippl, W., Neubert, R. H. H. und **Schmelzer, C. E. H.*** (2011)
Insights into the degradation of human elastin by matrilysin-1. *Biochimie* 93 (2):
187-194, <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2010.09.011>

- A6 Heinz, A., Jung, M. C., Jahreis, G., Rusciani, A., Duca, L., Debelle, L., Weiss, A. S., Neubert, R. H. H. und **Schmelzer, C. E. H.*** (2012) The action of neutrophil serine proteases on elastin and its precursor. *Biochimie* 94 (1): 192-202,
<https://doi.org/10.1016/j.biochi.2011.10.006>

- A7 **Schmelzer, C. E. H.***, Jung, M. C., Wohlrab, J., Neubert, R. H. H. und Heinz, A. (2012)
Does human leukocyte elastase degrade intact skin elastin? *FEBS J* 279 (22): 4191-
4200, <https://doi.org/10.1111/febs.12012>

- A8 Sivan, S. S.* , Van El, B., Merkher, Y., **Schmelzer, C. E. H.**, Zuurmond, A. M., Heinz, A., Wachtel, E., Varga, P. P., Lazary, A., Brayda-Bruno, M. und Maroudas, A. (2012) Longevity of elastin in human intervertebral disc as probed by the racemization of aspartic acid. *Biochim Biophys Acta Gen Subj* 1820 (10): 1671-1677, <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.06.010>

- A9 Bochicchio, B., Laurita, A., Heinz, A., **Schmelzer, C. E. H.** und Pepe, A.* (2013) Investigating the role of (2S,4R)-4-hydroxyproline in elastin model peptides. *Biomacromolecules* 14 (12): 4278-4288, <https://doi.org/10.1021/bm4011529>

- A10 Heinz, A.*, Ruttkies, C. K., Jahreis, G., Schröder, C. U., Wichapong, K., Sippl, W., Keeley, F. W., Neubert, R. H. H. und **Schmelzer, C. E. H.** (2013) In vitro cross-linking of elastin peptides and molecular characterization of the resultant biomaterials. *Biochim Biophys Acta* 1830 (4): 2994-3004,
<https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.01.014>

- A11 Heinz, A.*, Schröder, C. U., Baud, S., Keeley, F. W., Mithieux, S. M., Weiss, A. S., Neubert, R. H. H. und **Schmelzer, C. E. H.** (2014) Molecular-level characterization of elastin-like constructs and human aortic elastin. *Matrix Biol* 38: 12-21,
<https://doi.org/10.1016/j.matbio.2014.07.006>

- A12 Schröder, C. U., Heinz, A., Majovsky, P. und **Schmelzer, C. E. H.*** (2015) Fingerprinting desmosine-containing elastin peptides. *J Am Soc Mass Spectrom* 26 (5): 762-773, <https://doi.org/10.1007/s13361-014-1075-9>

- A13 Mora Huertas, A. C., **Schmelzer, C. E. H.**, Hoehenwarter, W., Heyroth, F. und Heinz, A.* (2016) Molecular-level insights into aging processes of skin elastin. *Biochimie* 128-129: 163-173, <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2016.08.010>

- A14 **Schmelzer, C. E. H.**, Nagel, M. B., Dziomba, S., Merkher, Y., Sivan, S. S. und Heinz, A.* (2016) Prolyl hydroxylation in elastin is not random. *Biochim Biophys Acta Gen Subj* 1860 (10): 2169-2177, <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2016.05.013>

- A15 Gorisse, L., Pietrement, C., Vuiblet, V., **Schmelzer, C. E. H.**, Köhler, M., Duca, L., Debelle, L., Fornes, P., Jaisson, S. und Gillery, P.* (2016) Protein carbamylation is a hallmark of aging. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113 (5): 1191-1196.

- A16 Mora Huertas, A. C., **Schmelzer, C. E. H.**, Luise, C., Sippl, W., Pietzsch, M., Hoehenwarter, W. und Heinz, A.* (2018) Degradation of tropoelastin and skin elastin by neprilysin. *Biochimie* 146: 73-78, <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2017.11.018>

A17 Schröder, C. U., Heinz, A., Majovsky, P., Karaman Mayack, B., Brinckmann, J., Sippl, W. und **Schmelzer, C. E. H.*** (2018) Elastin is heterogeneously cross-linked. *J Biol Chem* 293 (39): 15107-15119, <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.004322>

- A18 Hedtke, T., Schröder, C. U., Heinz, A., Hoehenwarter, W., Brinckmann, J., Groth, T. und **Schmelzer, C. E. H.*** (2019) A comprehensive map of human elastin cross-linking during elastogenesis. *FEBS J* 286 (18): 3594-3610, <https://doi.org/10.1111/febs.14929>

- A19 Miekus, N., Luise, C., Sippl, W., Baczek, T., **Schmelzer, C. E. H.** und Heinz, A.* (2019)
MMP-14 degrades tropoelastin and elastin. *Biochimie* 165: 32-39,
<https://doi.org/10.1016/j.biochi.2019.07.001>

- A20 **Schmelzer, C. E. H.**, Heinz, A., Troilo, H., Lockhart-Cairns, M. P., Jowitt, T. A., Marchand, M. F., Bidault, L., Bignon, M., Hedtke, T., Barret, A., McConnell, J. C., Sherratt, M. J., Germain, S., Hulmes, D. J. S., Baldock, C. und Muller, L.* (2019) Lysyl oxidase-like 2 (LOXL2)-mediated cross-linking of tropoelastin. *FASEB J* 33 (4): 5468-5481, <https://doi.org/10.1096/fj.201801860RR>

- A21 Panwar, P., Hedtke, T., Heinz, A., Andrault, P. M., Hoehenwarter, W., Granville, D. J., **Schmelzer, C. E. H.** und Brömme, D.* (2020) Expression of elastolytic cathepsins in human skin and their involvement in age-dependent elastin degradation. *Biochim Biophys Acta Gen Subj* 1864 (5): 129544, <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2020.129544>