

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I

der Universität Würzburg

Direktor: Professor Dr. med. G. Ertl

**Charakterisierung des zirkulierenden FAP α in humanem
Plasma bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom**

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Yasmin Habbaba

aus Würzburg

Würzburg, Oktober 2014

Referent: Priv.-Doz. Dr. med. Ulrich Hofmann

Koreferent: Prof. Dr. rer. medic. Samuel Samnick

Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 20.07.2015

Die Promovendin ist Ärztin.

Meinen Eltern gewidmet.

Freudig war vor vielen Jahren

Eifrig so der Geist bestrebt,

Zu erforschen, zu erfahren,

Wie Natur im Schaffen lebt.

Und es ist das ewig Eine,

Das sich vielfach offenbart.

Klein das Große, groß das Kleine,

Alles nach der eignen Art.

Immer wechselnd, fest sich haltend,

Nah und fern und fern und nah;

So gestaltend, umgestaltend -

Zum Erstaunen bin ich da.

Johann Wolfgang von Goethe

Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Tillmanns J, Widera C, Habbaba Y et al., *Circulating concentrations of fibroblast activation protein alpha in apparently healthy individuals and patients with acute coronary syndrome as assessed by sandwich ELISA*. Int J Cardiol, 2013. **168**(4): p. 3926-31.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Koronare Herzkrankheit	1
1.1.1 Epidemiologie.....	1
1.1.2 Definition und Manifestationsformen	1
1.1.3 Pathophysiologie der Atherosklerose und Myokardinfarkt.....	2
1.1.4 Biomarker der Myokardnekrose	3
1.2 FAP α	4
1.2.1 FAP α -Gewebsexpression und -Funktion.....	4
1.2.2 Der TGF β -Signalweg im Rahmen der FAP α -Expression	6
1.2.3 Struktur von FAP α	7
1.2.4 Antiplasmin Cleaving Enzyme	8
1.2.5 Substrate von FAP α	9
1.3 Fragestellung	10
2. Materialien und Methoden	10
2.1 Zellkultur	10
2.1.1 Kultivierung humaner kardialer Fibroblasten.....	10
2.1.2 Lyse der Zellen, Aufbereitung der Zellkulturüberstände für den ELISA.....	11
2.1.3 Transfektion der HCFs mit siRNA	12
2.1.3.1 siRNA - Mechanismus	12
2.1.3.2 Durchführung der siRNA-Transfektion.....	12
2.1.4 Zytokin-Stimulation und Inhibition von Signalwegen	13
2.2 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Lowry	14
2.3 Western-Blot-Verfahren	14
2.4 FAP α -ELISA	16
2.4.1 Durchführung des ELISA	16
2.4.2 Auswertung des ELISA	19
2.4.3 Validierung des ELISA für nicht-validierte Proben	19

2.4.4 Qualitätskontrolle und Präanalytik bei der Messung der FAP α -Plasmaspiegel	20
2.4.4.1 Inter- und Intra-Assay-Variabilität	20
2.4.4.2 Einfluss der Lagerungsbedingungen der Blutproben auf die FAP α -Konzentration	21
2.5 Humane Blutproben und Studienkollektiv	21
2.5.1 Probenaufbereitung	21
2.5.2 Probenkollektiv	21
2.5.2.1 Proben zur ELISA-Validierung	22
2.5.2.2 Blutspender-Kontrollgruppe	22
2.5.2.3 ACS-Patientengruppe	22
2.5.2.4 Patienten mit stabiler KHK	23
2.5.3 Laborchemie der Blutproben der ACS-Patienten	23
2.6 Statistische Analyse	23
2.6.1 FAP α in Zelllysaten und Zellkulturüberständen	23
2.6.2 FAP α in humanem Plasma	24
3. Ergebnisse	24
3.1 Zelluläres und lösliches FAP bei HCF	24
3.1.1 FAP α -Expression und zeitabhängige Abgabe in den Überstand durch TGF β ₁	25
3.1.2 Transfektion von HCF mit FAP α siRNA	27
3.2 Der Signalweg zur Expression von FAP α	29
3.2.1 Rolle von EGR-1	29
3.2.2 CTGF und TNF α	31
3.2.3 Der TGF β ₁ -Signalweg zur Induktion von FAP α	33
3.2.3.1 Der nicht-kanonische TGF β -Signalweg	33
3.2.3.2 Der kanonische TGF β -Signalweg	36
3.3 Nachweis von löslichem FAP α in humanem Plasma: Validierung des ELISA ...	39

3.4 Präanalytik vor Beginn der Studie	42
3.5 Eigenschaften des FAP α -ELISA	45
3.6 FAP α -Konzentrationen in gesunden Blutspendern	45
3.7 FAP α -Konzentrationen bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom.....	46
3.8 FAP α in ACS-Patienten.....	48
3.9 Einfluss von stabiler KHK auf FAP α Konzentration	49
4. Diskussion.....	49
4.1 Zelluläres und lösliches FAP α in HCF	49
4.2 Der TGF β ₁ -Signalweg zur Induktion der FAP α -Expression.....	50
4.3 Rolle von EGR-1, CTGF und TNF α in der Regulation der FAP α -Expression....	52
4.4 Strukturvariabilität von FAP α	54
4.5 Etablierung eines FAP α -ELISA für humanes Plasma.....	55
4.6 FAP α als potentieller prognostischer Marker in ACS-Patienten.....	56
5. Zusammenfassung	60
6. Literatur	62
7. Abbildungsverzeichnis	70

Alphabetisches Abkürzungsverzeichnis

ACS	Acute coronary syndrome, akutes Koronarsyndrom
ALK	Activin Receptor-like Kinase
ANOVA	Analysis of Variance
APCE	Antiplasmin Cleaving Enzyme
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
BNP	Brain Natriuretic Peptide
BSA	Bovines Serumalbumin
BSG	Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit
CK	Creatininkinase
CRP	C-reaktives Protein
CTGF	Connective Tissue Growth Factor
cTnT	Kardiales Troponin T
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DPP	Dipeptidylpeptidase
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylene diamine teraacetic acid, Ethylendiaminessigsäure
eGFR	Estimated Glomerular Filtration Rate, geschätzte glomeruläre Filtrationsrate
EGR-1	Early growth response protein 1
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ERK	Extracellular-signal Regulated Kinase
FAP α	Fibroblast Activation Protein alpha
FBS	Fetal Bovine Serum, Fötales Bovines Serum
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
HASMC	Human Aortic Smooth Muscle Cells, humane aortale glatte Muskelzellen
HCF	Human cardiac fibroblasts, humane kardiale Fibroblasten
HEPES	Hydroxyethylpiperazinylethansulfonsäure
HOS	Human Osteosarcoma Cell Line, Humane Osteosarkomzellen
HRP	Horseradish Peroxidase, Meerrettichperoxidase
IL-6	Interleukin-6

KHK	Koronare Herzkrankheit
LOX	Humane Melanomzelllinie
MAPK	Mitogen-activated Protein Kinase
MDRD	Modification of Diet in Renal Disease
MEK 1/2	Mitogen-activated ERK-Kinase 1/2
MI	Myokardinfarkt
MMP-1	Matrixmetalloproteinase-1
MW	Mittelwert
NSTEMI	Non-ST-Hebungsinfarkt
NT pro-BNP	N-terminales pro-Brain natriuretisches Peptid
Opti-MEM	Opti-Minimal Essential Medium
PBS	Phosphate Buffered Saline
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RISC	RNA-induced Silencing Complex
RT-PCR	Real-Time Polymerasekettenreaktion
SDS (-PAGE)	Sodium Dodecyl Sulfate (Polyacrylamid Gelelektrophorese)
siRNA	Small interfering RNA
Smad-2/-3	Sma/Mad homology-2/-3
SMC	Smooth Muscle Cells, glatte Muskelzellen
STEMI	ST-Hebungsinfarkt
Stabw	Standardabweichung
TBST	Tris-Buffered Saline und Tween 20
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TGFβ-1	Transforming growth factor beta 1
TNFα	Tumor necrosis factor alpha
α ₂ AP	α ₂ -Antiplasmin

1. Einleitung

1.1 Koronare Herzkrankheit

1.1.1 Epidemiologie

Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems stellen ein erhebliches gesundheitsbezogenes und sozioökonomisches Problem dar. So verursachten kardiovaskuläre Erkrankungen in Deutschland im Jahr 2008 Kosten in Höhe von fast 37 Milliarden Euro, was rund 15 % der gesamten Gesundheitsausgaben der Bundesrepublik entspricht ¹.

Hierbei spielen vor allem die Manifestationsformen der koronaren Herzkrankheit (KHK) eine führende Rolle. Schätzungen zufolge manifestiert sich eine KHK bei jedem zweiten Mann und jeder dritten Frau im mittleren Lebensalter ². Auch wenn seit den 1980er-Jahren die Sterblichkeit an koronarer Herzkrankheit in Deutschland sowie den USA insgesamt stetig sinkt, stellt die KHK noch immer die Haupttodesursache in den Industrienationen dar, und wird laut Prognosen bis 2020 auch Schwellenländer betreffen ³⁻⁶.

1.1.2 Definition und Manifestationsformen

Die koronare Herzkrankheit (KHK) bezeichnet die Manifestation einer Atherosklerose an den Herzkranzgefäßen, wobei die dort entstehenden Stenosen zu einer Koronarinsuffizienz, einem Missverhältnis zwischen Sauerstoffangebot und -bedarf des Myokards, führen ^{7, 8}. Die hervorgerufene Myokardischämie hat verschiedene Manifestationsformen. In 40 % der Fälle zeigt sich eine Angina pectoris als Erstmanifestation einer KHK; in 10 % der Fälle äußert sich eine KHK erstmalig durch einen plötzlichen Herztod. Die häufigste Erstmanifestationsform einer KHK nimmt mit rund 50 % der Fälle das akute Koronarsyndrom (ACS) ein ⁸. Die Bezeichnung „akutes Koronarsyndrom“ ist ein Sammelbegriff für die präklinisch schwer zu differenzierenden Krankheitsbilder der instabilen Angina pectoris, des Non-ST-Hebungsinfarktes (NSTEMI, „Non ST-elevation myocardial infarction“) und des ST-Hebungsinfarktes (STEMI, „ST-elevation myocardial infarction“), denen als gemeinsames pathophysiologisches Substrat eine im unterschiedlichen Ausmaß ausgeprägte Minderperfusion des Myokards zugrunde liegt ⁹. Dennoch gibt es große Unterschiede im Langzeitrisiko für weitere kardiovaskuläre Ereignisse innerhalb dieser heterogenen Gruppe. Die häufigste Ursache eines akuten Koronarsyndroms ist die Ruptur eines atherosklerotischen Plaques ¹⁰.

1.1.3 Pathophysiologie der Atherosklerose und Myokardinfarkt

Atherosklerotische Veränderungen sind asymmetrische Verdickungen der Intima, die aus Bindegewebeelementen, Lipiden, Zelltrümmern und vor allem aus Zellen des Immunsystems, aus Endothelzellen der Gefäße und Zellen der glatten Muskulatur (SMC, smooth muscle cells) bestehen^{11, 12}. Kennzeichen der Erkrankung ist eine fortschreitende Degeneration, die bei wachsenden atherosklerotischen Plaques zu einer Einengung des Gefäßlumens führen kann.

Die primäre makroskopisch sichtbare atherosklerotische Läsion sind sogenannte „fatty streaks“, Ansammlungen von lipidbeladenen Makrophagen unter der Endothelzellschicht, die auch schon bei Kindern vorhanden sein können¹³. „Fatty streaks“ können entweder weiter zu atherosklerotischen Läsionen fortschreiten oder durch Abbau verschwinden¹¹. Der erste Schritt zur Entstehung dieser Läsionen beinhaltet die subendotheliale Retention von cholesterolreichen Lipoproteinen und die konsekutive Infiltration der Intima durch Makrophagen, die sich dort durch Aufnahme von oxidiertem Lipoprotein zu Schaumzellen transformieren^{10, 14-16}. Es kommt zur lokalen Entzündungsreaktion mit Zytokinausschüttung (v.a. $\text{TNF}\alpha$, IL-6 und -8), die wiederum zur Stimulation und zum Einwandern von Mastzellen, Makrophagen und T-Lymphozyten führt^{10, 12, 17}. Durch von aktivierten T-Lymphozyten synthetisiertem Interferon- γ kommt es zur Förderung der Kollagenbildung in glatten Muskelzellen, gleichzeitig wird deren Apoptose gehemmt, was zu einer Ausdünnung der fibrösen Deckkappe des atherosklerotischen Plaques führt. Auch wird die Expression von Matrixmetalloproteinasen gesteigert, deren proteolytische Wirkung in einer weiteren Ausdünnung der Deckkappe und konsekutiver Destabilisierung des Plaques resultiert^{10, 18}. Dagegen steht eine Regulation der Inflammation durch eine Reihe von protektiven Faktoren. In verschiedenen Mausmodellen konnte gezeigt werden, dass natürliche regulatorische T-Zellen über TGF β -abhängige Signalwege das Fortschreiten der Atherosklerose verlangsamen können, indem sie sowohl zu einem erhöhten Kollagengehalt des atherosklerotischen Plaques beitragen als auch die Zahl der inflammatorischen Zellen innerhalb des Plaques begrenzen¹⁹. Die Rolle von TGF β im Rahmen der Atheromentstehung wurde ebenfalls mehrfach durch Unterbrechung des TGF β -Signalwegs verdeutlicht, die in einer raschen Entwicklung großer, instabiler atherosklerotischer Plaques resultierte²⁰⁻²². Der Mechanismus des atheroprotektiven Effekts von TGF β ist bisher unzureichend geklärt. In verschiedenen Studien wird jedoch eine TGF β -abhängige Inhibition der T-Zell-Aktivierung vorge-

schlagen^{22, 23}. Der Übergang von einem stabilen zu einem rupturanfälligen Plaque verläuft vor allem durch eine Imbalance zwischen Entzündung und Produktion der Extrazellulärmatrix²⁴. Vulnerable Plaques können unter besonderer Belastung im Bereich der Deckkappe erodieren oder, besonders im Bereich der Schulterregion zwischen der Deckkappe und der angrenzenden gesunden Intima, rupturieren, wodurch zunächst durch Adhäsion von Thrombozyten und deren Aktivierung die Thrombozytenaggregation im Rahmen der primären Hämostase ausgelöst wird. Gleichzeitig wird durch Kollagen und Gewebsthrombokinase die plasmatische Gerinnungskaskade aktiviert, die schließlich zur Bildung von Fibrinablagerungen führt¹⁸. Im Rahmen der Plaqueruptur kann es so zur vollständigen Okklusion von Koronararterien und damit bei anhaltender Ischämie zu einem Infarkt des versorgten Gewebes durch Untergang der Kardiomyozyten kommen. Eine vollständige Nekrose aller Kardiomyozyten im Versorgungsgebiet benötigt vier bis sechs Stunden in Abhängigkeit von der Versorgung durch Kollateralen, der Persistenz der Koronarokklusion und der Sensitivität der Kardiomyozyten. Histopathologisch wird ein akuter Infarkt (sechs Stunden bis sieben Tage nach dem Ereignis) durch die Anwesenheit polymorphonuklearer Leukozyten gekennzeichnet, im heilenden Infarkt (7 – 28 Tage) finden sich vor allem Fibroblasten und mononukleare Zellen. Ein ausgeheilter Infarkt (über 28 Tage) imponiert als Narbe ohne zelluläre Infiltrationen²⁵.

1.1.4 Biomarker der Myokardnekrose

Im Serum und Plasma gemessene Biomarker für einen myokardialen Schaden stellen neben einer elektrokardiographischen Untersuchung einen Hauptpfeiler in der Diagnose eines akuten Myokardinfarktes (MI) dar. Neben der Akutdiagnose erlauben manche Biomarker weiterhin im Rahmen der Risikostratifizierung eines Patientenkollektivs prognostische Aussagen und sind somit hilfreich in der Identifikation von Patienten mit deutlich erhöhtem Risiko.

Ein Myoglobinstieg im Serum kann schon zwei Stunden nach einem Infarkt gemessen werden. Da Myoglobin allerdings auch bei Skelettmuskelschäden freigesetzt wird, ist auch durch eine nachgewiesene Erhöhung kein Infarktnachweis möglich. Die Messung der Aktivität der Creatinkinase (Gesamt-CK) als Leitenzym zur Diagnose von Schäden der Herz- und Skelettmuskulatur sowie deren Isoform CK-MB erlaubt eine weitere Einschätzung einer myokardialen Schädigung. CK-MB-Anteile zwischen 6 – 20 % der Gesamt-CK sprechen hierbei für eine Schädigung der Herzmuskulatur mit konsekutiver Enzymfreisetzung; die Höhe des Gesamt-CK-Anstieges korreliert dabei mit der

Infarktgröße. Weiterhin ist eine Bestimmung der CK-MB-Proteinkonzentration mittels Enzymimmunoassay-Technik möglich, welche im Vergleich zur Aktivitätsmessung eine höhere Sensitivität besitzt und bei einem Anstieg auf mehr als das Vierfache des Ausgangswerts als Marker für eine erfolgreiche Reperfusion nach Lysetherapie dient⁸. Mit hoher Sensitivität wird ein Herzmuskelschaden heutzutage vor allem durch Messung der herzspezifischen Proteine Troponin I und Troponin T nachgewiesen. Ein Anstieg wird hier ab etwa drei bis sechs Stunden post-MI mit einem Maximum nach etwa 20 Stunden detektiert⁸. In verschiedenen Studien konnten erhöhte Troponin T- und I-Werte bei instabiler KHK als unabhängige Risikofaktoren für eine schlechtere Kurz- sowie Langzeitprognose durch erhöhte Mortalität kardialer Ursache identifiziert werden²⁶⁻²⁸. Unspezifisch kommt es außerdem im Rahmen der Myokardnekrose als Ausdruck der Inflammation zu einem Anstieg des C-reaktiven Proteins (CRP), der Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit (BSG), des Blutzuckers und der Leukozytenwerte⁸. Eine Assoziation der Erhöhung der Akute-Phase-Proteine CRP und Fibrinogen mit einer schlechteren Prognose hinsichtlich kardialer Ereignisse konnte sowohl für Patienten mit instabiler KHK^{26, 29, 30} als auch für Gesunde gezeigt werden³¹.

1.2 FAP α

Das Fibroblast-activation protein α (FAP α) ist ein Typ II-Membran-Glykoprotein mit einer Molekülmasse von 97 kDa. Aktives Fibroblast-activation protein (FAP, auch bekannt als Seprase: surface expressed protease) ist ein Homodimer aus zwei identischen FAP α -Untereinheiten und besitzt eine Molekülmasse von 170 kDa. In dimerisierter Form besitzt dieses Enzym sowohl Endopeptidase- als auch Gelatinase-Aktivität³²⁻³⁵. FAP, zunächst als F19-Antigen bezeichnet, wurde erstmals 1986 als induzierbares Membranglykoprotein in kultivierten Fibroblasten beschrieben^{36, 37}. Wenig später wurde FAP auch auf Invadopodien von Melanom-Zellen nachgewiesen und dessen Rolle als möglicher Marker für die Invasivität von Tumoren untersucht^{38, 39}.

1.2.1 FAP α -Gewebeexpression und -Funktion

FAP α wird in Organen unter physiologischen Bedingungen in niedrigen Konzentrationen exprimiert, so v.a. in mesenchymalen Stromazellen im Knochenmark und Zellen des proliferierenden Endometriums^{40, 41}. Keane et. al. konnten kürzlich die proteolytische Aktivität von FAP α in verschiedenen Gewebearten bei Mäusen und Pavianen messen. Hier zeigte sich eine besonders starke FAP α -Aktivität im murinen Uterus, Pancreas

und der Glandula submaxillaris sowie in der Epididymis, der Blase und im Fett- und Nervengewebe des Pavians. In den großen Organen wie Herz, Nieren, Leber und Lunge konnte unter physiologischen Bedingungen keine FAP α -Aktivität nachgewiesen werden⁴². Die Expression von FAP α geschieht hingegen im Rahmen des Gewebsumwandlung während der Embryonalentwicklung, im Granulationsgewebe bei der Wundheilung und im reaktiven Tumorstroma der meisten Karzinome sowie mancher Sarkome, es fehlt dagegen aber in ruhenden Fibroblasten^{37, 41, 43}. Im Modellorganismus *Xenopus* wurde schon sehr bald eine FAP α -Expression im Zusammenhang mit der Resorption des Schwanzes während der Metamorphose beschrieben⁴⁴. Auch im Rahmen diverser Erkrankungen beim Menschen wurde eine erhöhte FAP α -Produktion detektiert. So konnte bei Patienten mit idiopathischer Lungenfibrose eine FAP α -Expression in den Bereichen mit rezidivierendem Gewebsschaden gezeigt werden, nicht hingegen im gesunden Lungengewebe⁴⁵. Weiterhin konnte eine selektive Expression von FAP α in aktivierten Ito-Zellen der Leber an der Grenzfläche der zirrhotischen Umwandlung nachgewiesen werden, weshalb auch eine mögliche Beteiligung von FAP α beim Umbau der Extrazellulärmatrix diskutiert wird⁴⁶. Bei Patienten mit chronischer Hepatitis C korrelierte der Expressionsgrad von FAP α mit dem Schweregrad der Zirrhose⁴⁷. Auch bei Keloid-Fibroblasten ließ sich eine im Vergleich zu normalen Haut-Fibroblasten gesteigerte FAP α -Expression und ein konsekutiv erhöhtes Invasionspotential feststellen⁴⁸. Weiterhin konnte bei Patienten mit rheumatoider Arthritis eine Expression von FAP α in der Synovia detektiert werden, was ebenfalls eine Funktion von FAP α im Rahmen der Knorpel- und Knochenzerstörung arthritischer Gelenke vermuten lässt^{49, 50}. Analog stellt sich ebenfalls eine mögliche Rolle von FAP α beim Gewebeab- und Umbau im Rahmen der Arthrose dar, da sowohl eine gesteigerte Expression von FAP α in Chondrozyten von Arthrose-Patienten als auch eine Induktion von FAP α durch proinflammatorische Zytokine gezeigt werden konnten⁵¹. Unlängst wurde darüber hinaus FAP α in atherosklerotischen Plaques mit dünner fibröser Deckplatte detektiert, wo es zum Kollagenabbau und zur weiteren Ausdünnung der Deckplatte beiträgt⁵². Weiterhin wurde bereits eine gesteigerte Expression von FAP α in kardialen Fibroblasten nach experimenteller Myokardischämie immunhistologisch gezeigt⁵³. Im Gesamtkontext lässt sich demnach eine Rolle der FAP α -Expression in Zusammenhang mit dem Gewebeumbau vermuten, der einerseits im physiologischen Rahmen während der Entwicklung und der Wundheilung, andererseits im Rahmen pathologischer Vorgänge bei chronischen Entzündungen, Fibrose oder Krebserkrankungen vorkommt.

In verschiedenen Studien konnten Hinweise für eine tumorsupprimierende Funktion von FAP α gefunden werden. So wurde in Melanomzellen durch Reexpression der Exopeptidase DPP-IV, die Strukturähnlichkeit mit FAP α besitzt, der Zellzyklus arretiert oder sogar die Apoptose eingeleitet, auch wenn durch Mutation die katalytische Aktivität von DPP-IV aufgehoben wurde. Gleichzeitig führte die DPP-IV-Expression auch zu einer gesteigerten FAP α -Expression, sodass Wesley et al. von einer möglichen proapoptotischen Wirkung von FAP α bei Melanomzellen ausgingen⁵⁴. Auch gibt es weitere Hinweise auf eine direkte Funktion von FAP α als Tumorsuppressor in einem murinen Melanommodell, in dem durch Expression von FAP α das Tumorstadium deutlich reduziert sowie die Kontaktinhibition und die Abhängigkeit der Zellen von Wachstumsfaktoren wieder hergestellt wurde. Interessanterweise führte hierbei die Expression einer katalytisch inaktiven Mutante von FAP α zu einer stärkeren Tumorsuppression als die des Wildtyps⁵⁵. Dagegen wurde in einer Vielzahl anderer Studien eine potentielle Rolle von FAP α als Tumor-Promotor beschrieben. In einem Mausmodell konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von FAP α sowohl die Entstehung eines Tumors fördert als auch dessen Wachstumsraten erhöht⁵⁶. Auch bei Brustkrebszellen konnte durch Expression von FAP α sowohl *in vitro* ein proliferationssteigernder Effekt als auch im Mausmodell eine gesteigerte Angiogenese im Tumorgewebe gezeigt werden^{57, 58}. Analog konnte auch bei Endothelzellen eine FAP α -Expression, gemeinsam mit einer Reihe weiterer Serin-Proteasen, im Rahmen der Angiogenese dargelegt werden⁵⁹.

1.2.2 Der TGF β -Signalweg im Rahmen der FAP α -Expression

Die TGF β -Superfamilie (Transforming growth factor β) besteht aus einer Reihe strukturverwandter Zytokine, die unter anderem Aktivine, Inhibine und BMPs (Bone morphogenetic proteins) einschließt. In Säugetieren sind drei Isoformen von TGF β , TGF β _{1, -2 & -3}, bekannt, deren Funktionen sich teilweise überlappen⁶⁰⁻⁶³. TGF β wurde schon früh eine profibrotische Rolle zugesagt, da es *in vitro* in Fibroblasten die Expression von Bestandteilen der Extrazellulärmatrix induziert und Proteine, die die Extrazellulärmatrix abbauen, inhibiert^{64, 65}. Auch in der Regulation der Zellproliferation hat TGF β entscheidende Funktionen und kann in Abhängigkeit vom Zelltyp und den Wachstumsbedingungen entweder die Proliferation fördern oder hemmen^{63, 66}.

Der TGF β -Signalweg scheint auch im Herzen nach stattgehabtem Myokardinfarkt oder im Verlauf beim linksventrikulären Remodeling einen zentralen Stellenwert zu haben. Nach abgelaufenem Myokardinfarkt konnte im Tiermodell nach einer Woche eine ge-

steigerte Expression von TGF β im Bereich der Narbe und der Infarkttrandzone nachgewiesen werden^{67, 68}. Somit wird eine mögliche Rolle von TGF β bei den Abläufen in der Heilungsphase eines Infarkts angenommen, die das Rekrutieren von Monozyten und die Bildung von Granulationsgewebe beinhalten. Auch scheint der TGF β -Signalweg zu einer Auflösung des entzündlichen Infiltrates nach Infarkt durch Hemmung proinflammatorischer Zytokine zu führen. Darüber hinaus wird auch ein Beitrag von TGF β zur Regulation der kardialen Fibrose durch Induktion der Proteinsynthese von Extrazellulärbestandteilen und Verhinderung von deren Abbau vermutet⁶⁹.

Neben einer Reihe anderer Proteine, die durch TGF β induziert werden, konnte eine TGF β -abhängige Induktion der FAP α -Expression bereits für embryonale Mausfibroblasten und für Fibroblasten der Leptomeninx untersucht werden^{70, 71}. Auch für humane kardiale Fibroblasten wurde eine Induktion der FAP α -Expression durch Stimulation mit TGF β_1 bereits gezeigt, der Signalweg ist jedoch unklar⁵³.

1.2.3 Struktur von FAP α

FAP α besteht aus 760 Aminosäuren, das vorhergesagte Protein hat einen kleinen N-terminalen zytoplasmatischen Anteil bestehend aus sechs hochkonservierten Aminosäuren, eine 20 Aminosäuren umfassende hydrophobe Transmembranregion und eine große Extrazellulärdomäne^{72, 73}. Die katalytische Region mit der für Serinproteasen typischen katalytischen Triade aus den drei Aminosäuren Serin⁶²⁴, Aspartat⁷⁰² und Histidin⁷³⁴ umfasst die letzten 200 C-terminalen Aminosäuren (Tyr⁵⁶⁰ – Asp⁷⁶⁰) und zeigt mit 68 % Übereinstimmung eine Homologie zur ebenfalls membranassoziierten Aminopeptidase DPP-IV (Dipeptidylpeptidase IV)^{34, 72}. DPP-IV als nächster Verwandter von FAP α wird im Gegensatz zur dessen restriktiver Expression in einer Reihe verschiedener Zellen exprimiert und spielt eine wichtige Rolle unter anderem bei der T-Zell-Costimulation, im Glukose-Metabolismus und in der Prozessierung mehrerer Chemokine, auch wurde eine Rolle im Abbau der Extrazellulärmatrix im Rahmen von Gewebsumbauprozessen wie Fibrosierung oder Tumorinvasion gezeigt^{73, 74}. Interessant ist auch die Diskussion um eine potentielle Rolle von DPP-IV als Tumorsuppressor, angestoßen unter anderem durch die Beobachtung, dass DPP-IV-Serumspiegel sowohl bei Patienten mit kolorektalem Karzinom als auch bei Patienten mit malignem Melanom signifikant erniedrigt waren^{75, 76}. Weiterhin wurde eine Komplexbildung aus FAP und DPP-IV sowohl in Fibroblasten als auch in Endothelzellen beschrieben, die für die Migration im Rahmen der Wundheilung relevant zu sein scheint⁷⁷⁻⁷⁹.

Neben dem membrangebundenen FAP α konnte ebenfalls eine Splice-Variante der FAP α -mRNA in der humanen Melanom-Zelllinie LOX gefunden werden, die ein verkürztes intrazelluläres Protein, das nur die C-terminale katalytische Region beinhaltet, codiert⁸⁰.

1.2.4 Antiplasmin Cleaving Enzyme

Eine im Blut lösliche Form von FAP α konnte sowohl in bovinem Serum als auch in humanem Plasma isoliert werden^{81, 82}. Das einzig bisher identifizierte Substrat der löslichen Form von FAP α , auch als Antiplasmin cleaving enzyme (APCE) bezeichnet, ist α_2 -Antiplasmin (α_2 AP). Das in der Leber synthetisierte α_2 AP ist der Hauptinhibitor von Plasmin, das wiederum eine entscheidende Rolle sowohl in der Fibrinolyse als auch in der Degradierung der Extrazellulärmatrix im Rahmen der Wundheilung und der Angiogenese spielt⁸³⁻⁸⁶. Durch α_2 -AP wird die Fibrinolyse über verschiedene Mechanismen reguliert. Einerseits bildet α_2 -AP mit Plasmin einen stabilen Komplex und hemmt somit dessen Wirkung, andererseits verhindert es auch die Adsorption von Plasminogen an Fibrin und kann weiterhin durch Faktor XIIIa-vermittelte Quervernetzung an Fibrin zur Fibrinstabilisierung beitragen^{87, 88}. Im Einklang mit der Rolle von Plasmin bei Gewebeumbauprozessen konnte auch für α_2 AP gezeigt werden, dass dessen Mangel zu einer beschleunigten Wundheilung und Angiogenese führt⁸⁹. α_2 AP ist ein aus 464 Aminosäuren bestehendes Glykoprotein mit einem N-terminalen Methionin (Met- α_2 AP). APCE katalysiert die N-terminale Abspaltung von 12 Aminosäuren von Met- α_2 AP zur aktivierten Form Asn- α_2 AP, das eine deutlich höhere Verknüpfungsrate zu Fibrin besitzt und dadurch eine stärkere antifibrinolytische Wirkung entfaltet. Die N-terminale Abspaltung hat keinen Einfluss auf die Inhibition von freiem Plasmin^{84, 90}. Die Herkunft von löslichem APCE ist bislang unklar. Der N-Terminus von APCE entspricht der Sequenz von FAP α , beginnend bei Isoleucin an Position 24, was auf eine proteolytische Spaltung des membranständigen FAP α an den letzten beiden Aminosäuren der Transmembrandomäne mit konsekutivem Shedding hindeuten könnte^{81, 84}. Eine Sheddase konnte hierbei allerdings bisher noch nicht identifiziert werden. Alternativ könnte APCE auch durch alternatives Splicing und Translation der FAP α -mRNA entstehen, auch dies konnte bislang nicht gezeigt werden.

1.2.5 Substrate von FAP α

Die dimerisierte Form von FAP α besitzt sowohl Gelatinase- als auch aminoternale Post-Prolyl-Aminopeptidaseaktivität^{32, 35, 38, 39}. Mittels Zymographie konnte gezeigt werden, dass FAP α Gelatin aus denaturiertem Kollagen Typ I sowie denaturiertes Kollagen Typ IV abbaut, andere Substrate wie Fibronectin, Laminin, Fibrin oder Casein konnten jedoch nicht gespalten werden^{33, 39}. In weiteren Studien konnte dargelegt werden, dass weder FAP α noch dessen lösliche Form APCE primär in der Lage sind, natives Kollagen Typ I und Typ III abzubauen. Nach dessen vorherigem Abbau durch die Matrix-Metalloproteinase 1 (MMP-1) konnte jedoch ein sekundärer Abbau durch FAP α oder APCE in kleinere Peptide als beim alleinigen Verdau durch MMP-1 gezeigt werden⁹¹. Diese Daten lassen eine Zusammenarbeit von FAP α mit anderen kollagenspaltenden Proteasen im Abbau von Kollagen Typ I und III im Rahmen des Umbaus der Extrazellulärmatrix annehmen.

Vor Kurzem wurden *in vitro* weitere Substrate von FAP α identifiziert, zu denen neben Neuropeptid Y, Substanz P und Peptid YY auch BNP (Brain Natriuretic Peptide) zählen⁹². Aktives BNP wird vor allem im Herz nach Drucküberlastung synthetisiert und gilt zusammen mit dem N-terminalen Fragment seines Precursor-Hormons (NT pro-BNP) als Biomarker für linksventrikuläre Dysfunktion, insbesondere der Herzinsuffizienz, und dient darüber hinaus als Marker zur Risikostratifizierung bei akutem Koronarsyndrom^{93, 94}. FAP α katalysiert die aminoternale Abspaltung eines Dipeptids von BNP, jedoch ist die Auswirkung des Verlustes der zwei Aminosäuren auf die Rezeptorbindung nicht ausreichend geklärt, sodass keine Aussage über die Aktivität des gespaltenen BNP getroffen werden kann⁹². Die von FAP α katalysierte Spaltung von Neuropeptid Y hingegen, für das bisher bereits unter anderem Effekte auf das Nervensystem, das Endothel, das Immunsystem und das Fettgewebe gezeigt werden konnten^{95, 96}, führt zu einer gesteigerten Affinität für den Y2-Rezeptor, der im Gegensatz zu der durch den Y1-Rezeptor medierte Vasokonstriktion angiogeneffekte ausübt⁹⁵. Auch die sequentielle Spaltung von Substanz P, einem inflammatorischen Hormon, das in verschiedenen Zelllinien eine Proliferation und die Hemmung der Apoptose auslöst, könnte hierbei eine durch FAP α medierte anti-inflammatorische Wirkung haben⁹².

Letztlich bleiben jedoch bis heute die natürlichen Substrate von FAP α sowie die physiologischen und pathologischen Funktionen der von FAP α gespaltenen Peptide weitestgehend unklar und sind daher Gegenstand intensiver Forschung.

1.3 Fragestellung

FAP α war bisher als membranständiges Protein bekannt, das in verschiedenen Geweben im Rahmen des Gewebeumbaus, insbesondere auch in atherosklerotischen Plaques sowie bei kardialen Fibroblasten nach experimentellem Myokardinfarkt, exprimiert wird^{33, 34, 37, 43, 53}. Über die Rolle von FAP α im Zusammenhang mit kardialem Remodeling nach Myokardinfarkt ist jedoch bisher nur wenig bekannt. Auch ist die Funktion der im Blut zirkulierenden löslichen Form von FAP α , APCE, weitestgehend ungeklärt.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte zunächst der Einfluss verschiedener nach Myokardinfarkt exprimierter Zytokine auf die Induktion der FAP α -Expression in humanen kardialen Fibroblasten (HCF) untersucht werden. Weiterhin sollte *in vitro* eine mögliche Abgabe des membranständigen FAP α in Zellkulturüberstände ermittelt werden, um so eine erste Aussage über eine mögliche Herkunft des zirkulierenden APCE treffen zu können. In diesem Kontext sollte ebenfalls ein ELISA-Kit zur Detektion von FAP α in humanem Plasma optimiert und validiert werden, um erstmalig nicht nur physiologische FAP α /APCE-Plasmakonzentrationen einer gesunden Referenzgruppe zu beschreiben, sondern auch einen Zusammenhang der FAP α -Plasmaspiegel zum klinischen Outcome kardiovaskulärer Erkrankungen deutlich zu machen. Im Zuge dessen sollte auch die Eignung von zirkulierendem FAP α als potentiellen Biomarker überprüft werden. Hierfür wurden die FAP α /APCE-Plasmakonzentrationen einer Referenzgruppe mit den Konzentrationen bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom und Koronarer Herzerkrankung verglichen.

2. Materialien und Methoden

2.1 Zellkultur

2.1.1 Kultivierung humaner kardialer Fibroblasten

Für die *in vitro* Versuche wurden adulte humane kardiale Fibroblasten (HCF; 306K-05a Tebu-Bio, Offenbach, Deutschland) verwendet, die bei 37 °C unter 5 %-iger CO₂-Atmosphäre (Heracell 150, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) zur Expansion in Lung/Cardiac Fibroblast Growth Medium (Cell Applications, San Diego, CA, USA) kultiviert wurden. Während der Versuche wurden die Zellen entweder in serumfreiem Medium (Medium SF), bestehend aus DMEM 4,5 g/l Glukose und L-Glutamin (Lonza,

Walkersville, MD USA) mit 10 mM HEPES Puffer (1 M HEPES Buffer, Lonza, Walkersville, MD USA) und 0,2 % BSA (35% Albumin Solution Fraction V from Bovine, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO USA), oder im Nährmedium DMEM 4,5 g/l Glukose und L-Glutamin mit 10 %-igem FBS-Anteil (Fetal Bovine Serum, Lonza, Walkersville, MD USA) inkubiert. Alle Nährstoffmedien waren frei von antibiotischen oder antimykotischen Zusätzen. Ein Mediumwechsel erfolgte alle zwei Tage.

Ab einer Konfluenz von ca. 80% - 90% wurden die Zellen passagiert. Hierfür erfolgte nach einem Waschschrift mit PBS (PAN Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland) die Inkubation der Zellen mit einer 0,25%igen Trypsin/EDTA-Lösung (Biochrom AG, Berlin, Deutschland) für fünf Minuten. Die Ablösung der Zellen wurde mittels Zellkulturmikroskop (Wilovert S, Hund GmbH, Wetzlar, Deutschland) kontrolliert und die Reaktion bei einer Ablösung von mehr als 90% durch Zugabe von Trypsin-Neutralisations-Lösung (Clonetics TNS, Lonza, Walkersville, MD USA) beendet. Die Zelllösung wurde daraufhin bei 400 g und 4 °C für 6 Minuten zentrifugiert (Eppendorf Centrifuge 5810 R, Hamburg, Deutschland). Das erhaltene Zell-Pellet wurde in Zellkulturmedium resuspendiert und auf die Zellkulturflaschen (Cellstar T 75, Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland oder Nunc® 6-well multidish, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) aufgeteilt. Zur weiteren Expansion der Zellen wurde eine Zelldichte von ca. 3500 Zellen/cm² gewählt, für Versuche wurden die Zellen in einer Dichte von ca. 13000 Zellen/cm² ausgesät. In den vorliegenden Versuchen wurden nur Zellen der Passagen zwei bis sechs verwendet, um eventuelle Einflüsse durch eine Überalterung der Kultur gering zu halten.

2.1.2 Lyse der Zellen, Aufbereitung der Zellkulturüberstände für den ELISA

Die Lyse der Zellen erfolgte nach zweimaligem Waschen mit PBS mittels Lysierpuffer (10x Lysis Buffer, Cell Signaling, Danvers, USA) mit 1mM PMSF (Phenylmethylsulfonylflourid, Cell Signaling, Danvers, USA). Pro Well einer 6-Well-Platte wurden 80 µl Lysierpuffer zugegeben, die Zellen mit einem Zellschaber (Cell Scraper, SPL Life Sciences, Korea) abgelöst und in ein Reaktionsgefäß (Eppendorf Safe-Lock microcentrifuge tubes, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) überführt. Nach einer 15-minütigen Inkubation auf Eis erfolgte die Zentrifugation bei 4 °C und 14000 g für 10 Minuten (Hettich Universal 320R, Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen, Deutschland), um die im Überstand gelösten Proteine von zellulärem Debris zu trennen. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei -80 °C gelagert.

Die im ELISA gemessenen Zellkulturüberstände wurden direkt nach Abpipettieren der Zellen ebenfalls bei 4 °C und 14000 g für 10 Minuten zentrifugiert. Nach Abnahme der Überstände erfolgte deren Lagerung bei -80 °C. Alle Überstände stammten von Zellen aus 6-Well-Platten, die in jeweils 2 ml der Medien inkubiert wurden.

2.1.3 Transfektion der HCFs mit siRNA

2.1.3.1 siRNA - Mechanismus

siRNA (small interfering RNA) sind kurze RNA-Moleküle, die als wichtiger Teil des angeborenen Immunsystems als Schutz vor Virusinfektionen über einen sequenzspezifischen posttranslationalen Mechanismus die Genexpression auf Translationsebene hemmen. Durch synthetische, in die Zelle eingebrachte siRNA ist analog eine Reduktion der Expression eines bestimmten Proteins möglich. Hierbei werden die doppelsträngigen siRNAs im Zytoplasma an die Nuklease RISC (RNA-induced silencing complex) angelagert und dort in Einzelstränge gespalten. Der durch die einzelsträngige siRNA aktivierte RISC verwendet diese dann als Vorlage und bindet die zur siRNA komplementäre mRNA. Diese wird daraufhin im Zentrum der siRNA-Bindungsstelle von RISC gespalten und weiter durch zelluläre Nukleasen abgebaut. So wird durch Verminderung funktioneller mRNA eine Reduktion der Proteinexpression erreicht⁹⁷⁻¹⁰⁰.

2.1.3.2 Durchführung der siRNA-Transfektion

Die Transfektion humaner kardialer Fibroblasten mit siRNA erfolgte durch Lipofektion (*Oligofectamine*[™] oder *Lipofectamine*[™] *RNAiMAX*; beide *Invitrogen*, Carlsbad, USA). Hierfür wurden in verschiedenen Versuchen jeweils zwei siRNAs (*Silencer*[®] *Select siRNA*, *Applied Biosystems / Ambion*, Austin, USA) in einer Konzentration von 50 nM verwendet. So wurde die Expression von FAP α (siRNAs s5021 & s5022), von Smad-2 (siRNAs s8397 & s8398), von Smad-3 (siRNAs s8401 & s8402) und von EGR-1 (siRNAs s4538 & s4539) durch Transfektion mit der jeweiligen siRNA reduziert. Als Negativ-Kontrolle diente die *Silencer*[®] *Select Negative Control siRNA* (4390843 & 4390843, *Applied Biosystems / Ambion*, Austin, USA).

In den vorliegenden Versuchen wurde die Methode der reversen Transfektion angewandt, bei der die Transfektion bei gelösten Zellen durchgeführt wird. Hierfür erfolgte zunächst die Herstellung des siRNA-Mixes. Bei der Transfektion mit *Oligofectamine*[™] wurde der siRNA nach Verdünnung mit *Opti-MEM*[®] (*Gibco by Life Technologies*,

Grand Island, NY und Schottland, UK) *Oligofectamine*TM zugegeben und 20 Minuten inkubiert, um eine Komplexbildung der siRNA mit dem Transfektionsreagenz zu ermöglichen. Nach Verdünnung des siRNA-Mixes auf das Gesamtvolumen mit auf 37 °C erwärmtem *Opti-MEM*® erfolgte die Zugabe der zuvor geernteten Zellen und das Aus säen in 6-Well-Platten. Vier Stunden nach der Transfektion mit *Oligofectamine*TM wurde den Zellen pro Well 0,5 ml des Nährmediums DMEM mit 10% FBS zugegeben, am nächsten Tag erfolgte ein vollständiger Mediumwechsel auf DMEM mit 10% FBS. Die Transfektion mit *Lipofectamine*TM *RNAiMAX* erfolgte bis auf die Inkubation in *Opti-MEM*®, die hier ausgelassen werden konnte, analog. Die Zellen wurden direkt mit dem Nährmedium DMEM mit 10% FBS ausgesät, auch war kein Mediumswechsel am nächsten Tag erforderlich. Da sich im Verlauf der Erstellung dieser Arbeit herausstellte, dass die Transfektion mit *Lipofectamine*TM *RNAiMAX* zu einer im Vergleich zu *Oligofectamine*TM erhöhten Downregulation der Proteinexpression führte, wurde dieses für alle kommenden Versuche verwendet.

2.1.4 Zytokin-Stimulation und Inhibition von Signalwegen

Zur Untersuchung des Effekts verschiedener Zytokine auf die FAP α -Expression in humanen kardialen Fibroblasten (HCF) wurden die Zellen in unterschiedlichen Versuchen mit diversen Zytokinen inkubiert. Die Inkubation der HCF mit den Zytokinen fand generell nach vorheriger Aktivierung durch 24-stündige Kultivierung der Zellen in serumfreiem Medium (Medium SF) vor Versuchsbeginn statt; alle Zytokine wurden ebenfalls in Medium SF gelöst.

Der TGF β ₁-Signalweg wurde untersucht, indem die HCFs sowohl mit verschiedenen Konzentrationen von TGF β ₁ (*R&D Systems*, Minneapolis, USA) als auch über unterschiedlich lange Zeitintervalle inkubiert wurden. Weiterhin wurde der TGF β ₁-Signalweg durch den selektiven Inhibitor der TGF β ₁-Rezeptorkinasen (ALKs, Activin-like Kinases) SB431542 (*Sigma-Aldrich*, St. Louis, USA) blockiert, indem dieser dem Medium SF in einer Konzentration von 10 μ M zugegeben wurde. Darüber hinaus sollte eine mögliche Rolle des MAP-Kinase-Weges auf die FAP α -Expression untersucht werden, da bereits gezeigt wurde, dass dieser über ein Adapterprotein durch den aktivierten TGF β -Rezeptor aktiviert wird^{101, 102}. Durch selektive Inhibition der MEK1/2 nach Zugabe einer 10 μ M Lösung des Inhibitors U0126 (*U0126 Monoethanolate*, *Sigma-Aldrich*, St. Louis, USA) sollte so der Signalweg unterbrochen werden.

Weiterhin wurde der Effekt von TNF α (*R&D Systems*, Minneapolis, USA) sowie CTGF (*Recombinant Human CTGF, Preprotech*, Rocky Hill, USA) auf die FAP α -Konzentration in HCFs untersucht.

2.2 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Lowry

Die Bestimmung der Proteinkonzentration der Zellysate erfolgte mittels *des DC Protein Assay Kit I* (*Bio-RAD Laboratories*, Hercules, USA) nach der Methode nach Lowry. Zur Kalkulation der Proteinkonzentration der Proben wurde für jedes Assay eine Standardkurve vorbereitet, indem ein Standard mit einer Proteinkonzentration von 1,5 mg/ml 4-fach seriell verdünnt wurde. Anschließend wurden je 5 μ l des Zellysats bzw. des Proteinstandards mit 25 μ l *Reagent A'* und 200 μ l *Reagent B* auf einer Mikrotiterplatte (*DY990, R&D Systems*, Minneapolis, USA) für fünfzehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach erfolgten die Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 655 nm im Microplate-Reader (*Modell 550, Bio-RAD Laboratories*, Hercules, USA) und die Berechnung der Proteinkonzentration anhand der Standardkurve.

2.3 Western-Blot-Verfahren

Die Western-Blot-Technik ist ein Verfahren zum Nachweis und zur relativen Quantifizierung von Proteinen. Hierbei erfolgt zunächst die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen aufgrund ihres Molekulargewichts in einem SDS-Polyacrylamidgel, in einem zweiten Schritt werden die Proteine durch ‚Blotten‘ auf eine Membran übertragen. Der Nachweis des gesuchten Proteins erfolgt durch eine spezifische Antikörperfärbung.

Zunächst wurden Trenn- und Sammelgel mit einem Acrylamidgehalt von 10 bzw. 5 % hergestellt. Für das Trenngel wurden 3,325 ml eines 30%-igen Acrylamid-Mix (*Rotiphorese Gel 30, Carl Roth GmbH und Co. KG*, Karlsruhe, Deutschland) zu 4,175 ml H₂O und 2,5 ml 4x Tris-HCl / SDS (pH 8,8) gegeben. Anschließend erfolgte die Zugabe von 33,3 μ l einer 10%-igen Ammoniumpersulfatlösung (APS, *Sigma-Aldrich*, Saint Louis, USA) sowie 6,68 μ l *TEMED Electrophoresis Reagent* (*Sigma-Aldrich*, Saint Louis, USA). Das Sammelgel wurde mit 815 μ l des 30%-igen Acrylamid-Mix mit 3,813 ml H₂O, 1,564 ml des 4-fach Tris-HCl / SDS-Puffers sowie 31,3 μ l 10% APS und 6,25 μ l TEMED hergestellt.

Die zu messenden Proben wurden vorbereitet, indem 20 μ l der Proben (Proteinkonzentration 0,5 μ g/ μ l) mit 10 μ l Proben-Puffer (*Blue Loading Buffer, Cell Signaling Techno-*

logy, Danvers, USA), bestehend aus DTT (Dithiothreitol) und SDS (Sodiumdodecylsulfat), vermischt und anschließend bei 107 °C für fünf Minuten denaturiert wurden (*Mastercycler gradient, Eppendorf, Hamburg, Deutschland*). Die Auftrennung im Gel erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 15 mA und einer Spannung von 70 V. Als Skala wurde die *Precision Plus Protein Standards (Bio-RAD Laboratories, Hercules, USA)* verwendet.

Anschließend wurde der Transfer der im Gel aufgetrennten Proteine auf eine PVDF-Membran (*Immunblot PVDF-Membran, Bio-RAD Laboratories, Hercules, USA*) unter Kühlung für zwei Stunden mit einer konstanten Spannung von 80 V durchgeführt. Danach erfolgte eine einstündige Blockierung der Membran in 40 ml TBST (Tris-buffered Saline Tween, *Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA*) mit 2 g Blocking Agent (*Amersham ECL Blocking Agent, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK*). Zur Immundetektion einzelner Proteine wurde im Anschluss die Inkubation der Membran mit dem Primärantikörper über Nacht bei Raumtemperatur durchgeführt. Am Folgetag wurde die Membran nach dreimaligem Waschen mit TBST mit einem HRP (Horseradish peroxidase)-gekoppelten Sekundärantikörper für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Der Nachweis der Proteinbanden erfolgte durch Belichtung eines Autoradiographiefilms (*Amersham Hyperfilm ECL, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK*) mit Hilfe einer Chemilumineszenz-Reaktion (*Amersham ECL Western Blotting Analysis System, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK*). Analog wurde auf den Membranen das Kontrollenzym GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) nachgewiesen.

Folgende Primärantikörper zum Nachweis von FAP α , EGR-1, Smad-2, Phospho-Smad-2, Smad-3, Phospho-Smad-3 sowie GAPDH wurden verwendet:

- Monoklonaler Maus Antikörper gegen Fibroblast Activation Protein α (ab54651 *Abcam, Cambridge, UK*)
- Polyklonaler Kaninchen Antikörper gegen EGR-1 ((588): sc-110, *Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA*)
- Monoklonaler Kaninchen Antikörper gegen Smad-2 (*Smad2 (D43B4) XP™ Rabbit mAb, #5339, Cell Signaling Technology, Danvers, USA*)
- Monoklonaler Kaninchen Antikörper gegen Phospho-Smad-2 (*Phospho-Smad2 (Ser465/467) (138D4) Rabbit mAb, #3108, Cell Signaling Technology, Danvers, USA*)

- Monoklonaler Kaninchen Antikörper gegen Smad-3 (*Smad3 (C67H9) Rabbit mAb*, #9523, *Cell Signaling Technology*, Danvers, USA)
- Monoklonaler Kaninchen Antikörper gegen Phospho-Smad-3 (*Phospho-Smad3 (Ser423/425) (C25A9) Rabbit mAb*, #9520, *Cell Signaling Technology*, Danvers, USA)
- Monoklonaler Maus Antikörper gegen GAPDH (ab8245, *Abcam*, Cambridge, UK).

Folgende Sekundärantikörper wurden verwendet:

- Antikörper gegen Schaf-IgG (*donkey anti-sheep IgG-HRP*, SC-2916, *Santa Cruz Biotechnology*, Santa Cruz, USA)
- Antikörper gegen Kaninchen-IgG (*Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody #7074*, *Cell Signaling Technology*, Danvers, USA)
- Antikörper gegen Maus-IgG (*Anti-mouse IgG, HRP-linked Antibody #7076*, *Cell Signaling Technology*, Danvers, USA).

2.4 FAP α -ELISA

Das ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent assay) ist ein Immunassay-Verfahren, das vor allem zum Nachweis von Proteinen verwendet wird. Es basiert auf Antigen-Antikörper-Wechselwirkungen und weist diese Komplexe mittels einer enzymatischen Farbreaktion nach. In vorliegender Arbeit wurde das kommerziell erhältliche *humanFAP α Development Kit (R&D Systems, Minneapolis, USA)* und ausschließlich die dazu von *R&D Systems* empfohlenen Reagenzien verwendet. Die korrekte Messung der Konzentration von humanem FAP α in Zellkulturüberständen wurde bereits vom Hersteller validiert und eine Kreuzreaktion gegen humanes DPP-IV sowie DPP-VI in einer Konzentration von 50 ng/ml ausgeschlossen.

2.4.1 Durchführung des ELISA

Bei dem hier durchgeführten Assay handelt es sich um einen Sandwich-ELISA (Abbildung 1). Hierfür erfolgte zunächst über Nacht bei Raumtemperatur eine Beschichtung der 96-Well-Mikrotiterplatte (DY990, *R&D Systems*, Minneapolis, USA) mit 100 μ l der Erstantikörperlösung (Capture Antibody mouse anti-human FAP, *Part 842997*, *R&D Systems*, Minneapolis, USA) pro Well. Die Mikrotiterplatte wurde hierbei mit einer Klebefolie (*Costar 6524 Sealing Tapes, Corning Life Sciences*, NY, USA) versiegelt. Die vom Hersteller vorgesehene Antikörperkonzentration von 1 μ g/ml in PBS

(Phosphate buffered saline, 2,7 mM Kaliumchlorid, 138 mM Natriumchlorid, pH 7.4, *Sigma-Aldrich*, St. Louis, USA) wurde zur Messung von Zellkulturüberständen und Zelllysaten angewendet, bei Messung von humanem Plasma wurde die Konzentration auf 2 µg/ml in PBS erhöht. Am folgenden Tag wurde die Mikrotiterplatte drei Mal mit PBS mit 0,05 % Tween-20 (Waschpuffer WA126, *R&D Systems*, Minneapolis, USA) mit je 400 µl pro Well gewaschen. Die Blockierung erfolgte mit je 300 µl einer 1% BSA-Lösung in PBS (Reagent Diluent DY995, *R&D Systems*, Minneapolis, USA) für 1,5 Stunden bei Raumtemperatur. Gleichzeitig wurden die Plasmaproben 100-fach in *Reagent Diluent* verdünnt. Zellkulturüberstände wurden unverdünnt aufgetragen, Zelllysate hingegen in 400-facher Verdünnung. Für die Standard-Proben wurde eine Standard-Konzentration von 4000 pg/ml mit rekombinantem humanem FAP α (rhFAP, 3715-SE-010, *R&D Systems*, Minneapolis, USA) in Reagent Diluent hergestellt und diese siebenfach seriell verdünnt. Weiterhin wurde als Leerwert bei Zellkulturproben immer das Lösungsmedium der Proben - bei Zellkulturüberständen das jeweilige reine Zellkulturmedium und bei Zelllysaten der in der gleichen Konzentration verdünnte Lysierpuffer - aufgetragen. Nach einem weiteren Waschschrift wurden jeweils 100 µl sowohl der Standards als auch der verdünnten Proben in die Wells gegeben, mit einer Klebefolie versehen und für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Alle Proben inklusive der Standards wurden als Duplikate aufgetragen. Nach einem erneuten Waschschrift wurde die Platte mit je 100 µl einer Zweitantikörperlösung, (*Detection Antibody biotinylated sheep anti-human FAP polyclonal*, Part 842998, *R&D Systems*, Minneapolis, USA) der Konzentration 200 ng/ml in Reagent Diluent für 2 Stunden bei Raumtemperatur mit Klebefolie versehen inkubiert. Durch eine Biotinylierung des F_c-Fragment des Zweitantikörpers wurde ein späterer Nachweis des gebundenen Antikörpers ermöglicht. Nach einem erneuten Waschschrift wurde die an Streptavidin gekoppelten HR-Peroxidase (Horseradish Peroxidase, Meerrettichperoxidase; *Streptavidin-HRP Part 890803*, *R&D Systems*, Minneapolis, USA) in einer 200-fachen Verdünnung in *Reagent Diluent* für 20 Minuten bei Raumtemperatur unter Ausschluss von Licht zugegeben. Aufgrund der starken nicht-kovalenten Bindung von Streptavidin an Biotin erfolgte hierbei die Bindung des Zweitantikörpers an den Streptavidin-HRP-Komplex. Nach einem weiteren Waschschrift wurde jedes Well mit 100 µl der Substrat Lösung A und B (H₂O₂ + Tetramethylbenzidin; DY999, *R&D Systems*, Minneapolis, USA) für 20 Minuten unter Lichtausschluss inkubiert. Die so durch die Peroxidase katalysierte blaue Farb-reaktion durch die Substrat Lösung wurde nach Ablauf der Inkubationszeit durch Zuga-

be von 50 µl Stopp Lösung (H₂SO₄, DY994, R&D Systems, Minneapolis, USA) pro Well mit einem Farbumschlag ins Gelbe beendet, sodass die Extinktion photometrisch bei 450 nm Wellenlänge und einer Wellenlängen-Korrektur von 570 nm gemessen werden konnte.

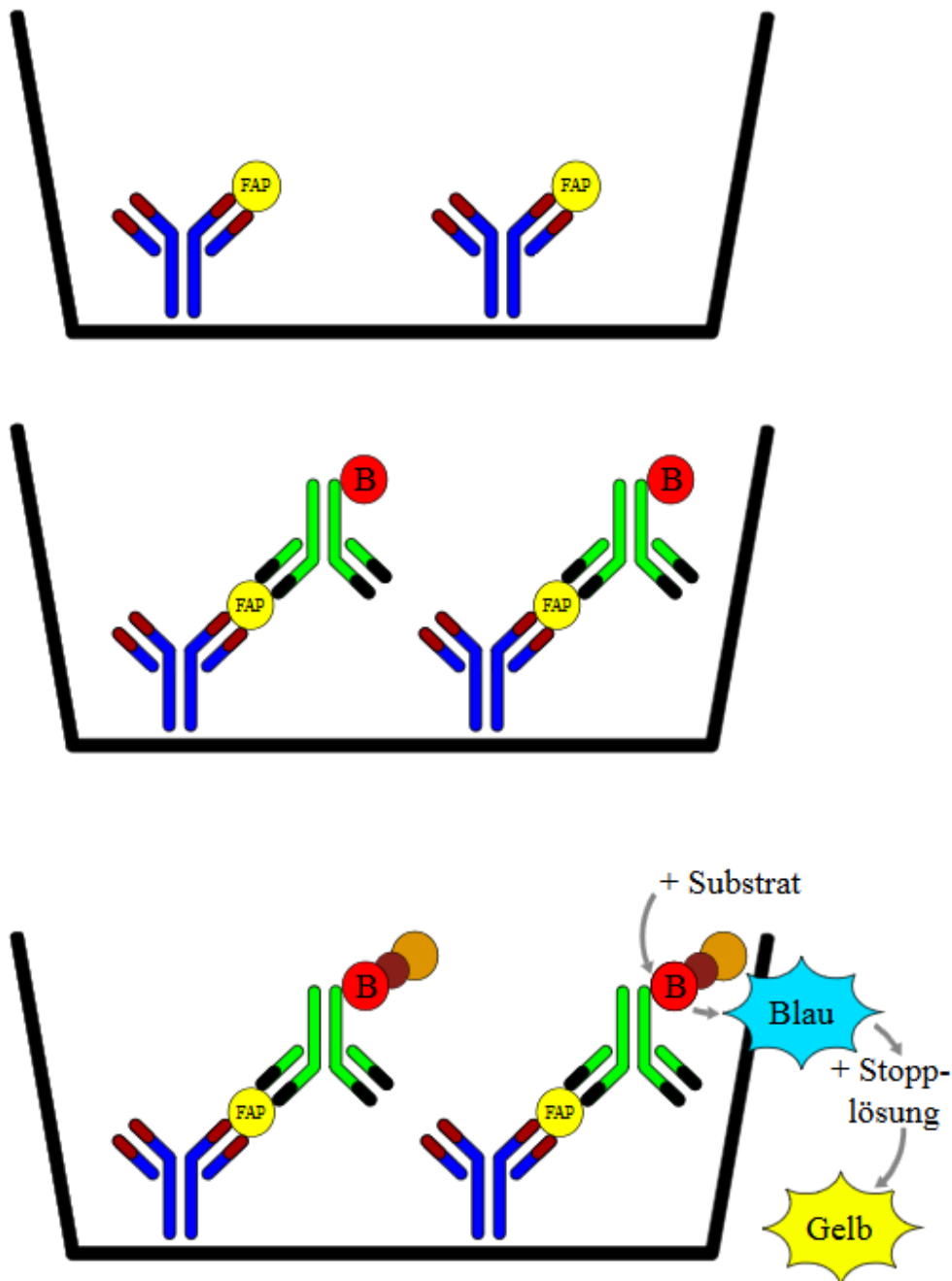


Abbildung 1: Schematische Darstellung des FAP α -ELISA

Oben: Der auf der Platte gebundene Erstantikörper bindet das in einer Probe befindliche FAP α (gelb). **Mitte:** Der biotinylierte Zweitantikörper bindet ebenfalls an das bereits fixierte FAP α . **Unten:** Nach Zugabe von an Streptavidin gekoppelter Horseradish-Peroxidase und dessen nonkovalenter Bindung an Biotin erfolgt über zwei Schritte eine durch die Peroxidase katalysierte Farbreaktion, die eine photometrische Detektion in Abhängigkeit der Konzentration von FAP α in der Probe möglich macht.

2.4.2 Auswertung des ELISA

Bei jedem Assay wurde eine mindestens 7-Punkt-Standard-Kurve mit Hilfe einer 4-Parameter-logistischen Kurvenanpassung erstellt (Abbildung 2), sodass für jede gemessene optische Dichte innerhalb der Nachweisgrenzen eine FAP α -Konzentration entsprechend der Formel $f(x) = \frac{A1 - A2}{1 + \left(\frac{x}{x_0}\right)^p} + A2$ errechnet werden konnte.

Hierbei entsprach x_0 dem Wendepunkt der Kurve, A_1 der minimalen und A_2 der maximalen Asymptote sowie p der Steigung. Durch Auflösen nach x , das der gesuchten

FAP α -Konzentration entsprach, ergab sich die Gleichung $x = x_0 * \left(\frac{A1 - f(x)}{f(x) - A2}\right)^{\frac{1}{p}}$.

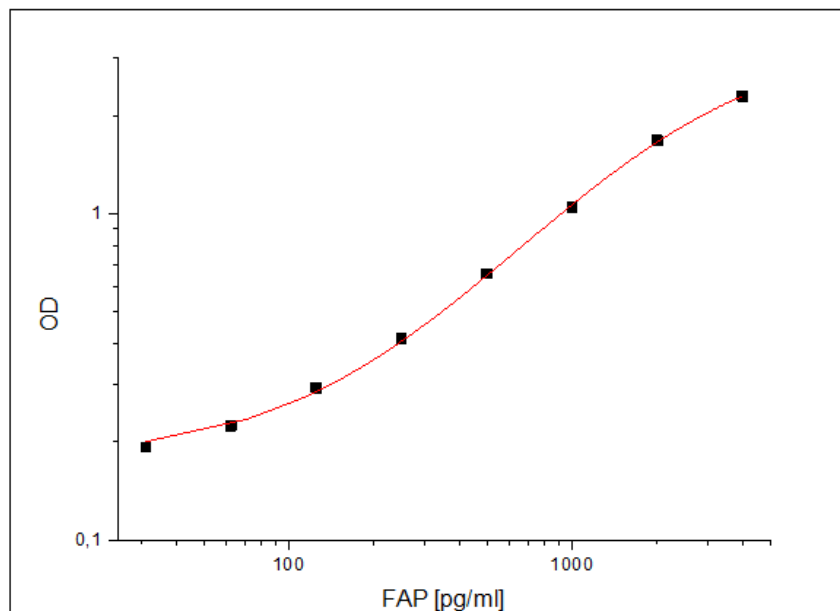


Abbildung 2: Exemplarische Darstellung einer Standardkurve

4-Parameter logistische Standardkurve einer 8-fachen seriellen Verdünnung der höchsten FAP α -Konzentration mit 4000 pg/ml.

2.4.3 Validierung des ELISA für nicht-validierte Proben

Da das *hFAP ELISA Development Kit* vom Hersteller nur für Zellkulturüberstände validiert war, musste das Assay sowohl für die Messung von humanem Plasma als auch für Lysate aus der Zellkultur etabliert und die Ergebnisse validiert werden.

Die Validierung des ELISA geschah in mehreren Schritten nach dem von *R&D Systems* vorgeschlagenen Protokoll zur Validierung von Proben in Immunoassays. Zunächst wurde den Proben eine definierte Menge an rekombinantem FAP α hinzugegeben und

die gemessenen Werte mit denen der reinen Probe verglichen, um die Wiederfindungsrate dieses „Spikes“ zu bestimmen. Danach wurde die Wiederfindungsrate seriell verdünnter Proben in Abhängigkeit vom Erwartungswert ausgedrückt. Hierfür wurden Verdünnungen der Proben verwendet, die eine Detektion innerhalb der Nachweisgrenzen ermöglichten (Verdünnung des Plasmas 1:100, Verdünnung der Zelllysate 1:400, jeweils in Reagent Diluent).

Die zu validierenden Proben wurden zunächst mit einer definierten Menge einer FAP α -Stock-Lösung „gespikt“, sodass die Endkonzentration der „gespikten“ Probe bei der ursprünglichen Konzentration plus 2000 pg/ml FAP α lag. Die „gespikten“ Proben wurden weiterhin seriell 2-, 4-, 8- und 16-fach verdünnt. Auch wurde ein „Kontroll-Spike“ durch Zugabe der gleichen Menge der rekombinanten FAP α -Stocklösung zu *Reagent Diluent* hergestellt, dessen Konzentration 2000 pg/ml betragen sollte. Alle Messungen wurden in Doppelbestimmung durchgeführt.

Die Berechnung der Wiederfindungsrate des „Spikes“ erfolgte anhand der Formel $Wiederfindung (\%) = \frac{\text{gespikte Probe} - \text{nicht gespikte Probe}}{\text{FAP-Kontroll-Spike}} \times 100$, wobei die Rate in einem Bereich von 80-120 % liegen sollte.

Weiterhin wurde die Parallelität der verdünnten Proben zur Standardkurve durch die Formel $Wiederfindung (\%) = \frac{\text{beobachteter Wert Verdünnung } 1:x}{\text{gespikte nichtvalidierte Probe } \div x} \times 100$ berechnet. Auch hier sollte die Wiederfindung in einem Bereich von 80-120 % liegen.

In einem zweiten Validierungsschritt wurde den reinen Proben vor der Verdünnung eine definierte Menge an rekombinanten FAP zugegeben und die Proben erst anschließend gemäß Vorschrift verdünnt. Auch hier wurde überprüft, ob der zu erwartende Wert mit dem tatsächlichen Wert in einem Rahmen von 80 – 120 % übereinstimmte.

2.4.4 Qualitätskontrolle und Präanalytik bei der Messung der FAP α -Plasmaspiegel

2.4.4.1 Inter- und Intra-Assay-Variabilität

Die Inter-Assay-Variabilität ist definiert als die Schwankung der mittels ELISA in unterschiedlichen Assays gemessenen FAP α -Konzentrationen einer Probe; die Intra-Assay-Variabilität gibt die Schwankung der FAP α -Werte einer Probe bei mehrmaliger Messung innerhalb eines Assays an.

Zur Messung beider Parameter wurden zunächst 4 gepoolte Plasma-Proben durch Vermischung des Plasmas von jeweils 4 Probanden hergestellt und in Aliquots bei -80°C eingefroren. Diese gepoolten Plasma-Proben wurden in allen ELISAs zur Messung der FAP α -Plasmaspiegel in Doppelbestimmung zur Analyse der Inter-Assay-Variabilität gemessen. Zur Bestimmung der Intra-Assay-Variabilität erfolgte die sechsfache Doppelmessung der gepoolten Plasma-Proben in zwei Assays an demselben Tag.

2.4.4.2 Einfluss der Lagerungsbedingungen der Blutproben auf die FAP α -Konzentration

Um auszuschließen, dass FAP α durch schlechte Lagerungsbedingungen oder mehrmaliges Auftauen und Einfrieren in Bruchstücke zerfiel, die mit dem ELISA nicht mehr nachzuweisen waren, wurde die Stabilität von FAP α unter diesen Bedingungen gemessen. Hierfür wurden die Plasma Proben von 4 Probanden entweder direkt bei -80°C eingefroren oder nach zwei oder drei Einfrier-Auftau-Zyklen von -80°C auf Raumtemperatur mittels ELISA gemessen. Weiterhin wurden die FAP α -Konzentrationen im Plasma von 10 Probanden sowohl direkt als auch nach ein- und dreitägiger Lagerung bei 4°C eingefroren und anschließend bestimmt, sowie die Plasma-Proben von 9 Probanden, die entweder direkt nach der Abnahme oder nach 24-stündiger Lagerung bei Raumtemperatur zunächst bei -80°C eingefroren und anschließend nach erneutem Auftauen gemessen wurden.

2.5 Humane Blutproben und Studienkollektiv

2.5.1 Probenaufbereitung

Die Gewinnung von Plasma- bzw. Serumproben erfolgte durch Abnahme eines EDTA- sowie eines Serum-Gel-Röhrchens bei den Probanden. Die Proben wurden im Anschluss an die Blutabnahme bei 2500 g für 10 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert und das Serum bzw. Plasma in Nunc-Röhrchen (*Nunc® CryoTubes 1,8 ml, Sigma-Aldrich*, St. Louis, USA) bei -80°C eingefroren.

2.5.2 Probenkollektiv

Alle Probanden der Studie erklärten schriftlich ihr Einverständnis. Die Durchführung der Studie erfolgte nach der Zustimmung durch die Ethikkommission der Medizinischen Hochschule Hannover in Konformität mit der Deklaration von Helsinki. Die Erhebung der Daten erfolgte in enger Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Wollert von

der Medizinischen Hochschule Hannover, wobei sich vorliegende Arbeit auf die Validierung und Messung der FAP α -Konzentrationen des Kollektivs konzentrierte.

2.5.2.1 Proben zur ELISA-Validierung

Zur Validierung des ELISAs für FAP α im Plasma wurden zunächst bei 20 gesunden Medizinstudenten und deren Verwandten (11 Männer, 9 Frauen) im Alter von 23 bis 86 Jahren Serum- und Plasma-Proben entnommen. Weiterhin wurde Blut von 11 herzinsuffizienten Patienten (Alter 22-84 Jahre; 7 Männer, 4 Frauen), sowie von 6 Patienten mit KHK (Alter 45-82 Jahre; 4 Männer, 2 Frauen) gesammelt.

2.5.2.2 Blutspender-Kontrollgruppe

Als Kontrollgruppe für die Messung der FAP α -Konzentration im Plasma dienten 101 Freiwillige, die im August 2011 am Institut für Transfusionsmedizin der Medizinischen Hochschule Hannover Blut gespendet hatten. Einschlusskriterium für die hier vorliegende Studie war neben der Erfüllung aller Gesundheitskriterien des Instituts für Transfusionsmedizin zum Blutspenden ein Alter über 50 Jahre. Die Gesundheitskriterien umfassten einen Ausschluss von Probanden mit akuten Krankheitszuständen, Fieber, chronischem Drogen- oder Alkoholabusus, vorhandenen neurologischen oder kardiovaskulären Erkrankungen, Krebsleiden, bekannten Infektionen oder möglichem Kontakt zur infizierten Personen sowie kürzlich vorangegangenen Impfungen oder chirurgischen Eingriffen. Die Zusammensetzung der Kontrollgruppe wurde so gewählt, dass das Geschlechterverhältnis und das ungefähre Durchschnittsalter dem der Studiengruppe gleichen. Die Kontrollgruppe bestand daher aus 76 Männern zwischen 51 und 71 Jahren (Alters-Median 57 Jahre) und 25 Frauen zwischen 51 und 68 Jahren (Alters-Median 59 Jahre).

2.5.2.3 ACS-Patientengruppe

Für die Studiengruppe wurden Plasmaproben von 407 Patienten mit akuten Koronarsyndrom (ACS) verwendet, die an der Medizinischen Hochschule Hannover zwischen September 2007 und September 2009 behandelt wurden. Das Alter der Patienten lag zwischen 36 und 94 Jahren (Alters-Median 66 Jahre). Die Proben wurden bei stationärer Aufnahme abgenommen und nach Aufbereitung des Plasmas wie oben beschrieben bei -70°C gelagert. Einschlusskriterium war mindestens eine 15-minütige Angina pectoris-Episode in Ruhe. 97 dieser Patienten (24%) erhielten die Diagnose einen instabilen An-

gina pectoris, bei 125 (31%) Patienten wurde ein Non-ST-Hebungs-Infarkt (NSTEMI) und bei 185 (45%) ein ST-Hebungs-Infarkt (STEMI) diagnostiziert. Ein myokardialer Infarkt wurde mittels Elektrokardiogramm und wiederholten Messungen des kardialen Troponin T (cTnT) als Marker der Myokardnekrose festgestellt, wobei cTnT-Werte über 0,03 mg/l als erhöht erachtet wurden. Sowohl das Auftreten neuer Myokardinfarkte als auch eine Todesfolge wurde in einem einjährigen Zeitintervall ab stationärer Aufnahme bei allen 407 Patienten der Studiengruppe durch telefonische Befragung dokumentiert.

2.5.2.4 Patienten mit stabiler KHK

Analog zu den Plasma-Proben der ACS-Patienten wurden bei 25 Patienten mit stabiler KHK Plasma-Proben gewonnen. Einschlusskriterium war mindestens eine angiographisch gesicherte Koronarstenose von mehr als 50%.

2.5.3 Laborchemie der Blutproben der ACS-Patienten

Die Messung des kardialen Troponin T (cTnT) wurde im Labor von Prof. Wollert mittels eines Assays der 4. Generation von *Roche Diagnostics* auf einer *Elecsys 2010* Systemplattform (*Roche Diagnostics*, Basel, Schweiz) durchgeführt. Weiterhin wurde NT-proBNP und hochsensitives Troponin T (hsTnT) auf einem *Cobas e411 System* (*Roche Diagnostics*, Basel, Schweiz) gemessen. Das C-reaktive Protein (CRP) wurde mittels eines turbidimetrischen Immunoassay (*Hitachi 917*; *Roche Diagnostics*, Basel, Schweiz) bestimmt, wobei Proben mit einer CRP-Konzentration >20 mg/l erneut mit einem *Roche/Hitachi Modular System* (*Roche Diagnostics*, Basel, Schweiz) überprüft wurden. Die geschätzte glomeruläre Filtrationsrate (eGFR) wurde mit der Vier-Variablen-MDRD-Formel (Modification of Diet in Renal Disease) berechnet¹⁰³.

2.6 Statistische Analyse

2.6.1 FAP α in Zelllysaten und Zellkulturüberständen

Die Daten wurden, sofern nicht anders gekennzeichnet, als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben. Die statistische Auswertung wurde durchgeführt durch das Programm *OriginPro 8.6G* (*OriginLab*, Northampton, USA). Zunächst wurde der Shapiro-Wilk-Test zur Testung auf Normalverteilung der Daten angewandt. Danach wurde mittels der einseitigen Varianzanalyse (ANOVA) zum Vergleich der Varianz von mehr als zwei Gruppen oder des t-Tests zum Vergleich der Mittelwerte zweier Gruppen bestimmt, ob

ein Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen bestand. Ergebnisse mit einem p-Wert $< 0,05$ wurden als signifikant erachtet.

2.6.2 FAP α in humanem Plasma

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Wollert an der Medizinischen Hochschule Hannover. Kontinuierliche Variablen wurden ebenfalls durch Angabe des Mittelwertes \pm Standardabweichung oder des Medians und der 25. und 75. Perzentile dargestellt. Kategorische Variablen wurden mit dem Chi-Quadrat-Test verglichen und als Häufigkeiten in Prozentsätzen ausgedrückt. Die Assay-Ungenauigkeit wurde durch den Variationskoeffizient charakterisiert, der der relativen Standardabweichung entspricht. Zur Feststellung von Unterschieden zwischen den Medianen zweier Gruppen wurde der Wilcoxon-Mann-Whitney-Test angewandt. Lineare Regressionsanalysen wurden durchgeführt zur Identifikation von mit FAP α assoziierten Variablen, multiple lineare Regressionsanalysen dagegen zur Detektion von unabhängig mit FAP α assoziierten Variablen. Zur Feststellung der Normalverteilung der Variablen wurde der Kolmogorov-Smirnov Test verwendet. Nicht-normalverteilte Variablen wurden für die Regressionsanalyse zum natürlichen Logarithmus überführt. Mit Hilfe der Kaplan-Meier-Methode wurde das Patienten-Überleben in Abhängigkeit zur FAP α -Konzentration dargestellt sowie mit dem log-rank Test statistisch ausgewertet. Weiterhin wurde eine einfache Cox Regressionsanalyse durchgeführt, um die Abhängigkeit der FAP α -Konzentration zur Mortalität zu bestimmen sowie eine multiple Cox Regressionsanalyse für eine Anpassung von Alter und Geschlecht. Die Kruskal-Wallis Analyse mit dem Dunn's Post-Hoc Test wurde für den Vergleich von mehr als 2 Gruppen angewendet. Alle Analysen wurden durchgeführt mit *StatView 5.0.1* (SAS Institute, Cary, USA), *MedCalc 11.2.1.0* (MedCalc Software, Belgien), *SPSS Statistics 19.0* (IBM, Armonk, USA) und *GraphPad Prism 5.0* (GraphPad Software, La Jolla, USA).

3. Ergebnisse

3.1 Zelluläres und lösliches FAP bei HCF

Im Hinblick auf die Entdeckung von löslichem, im Blut zirkulierendem FAP α sollte im Rahmen dieser Dissertation zunächst die Abgabe des von humanen kardialen Fibroblasten membranexprimiertem FAP α in den Zellkulturüberstand *in vitro* untersucht werden.

Weiterhin wurden Signalwege untersucht, die an der Regulation der FAP α -Expression beteiligt sein könnten.

3.1.1 FAP α -Expression und zeitabhängige Abgabe in den Überstand durch TGF β ₁

Eine Induktion von FAP α durch TGF β wurde bereits sowohl für kardiale Fibroblasten als auch einige andere Zelllinien gezeigt^{53, 70, 71}. In vorliegender Arbeit wurde deshalb untersucht, ob eine gesteigerte Expression von FAP α durch TGF β ₁-Induktion auch eine Konzentrationszunahme im Zellkulturüberstand bewirkt.

Nach Stimulation der HCF für 48 Stunden mit aufsteigenden TGF β ₁-Konzentrationen wurde die FAP α -Konzentration im Überstand und im Zelllysat mittels ELISA bestimmt (Abbildung 3).

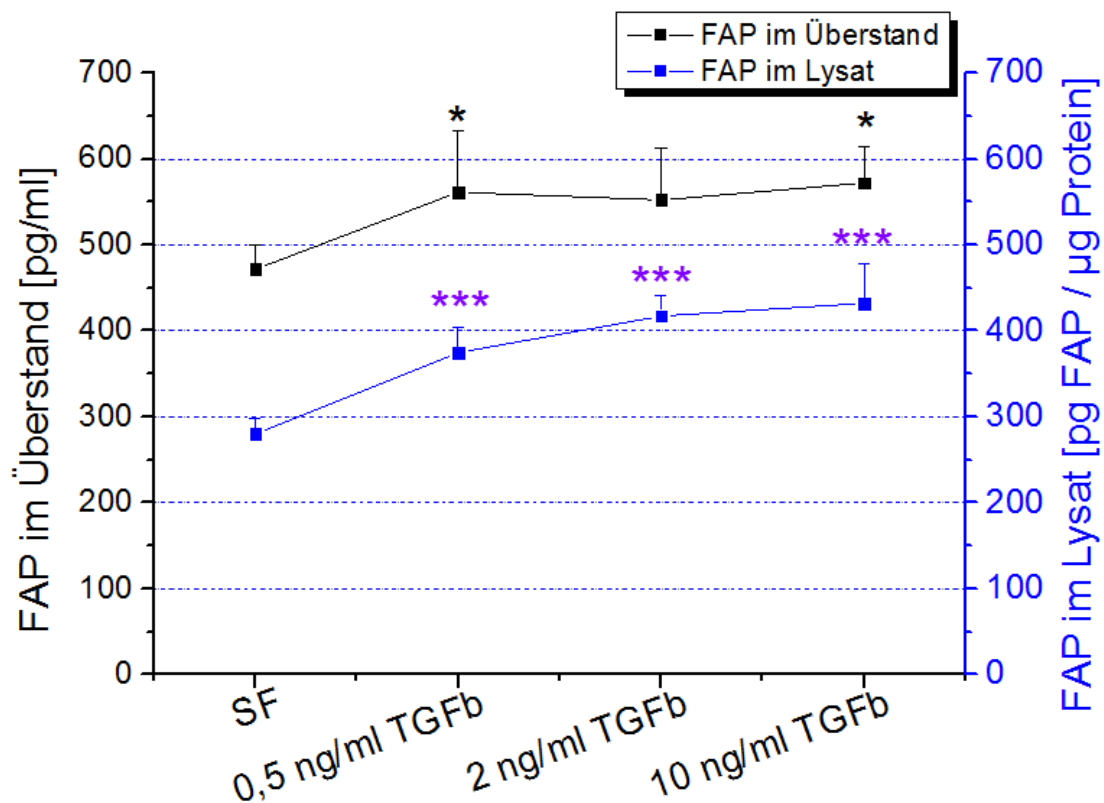


Abbildung 3: FAP α im Zellkulturüberstand und Lysat nach konzentrationsabhängiger TGF β -Stimulation

Im ELISA ermittelte FAP α -Konzentration im Zellkulturüberstand von HCF (schwarze Linie) und im Zelllysat der korrespondierenden Zellen (blaue Linie, normiert auf Gesamtproteingehalt). Es zeigt sich im Lysat ein signifikanter Anstieg der FAP α -Konzentration nach TGF β -Stimulation im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle (n = 6, *** p < 0,001) und analog ein Anstieg der FAP α -Konzentrationen im Überstand der Zellen (n = 6, * p < 0,05). Beide Anstiege verlaufen annähernd parallel und verdeutlichen den Zusammenhang der membrangebundenen FAP α -Menge mit der FAP α -Konzentration des Überstands. Messung mittels ELISA, Darstellung des zellulären FAP α nach Normierung auf den Gesamtproteingehalt.

Die Zelllysate wurden für eine bessere Vergleichbarkeit bei unterschiedlichem Zellgehalt auf den Gesamtproteingehalt der Proben normiert. Im Lysat zeigte sich eine TGFβ₁-abhängige signifikante Konzentrationssteigerung von FAPα im Vergleich zum Kontrollmedium schon bei Werten ab 0,5 ng/ml TGFβ₁ (n = 6, p < 0,001). Die FAPα-Konzentrationen in den Zellkulturüberständen korrespondierten weitestgehend mit der Konzentration der Lysate und zeigten ebenfalls eine signifikante Steigerung der FAPα-Expression bei einer TGFβ₁-Konzentration von 0,5 ng/ml und 10 ng/ml (n = 6, p < 0,05).

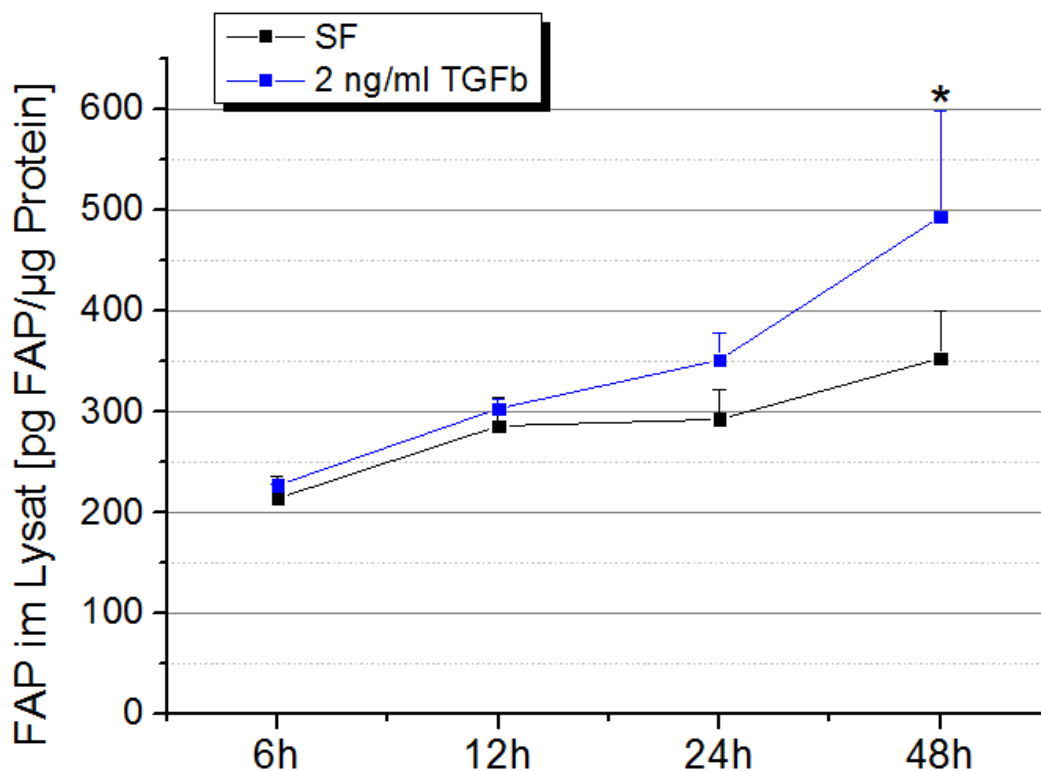


Abbildung 4: FAPα-Konzentration im HCF-Lysat nach zeitabhängiger TGFβ-Stimulation
Messung der FAPα-Konzentration der Probe (normiert auf Gesamtproteingehalt) mittels ELISA nach Stimulation der HCF mit 2 ng/ml TGFβ₁ für 6, 12, 24 und 48 Stunden und anschließender Lyse. Nach 48-stündiger Stimulation zeigt sich eine im Vergleich zur Kontrolle signifikante Steigerung der FAPα-Konzentration im Zelllysate (n = 3, * p < 0,05). Messung mittels ELISA, Darstellung nach Normierung auf den Gesamtproteingehalt.

In einem weiteren Versuch wurde die zeitabhängige FAPα-Expression in Abhängigkeit von TGFβ₁ im Zellkulturüberstand und im HCF-Lysat untersucht. Hier zeigte sich sowohl in den Zelllysate-Proben (Abbildung 4) als auch im Überstand (Abbildung 5) eine signifikante Steigerung der FAPα-Expression nach 48-stündiger Inkubation mit 2 ng/ml TGFβ₁ im Vergleich zur Inkubation in Medium SF für 48 Stunden (je n = 3, p < 0,05). Darüber hinaus ließ sich sowohl im Lysate der Zellen als auch in deren Überstand eine Zunahme der FAPα-Konzentration im Zeitverlauf feststellen, die keiner linearen Dyna-

mik folgte. Aufgrund des begrenzten Beobachtungszeitraumes zwischen den Wechseln des Kulturmediums mit maximal 48 Stunden war eine genauere Untersuchung der Dynamik der FAP α -Freisetzung nicht möglich.

Zusammenfassend kann in der vorliegenden Arbeit die bereits vorbeschriebene Induktion der FAP α -Expression durch TGF β_1 bestätigt werden. Auch konnte gezeigt werden, dass eine gesteigerte zelluläre FAP α -Konzentration zu einer Konzentrationszunahme von FAP α im Überstand führt.

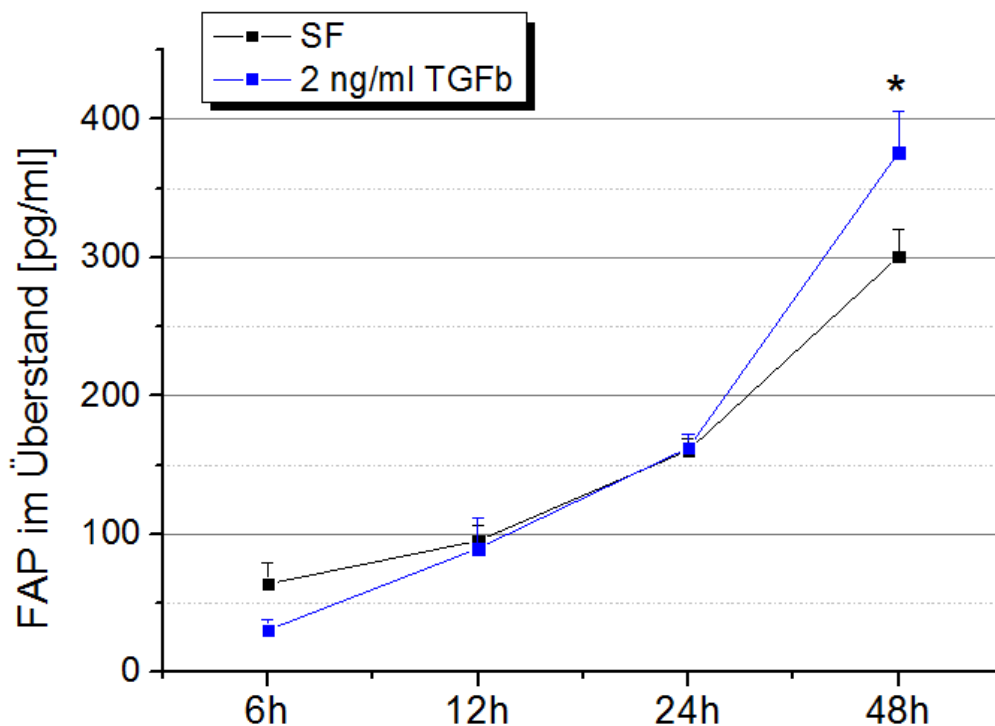


Abbildung 5: FAP α -Konzentration in den Zellkulturüberständen nach zeitabhängiger TGF β -Stimulation

Messung der FAP α -Konzentration in den Zellkulturüberständen der HCF, die für 6, 12, 24 oder 48 Stunden mit 2 ng/ml TGF β_1 inkubiert wurden. Analog zu den Zelllysaten (Abbildung 4) zeigt sich eine im Vergleich zur Kontrolle signifikante Steigerung der FAP α -Konzentration nach 48-stündiger TGF β -Stimulation (n = 3, * p < 0,05). Messung mittels ELISA.

3.1.2 Transfektion von HCF mit FAP α siRNA

Um die zellgebundene und lösliche FAP α -Konzentration in HCF, bei denen die Expression von FAP α vermindert wurde, im Vergleich zu unbeeinflussten Zellen zu bestimmen, wurden HCF mit FAP α -siRNA oder Negativkontroll-siRNA transfiziert und sowohl die Zellkulturüberstände als auch die Lysate der Zellen 48 Stunden nach erfolgter Transfektion mittels ELISA gemessen. Die Inkubation der Zellen erfolgte für 48 Stun-

den in DMEM mit 0,2% BSA, anschließend wurden die Zellen lysiert und die FAP α -Konzentrationen der Zellkulturüberstände sowie der Lysate gemessen.

Es zeigte sich bei der Messung der FAP α -Konzentrationen der lysierten Zellen als auch bei deren Überständen eine signifikante Verminderung der FAP α -Konzentration nach Transfektion mit FAP α -siRNA im Vergleich zur Kontrollgruppe (Lysate: n = 3, p < 0,001; Überstände: n = 6, p < 0,001; Abbildung 6). Eine Reduktion des zellulären FAP α führt also ebenfalls zur Reduktion des löslichen Proteins.

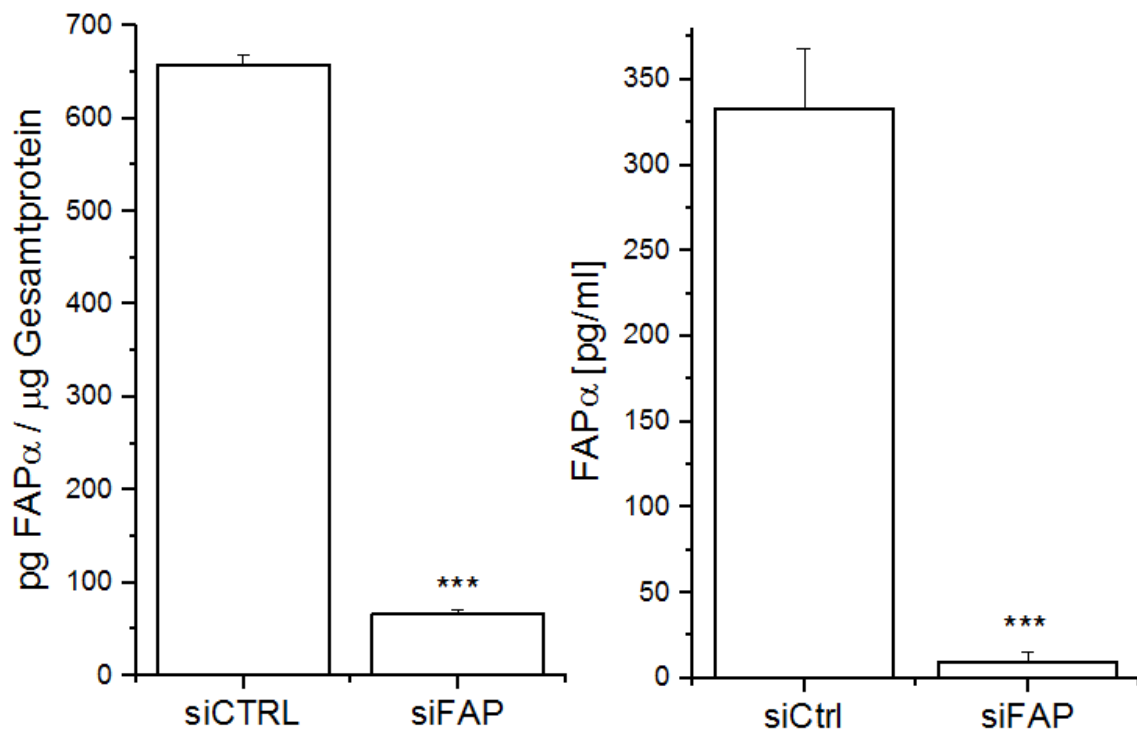


Abbildung 6: Reduktion der FAP α -Konzentration im Lysat und Überstand nach siFAP-Transfektion

Signifikante Reduktion der FAP α -Konzentration im Zelllysat und im Zellkulturüberstand nach Transfektion mit siFAP im Vergleich zur Kontrollgruppe 48 Stunden nach Transfektion. Messung mittels ELISA. **Links:** FAP α im Zelllysat, Darstellung mittels Normierung auf die Gesamtproteinkonzentration (n = 3). **Rechts:** FAP α im Zellkulturüberstand (n = 6). *** p < 0,001.

Die Testung der Zelllysate im Western Blot mit dem FAP α -Antikörper ab54651 (*Abcam*) bestätigte die Ergebnisse (Abbildung 7). Der Antikörper wurde bereits zuvor hinsichtlich der Spezifität für FAP α validiert⁵³. FAP α zeigt eine spezifische Bande von 90 kDa (von *Abcam* vorhergesagtes Molekulargewicht 88 kDa). Auffällig ist weiterhin eine zweite Bande in den Kontrollgruppen bei ca. 27 kDa. Eine weitere starke Bande bei ca. 110 kDa entspricht DPP-IV, das eine 52%-ige Sequenzhomologie zu FAP α aufweist; die antikörperbindende Region am C-terminalen Ende von FAP α (AS 525-625) zeigt im Alignment mit DPP-IV sogar eine 62%-ige Sequenzübereinstimmung.

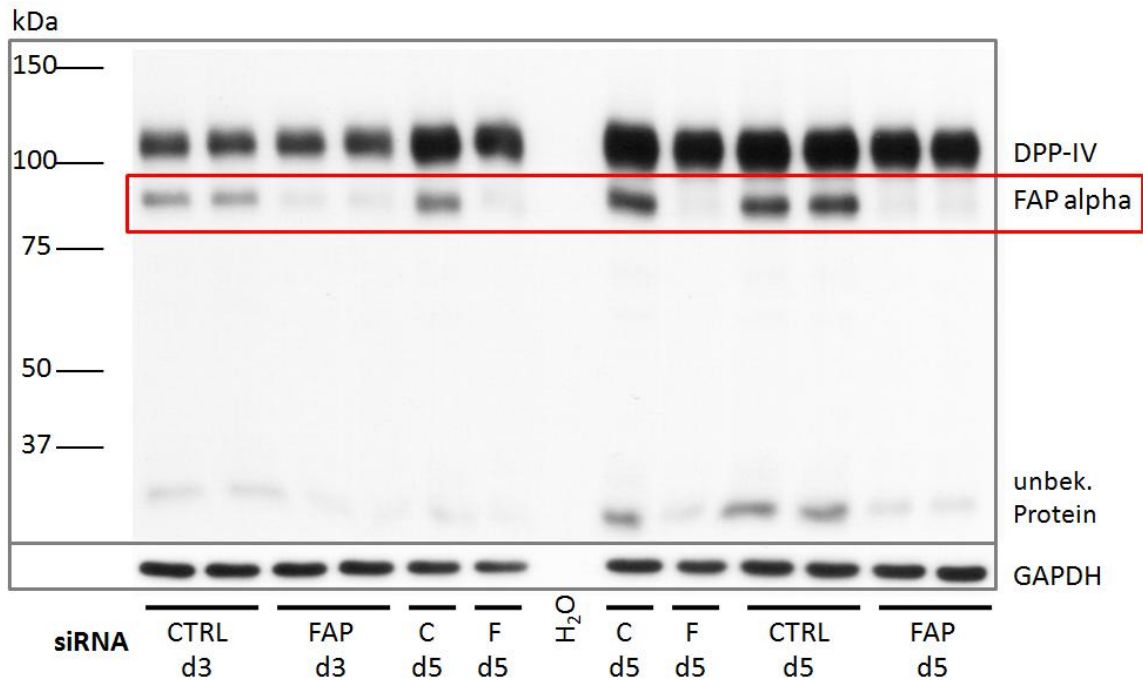


Abbildung 7: Western Blot der HCF-Lysate nach siRNA-Transfektion

Detektion von FAP α (88 kDa) der HCF-Lysate nach siRNA-mediertem FAP α -Knockdown zu zwei unterschiedlichen Zeitpunkten. Bei den mit FAP α siRNA transfizierten Zellen ist nur eine deutlich geringere FAP α -Menge sichtbar (roter Kasten). Neben FAP α (88 kDa) wird auch DPP-IV (110 kDa) und ein unbekanntes Protein (27 kDa) detektiert. C: CTRL, F:FAP, d3: Tag 3, d5: Tag 5.

3.2 Der Signalweg zur Expression von FAP α

3.2.1 Rolle von EGR-1

In HOS-Zellen konnte bereits gezeigt werden, dass EGR-1 die FAP α -Expression durch Bindung an dessen Promoter reguliert¹⁰⁴. Zur Untersuchung der Abhängigkeit der FAP α -Expression von EGR-1 in HCF wurden diese mittels EGR-1 siRNA bzw. Kontroll-siRNA transfiziert. Nach der Transfektion erfolgte eine 48-stündige Inkubation der Zellen in Medium SF mit oder ohne 2 ng/ml TGF β ₁. Der Knockdown wurde mittels EGR-1 Western Blot der Zelllysate verifiziert (Abbildung 8). Die Analyse der FAP α -Konzentration erfolgte mittels ELISA und FAP α Western Blot. Im ELISA der HCF-Lysate zeigten sich neben einer signifikanten TGF β ₁-Aktivierung mit Steigerung der FAP α -Expression in beiden Gruppen keine Unterschiede im FAP α -Gehalt der Lysate zwischen den mit EGR-1 siRNA transfizierten Zellen und den Kontrollen (Abbildung 9, $p < 0,05$; $n = 4$ für TGF β ₁-Stimulation, $n = 2$ für Medium SF). Ein FAP α Western Blot derselben Proben lieferte ein analoges Ergebnis (Abbildung 10).

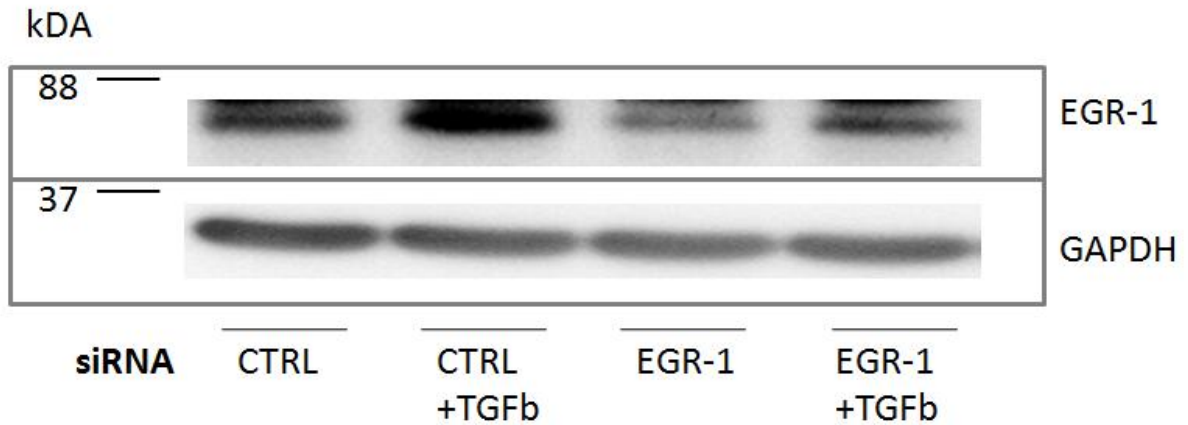


Abbildung 8: Western Blot der mit siEGR-1 transfizierten HCF

Die Zellen wurden mit der jeweiligen siRNA (Negativkontroll-siRNA = CTRL; siEGR-1 = EGR-1) transfiziert und anschließend für 60 Minuten mit 2ng/ml TGFβ oder in Medium SF inkubiert. Bei beiden Proben ist ein leichter Anstieg der Menge von EGR-1 unter Stimulation mit TGFβ feststellbar, die EGR-1-Konzentration zeigt sich jedoch in der mit siEGR-1 transfizierten Zellen geringer als in der Kontrollgruppe.

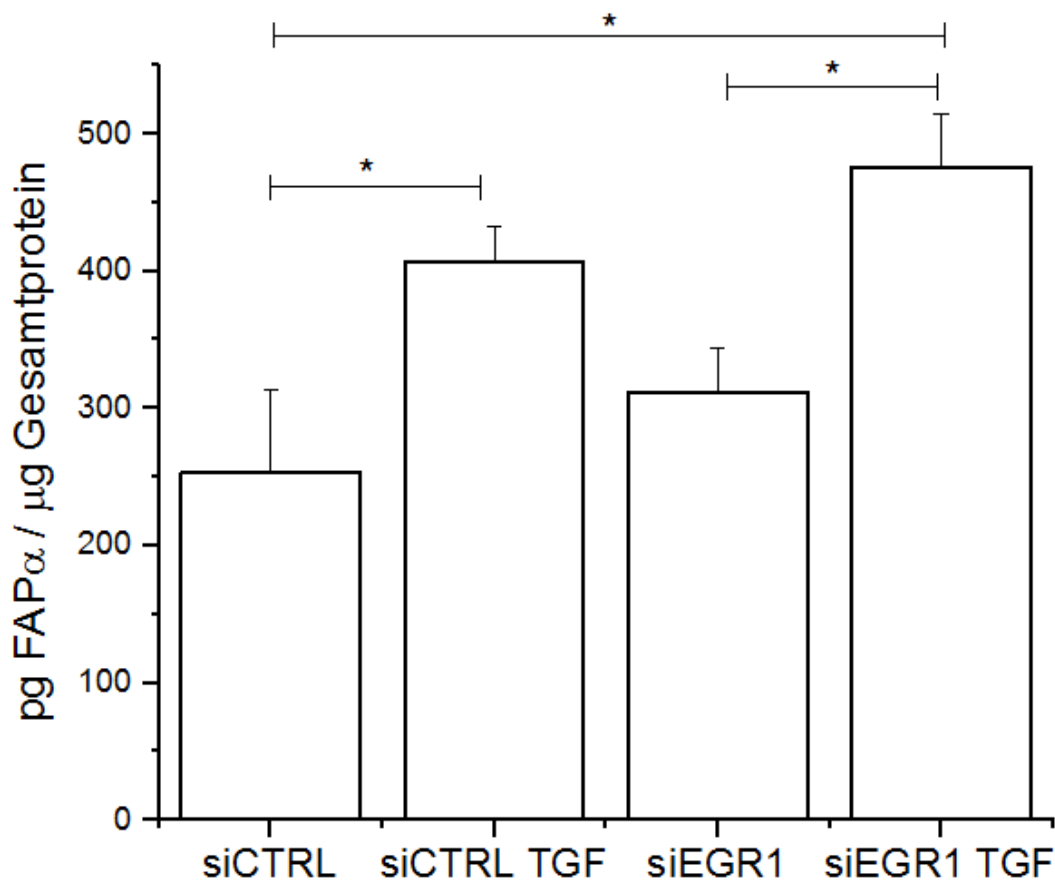


Abbildung 9: FAPα-Konzentration der HCF-Lysate nach EGR-1-Knockdown

Zwischen der Kontrollgruppe und der mit siRNA gegen EGR-1 behandelten Gruppe ist kein Unterschied erkennbar, der Effekt durch TGFβ (2 ng/ml TGFβ₁ für 48 Stunden) ist in beiden Gruppen erhalten. Messung mittels ELISA, Darstellung der Ergebnisse durch Normierung auf Gesamtproteingehalt der Proben (n = 4 für TGFβ-Stimulation, n = 2 für Kontrolle; * p < 0,05)

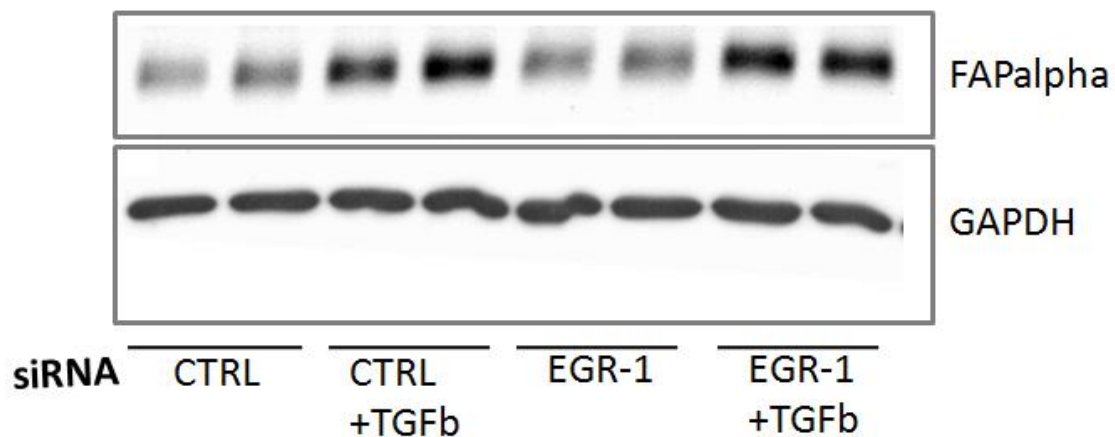


Abbildung 10: FAP α Western Blot der Proben vom EGR-1 Knockdown

Detektion von FAP α in HCF-Lysaten nach Transfektion mit EGR-1 siRNA mit und ohne TGF β . Es ist eine deutliche Induktion von FAP α durch TGF β ₁ feststellbar, jedoch besteht kein Unterschied zwischen der mit EGR-1 siRNA transfizierten Zellen und der Kontrollgruppe.

3.2.2 CTGF und TNF α

Auch sollten weitere Zytokine wie CTGF (Connective Tissue Growth Factor) und TNF α (Tumor Necrosis Factor α), die nach Myokardinfarkt vermehrt exprimiert werden, auf eine potentielle Induktion der FAP α -Expression untersucht werden. So wurden HCF mit aufsteigenden Konzentrationen von CTGF oder 10 ng/ml TGF β ₁ als Positivkontrolle in Medium SF für 48 Stunden inkubiert. Die Proben wurden hinsichtlich ihres FAP α -Gehalts mittels ELISA untersucht. Hier zeigte sich keine Änderung der FAP α -Konzentration in den mit CTGF behandelten Proben, die FAP α -Konzentration nach TGF β ₁-Stimulation war jedoch erneut signifikant gesteigert ($p < 0,001$). Auch zeigte sich in der mit 100 ng/ml CTGF + 10 ng/ml TGF β ₁ behandelten Gruppe nicht nur eine signifikante Steigerung der FAP α -Konzentration im Vergleich zur Kontrollgruppe ($p < 0,001$), sondern auch eine Tendenz zu höheren FAP α Konzentrationen als nach alleiniger TGF β ₁-Stimulation (Abbildung 11; $n = 4$).

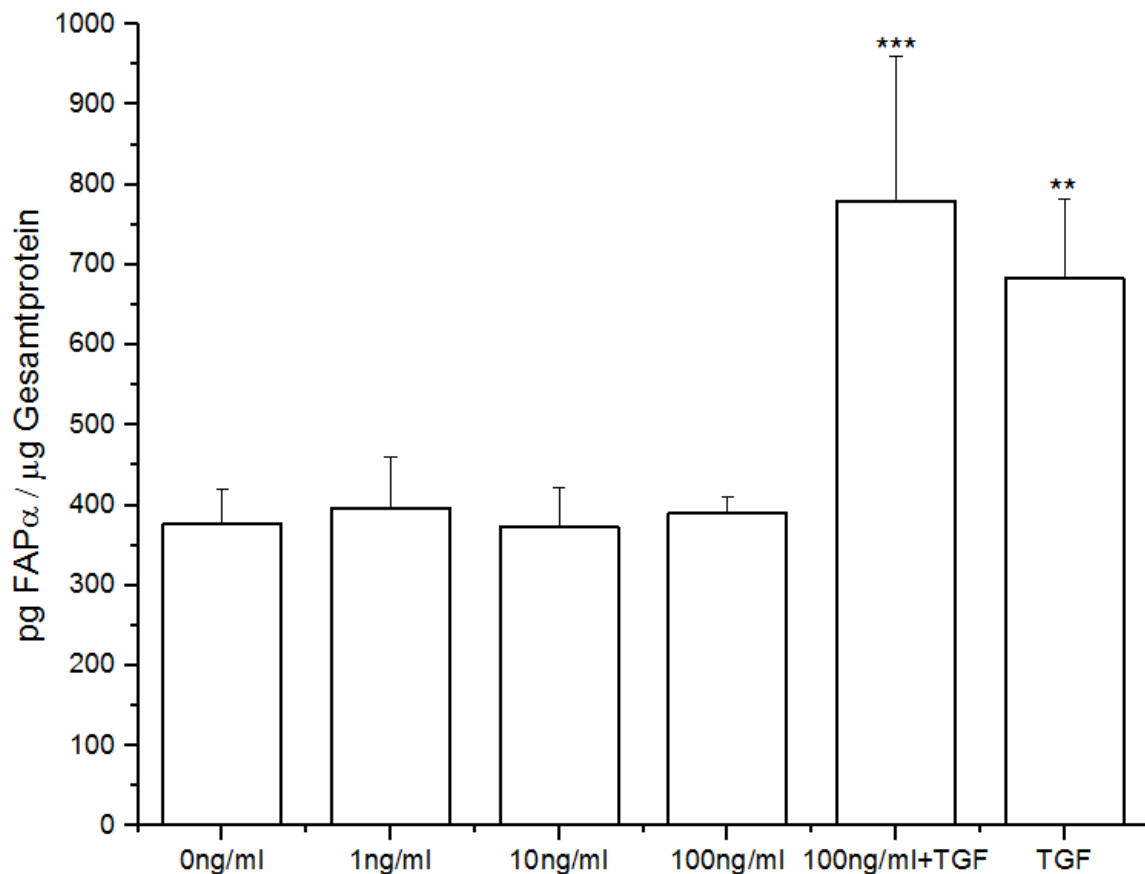


Abbildung 11: CTGF-Stimulation hat keinen Einfluss auf die FAP α -Konzentration

FAP α -Konzentrationen nach 48-stündiger CTGF-Stimulation im Vergleich zur TGF β ₁-Stimulation mit 10ng/ml TGF β ₁. Es zeigt sich keine Änderung der FAP α -Konzentration durch unterschiedliche CTGF-Konzentrationen. Messung mittels ELISA, Darstellung der Ergebnisse durch Normierung auf Gesamtproteingehalt der Proben (n = 4; **p < 0,01, ***p < 0,001, im Vergleich zu nur mit Medium SF inkubierten Kontrolle).

Weiterhin wurden HCFs für 48h mit unterschiedlichen Konzentrationen von rekombinantem TNF α behandelt und dessen Einfluss auf die Bildung von FAP α untersucht. Als Positivkontrolle diente wieder die Stimulation mit 2 ng/ml TGF β ₁. Auch hier zeigte sich im FAP α -ELISA lediglich ein signifikanter Anstieg der FAP α -Konzentrationen im Vergleich zum Kontrollmedium in der Positivkontrolle sowie in der mit TGF β ₁ (p < 0,05) und TNF α behandelten Gruppe (p < 0,01; n = 4). Unter Stimulation mit 1 ng/ml TNF α schien ein leichter Anstieg der FAP α -Konzentration erreicht, höhere Werte resultierten in einem Abfall des FAP α -Gehalts in den Zellen (Abbildung 12).

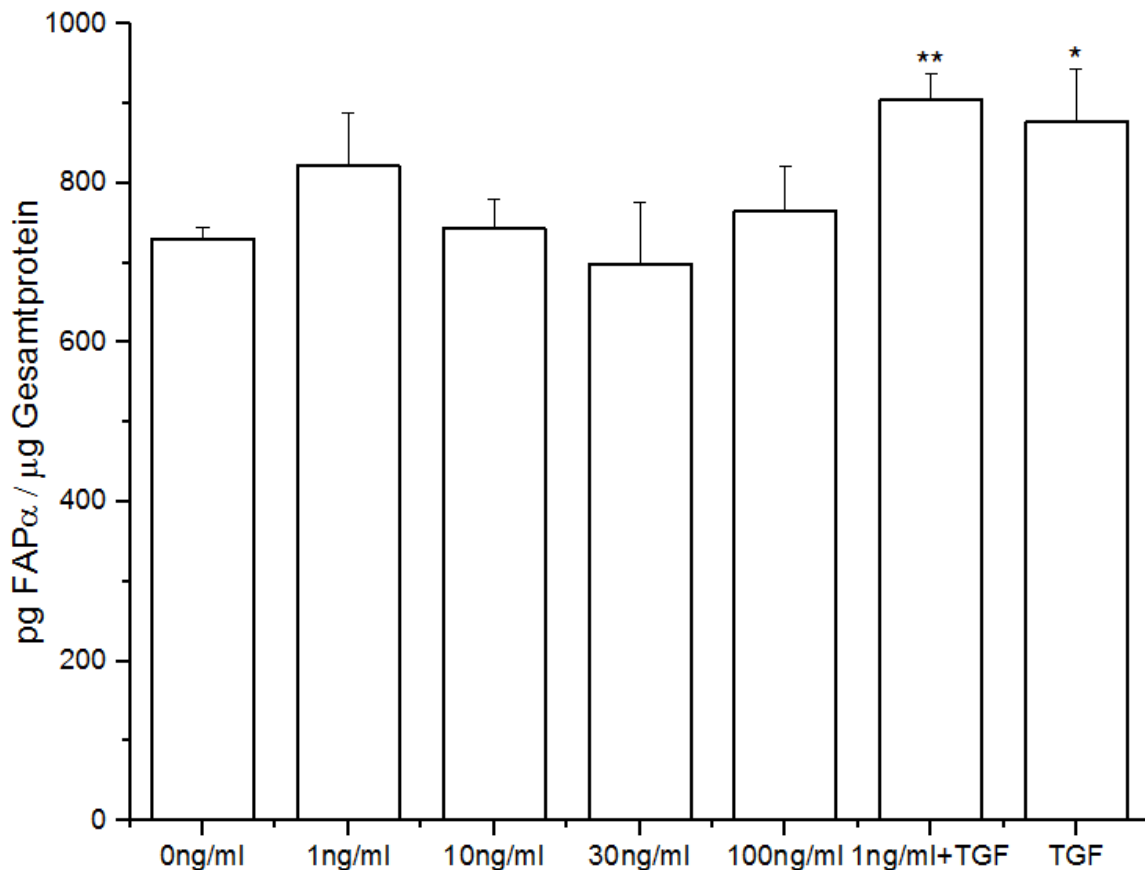


Abbildung 12: TNF α hat keinen Einfluss auf die FAP α -Expression in HCF

FAP α -Konzentrationen nach 48-stündiger TNF α -Stimulation in unterschiedlichen Konzentrationen im Vergleich zur TGF β ₁-Stimulation mit 2ng/ml TGF β ₁. Es zeigt sich keine Änderung der FAP α -Konzentration durch unterschiedliche Konzentrationen an TNF α . Eine Induktion durch TGF β ₁ ist weiterhin erhalten. Messung mittels ELISA, Darstellung der Ergebnisse durch Normierung auf Gesamtproteingehalt der Proben (n = 4; * p < 0,05, **p < 0,01 im Vergleich zur nur mit Medium SF inkubierten Kontrolle).

3.2.3 Der TGF β ₁-Signalweg zur Induktion von FAP α

3.2.3.1 Der nicht-kanonische TGF β -Signalweg

Um den Einfluss des TGF β ₁-Signalweges auf die FAP α -Expression weiter aufzuschlüsseln, wurden die Effekte eines Inhibitors des TGF β -Signalwegs sowie eines Inhibitors des MAPK-Signalwegs (Mitogen activated Protein Kinase) auf die FAP α -Konzentration der Zellen untersucht. SB431542 hemmt selektiv die Kinaseeigenschaften der ALK-Rezeptoren, wobei ALK-5 dem TGF β -Rezeptor1 entspricht. Durch eine Hemmung des TGF β -Rezeptors sollte also der Signalweg für TGF β ₁ unterbrochen werden. Weiterhin sollte der Einfluss des MAPK-Signalwegs auf die Expression von FAP α durch dessen Blockade mittels des selektiven MEK-1/-2 Inhibitors U0126. Die HCFs wurden für 48 Stunden in Medium SF bzw in SF mit 2 ng/ml TGF β ₁ und SB431542 bzw. U0126 in einer Konzentration von jeweils 10 μ M inkubiert. Die FAP α -Konzentration des Zelly-

sats wurde daraufhin mittels ELISA untersucht. Es zeigte sich neben einer signifikanten FAP α -Konzentrationssteigerung durch TGF β_1 im Vergleich zum Kontrollmedium ($p < 0,001$) eine deutliche Inhibition der TGF β_1 -Stimulation durch SB431542, die sich in einer signifikant verminderten FAP α -Konzentration im Vergleich zur allein mit TGF β_1 stimulierten Gruppe ($p < 0,001$) darstellte. Eine alleinige Hemmung des TGF β_1 /ERK-Signalwegs zeigte keine signifikante Änderung der FAP α -Konzentration ($n = 15$; Abbildung 13).

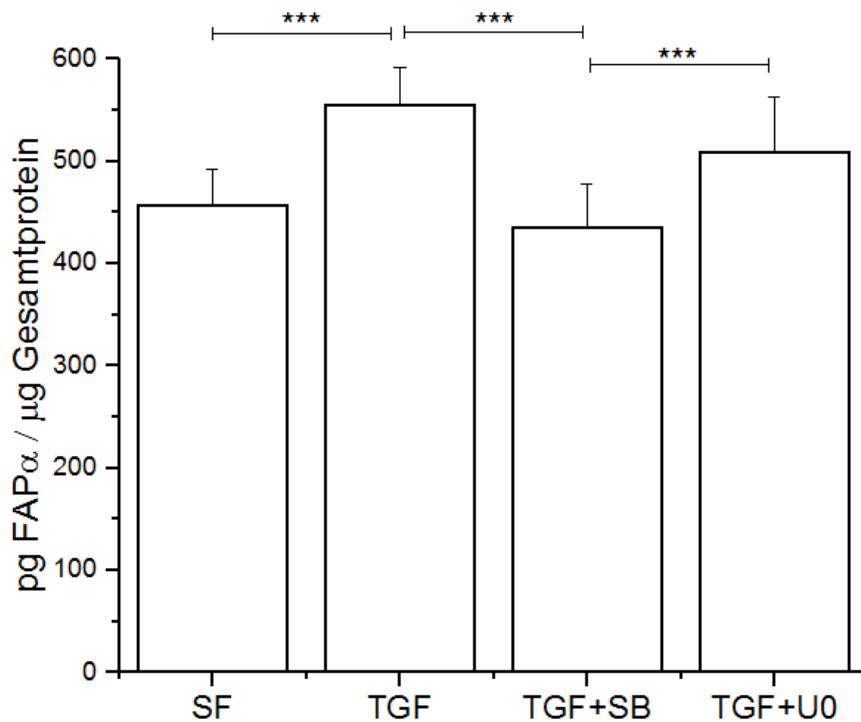


Abbildung 13: FAP α -Konzentrationen nach ALK- und MEK-Inhibition

Mittels ELISA ermittelte FAP α -Konzentrationen im Lysat von HCF, die 48 Stunden mit den Inhibitoren SB431542 und U0126 sowie 2 ng/ml TGF β_1 inkubiert wurden. Es zeigt sich eine Reduktion der TGF β -vermittelten FAP α -Expressionssteigerung durch den Inhibitor SB431542, U0126 hat keinen signifikanten Einfluss auf die TGF β -induzierte FAP α -Konzentration (Normierung der Werte auf den Gesamtproteingehalt, $n = 15$, *** $p < 0,001$. SF= Medium SF, TGF = TGF β_1 , SB = SB431542, U0 = U0126).

Ein Western Blot der Zelllysate für Smad-2 und Smad-3 und deren phosphorylierte Formen, die im Rahmen des kanonischen TGF β -Signalwegs eine entscheidende Rolle spielen, zeigte analog sowohl die durch TGF β_1 induzierte Phosphorylierung der Smads als auch deren fehlende Aktivierung in Anwesenheit des ALK-Inhibitors SB431542 (Abbildung 14, Abbildung 15).

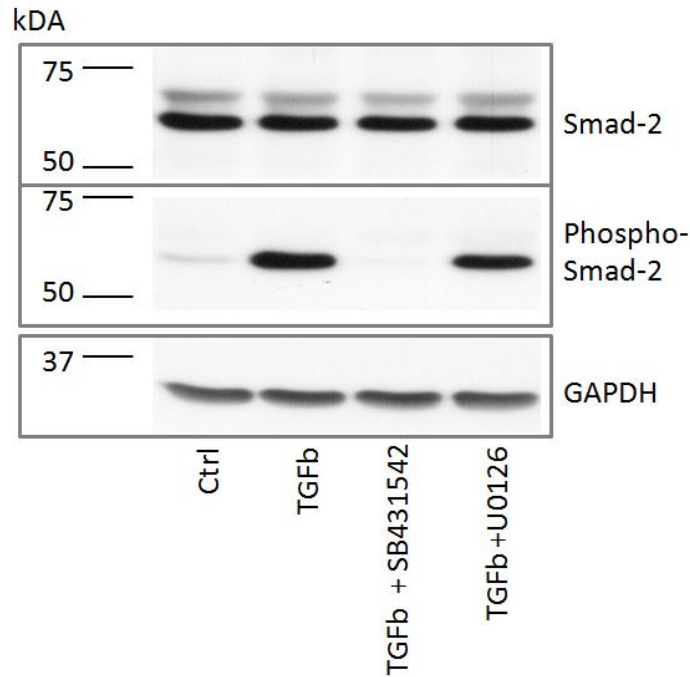


Abbildung 14: Smad-2 und Phospho-Smad-2 Western Blot der Proben der ALK- und MEK-Inhibition

Analog zur unten gezeigten Abbildung 17 ist in den HCF-Lysaten der Kontrollgruppe nach 60-minütiger Inkubation in 2 ng/ml TGF β_1 eine Phosphorylierung von Smad-2 nachweisbar, die durch vorherige 60-minütige Inkubation in SB431542 komplett aufgehoben wird. Eine vorherige Inkubation mit U0126 hat keinen Effekt auf die Smad-2-Aktivierung.

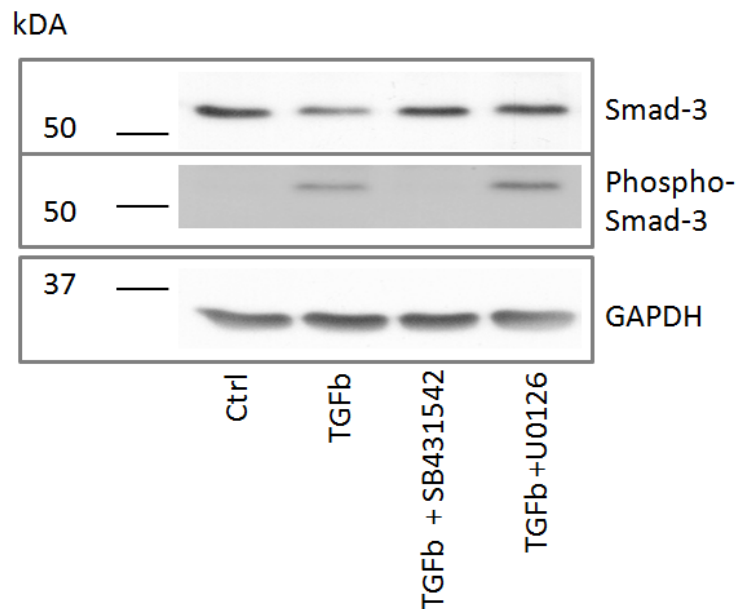


Abbildung 15: Smad-3 und Phospho-Smad-3 Western Blot der Proben der ALK- und MEK-Inhibition

Ebenfalls in Analogie zur unten gezeigten Abbildung 18 zeigt sich in den HCF-Lysaten der Kontrollgruppe nach 60-minütiger Inkubation in 2 ng/ml TGF β_1 eine Smad-3-Aktivierung, die durch die 60-minütige vorherige Inkubation mit dem Inhibitor SB431542 außer Kraft gesetzt wird. Eine vorherige Inkubation in dem MEK-Inhibitor U0126 hat keinen Einfluss auf die TGF β_1 -induzierte Smad-3-Phosphorylierung.

3.2.3.2 Der kanonische TGF β -Signalweg

Da bereits in den Versuchen mit dem ALK-Inhibitor SB431542 gezeigt werden konnte, dass eine Inhibition des TGF β -Rezeptors in einer verminderten FAP α -Expression resultiert und eine Inkubation mit TGF β zur Phosphorylierung von Smad-2 und -3 führt, die durch den Inhibitor unterbrochen wird, sollte im Weiteren untersucht werden, ob die FAP α -Expression ebenfalls über Smad-2 und -3 reguliert wird. Dass die intrazellulären Proteine eine entscheidende Rolle im TGF β -Signalweg spielen, wurde bereits vorher beschrieben¹⁰⁵⁻¹⁰⁷.

Hierfür wurden HCF mit siRNA gegen Smad-2 oder Smad-3 oder mit Kontroll-siRNA transfiziert und entweder 48 Stunden in reinem Medium SF oder mit TGF β_1 in einer Konzentration von 2 ng/ml inkubiert. Die FAP α -Konzentration der Zelllysate wurde daraufhin mittels ELISA bestimmt (Abbildung 16a). In den auf das Gesamtprotein normierten Proben zeigte sich ein signifikanter Unterschied sowohl zwischen den mit TGF β_1 und den mit Medium SF behandelten Proben der Kontrollgruppe ($p < 0,01$) als auch zwischen der Kontrollgruppe, die mit TGF β_1 inkubiert wurde, und der mit Smad-3 siRNA transfizierten Zellen ohne TGF β_1 ($p < 0,01$) und mit 2 ng/ml TGF β_1 ($p < 0,001$). Hierbei war vor allem in den mit Smad-3 siRNA transfizierten Zellen auch durch Zugabe von TGF β_1 keine Zunahme der FAP α -Konzentration zu erreichen, was den Rückschluss zuließ, dass für die TGF β_1 vermittelte Steigerung der FAP α -Expression Smad-3 zwingend erforderlich sein könnte. In den mit Smad-2 siRNA transfizierten Proben zeigte sich nach TGF β_1 -Stimulation eine Änderung der FAP α -Konzentration um 12%. Diese fiel im Vergleich zur Kontrollgruppe mit einer Steigerung der FAP α -Konzentration um 40% nach TGF β_1 -Induktion deutlich geringer aus (Abbildung 16b). Weiterhin war ein zwar nicht signifikanter, aber dennoch niedrigerer FAP α -Wert der mit Smad-3 siRNA transfizierten Zellen ohne TGF β_1 -Behandlung im Vergleich zur Kontrollgruppe deutlich.

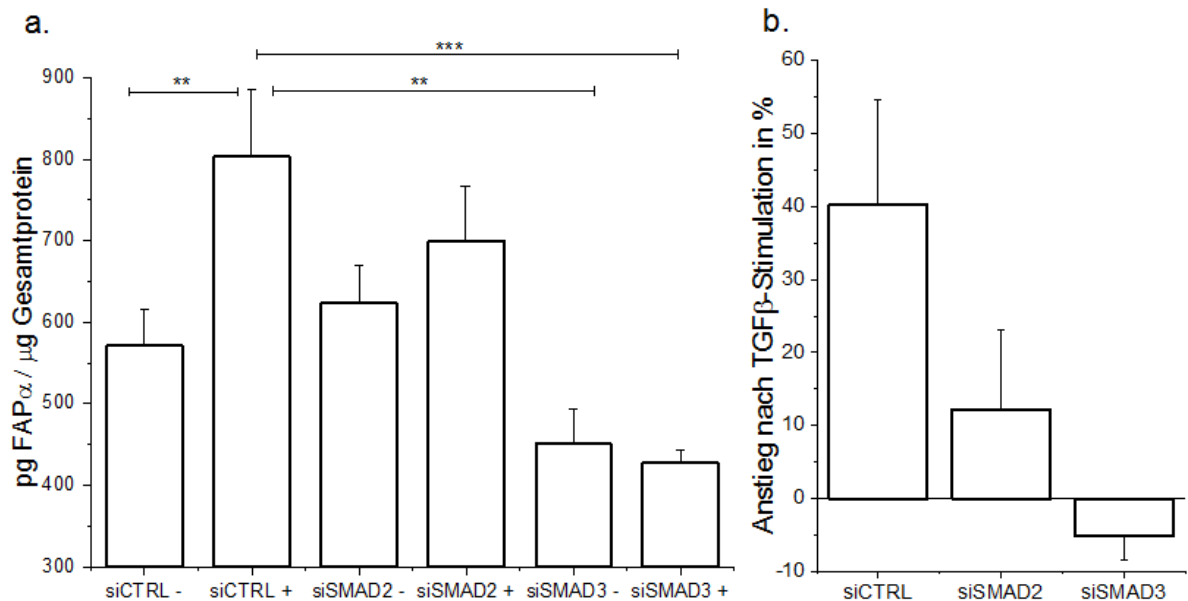


Abbildung 16: FAP α -Konzentrationen im Lysat von HCFs nach Smad-2/3-Knockdown

a. Die Steigerung der FAP α -Konzentration durch Zugabe von 2 ng/ml TGF β ₁ fällt nach Knockdown von Smad-2 wesentlich geringer aus als in der Kontrollgruppe, bei Herunterregulation von Smad-3 unterbleibt eine FAP α -Konzentrationsänderung durch TGF β ₁ vollständig (n = 3, ** p < 0,01, *** p < 0,001). **b.** Darstellung der prozentualen Änderung der FAP α -Konzentration durch Zugabe von TGF β ₁ im Vergleich zum Ausgangswert. Bei beiden Knockdowns deutet eine deutliche Reduktion der FAP α -Konzentrationszunahme auf eine Hemmung des TGF β -Signalwegs hin.

Zur Verifizierung des temporären Knockdowns wurden Western Blots der Lysate der transfizierten Zellen für Smad-2 und Smad-3 sowie deren aktive Formen Phospho-Smad-2 und Phospho-Smad-3 durchgeführt. Vor der Lyse der Zellen wurden diese 60 Minuten mit 2 ng/ml TGF β ₁ inkubiert, als Kontrolle dienten unstimulierte Zellen. Hier zeigte sich eine deutliche Herabregulation der Smad-Expression, bei Smad-3 sogar bis unterhalb der Nachweisgrenze des Western Blots. Die phosphorylierte aktive Form beider Proteine war in den jeweiligen herunterregulierten Proben ebenfalls nicht mehr nachweisbar. Darüber hinaus zeigte sich nach TGF β ₁-Stimulation eine nachweisliche Aktivierung von Smad-2 bzw. -3 zu Phospho-Smad-2 bzw. -3, was durch den Knockdown unterbunden werden konnte (Abbildung 17 und Abbildung 18). Bei Abwesenheit von TGF β ₁ war keine Phosphorylierung der Smads nachweisbar.

Zusammenfassend konnte zum Signalweg der FAP α -Expression in humanen kardialen Fibroblasten erstmalig gezeigt werden, dass durch TGF β die FAP α -Expression über Smad-2 und -3 induziert wird. Ein Effekt von EGR-1, CTGF oder TNF α auf die FAP α -Expression war nicht erkennbar.

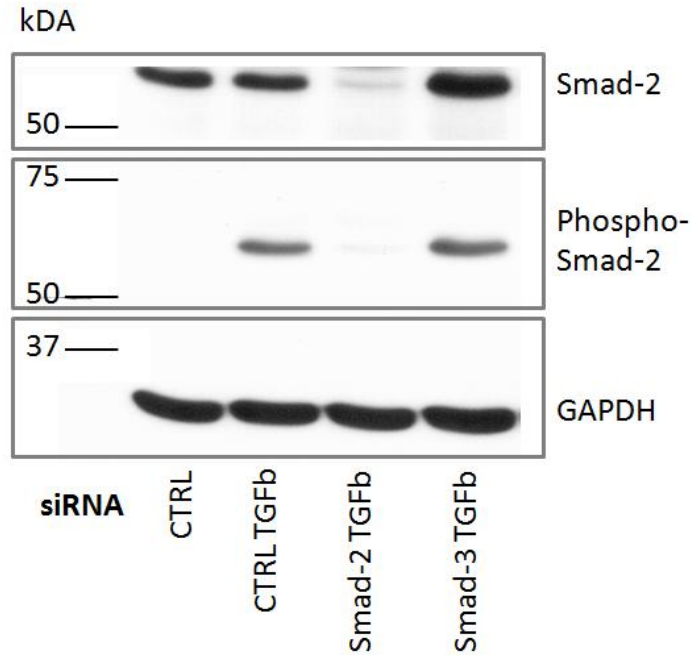


Abbildung 17: Smad-2 und Phospho-Smad-2 Western Blot der mit Smad-2- bzw. Smad-3-siRNA transfizierten HCF-Lysate

Die Aktivierung von Smad-2 zu Phospho-Smad-2 wird nicht bei ruhenden HCF, aber nach 60-minütiger Inkubation mit 2 ng/ml TGF β ₁ ausgelöst. Durch Knockdown mittels siRNA gegen Smad-2 ist auch bei Anwesenheit von TGF β ₁ Phospho-Smad-2 unterhalb der Nachweisgrenze des Western Blots.

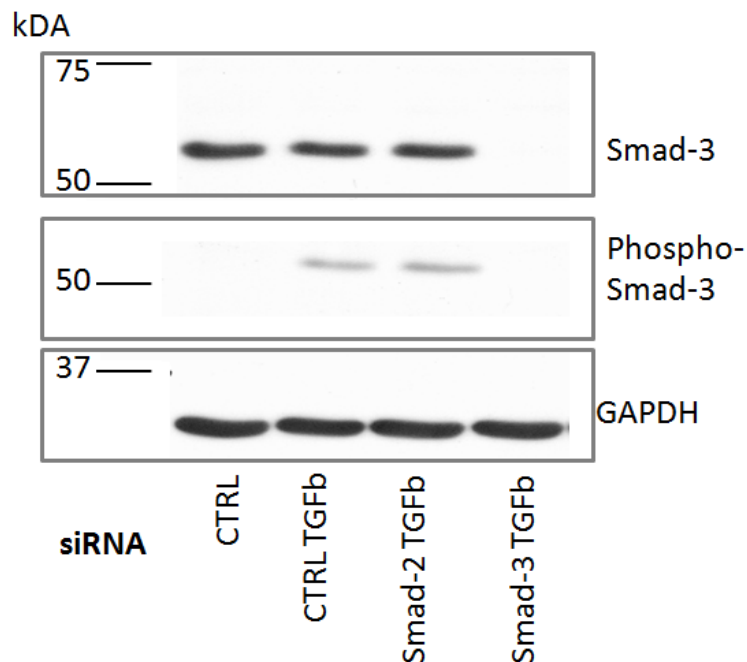


Abbildung 18: Smad-3 und Phospho-Smad-3 Western Blot der mit Smad-2- bzw. Smad-3-siRNA transfizierten HCF-Lysate

Analog Western Blot zur Detektion von Smad-2 (Abbildung 17) zeigt sich ebenfalls eine Phosphorylierung von Smad-3 nur nach Inkubation der Zellen in 2 ng/ml TGF β ₁ für 60 Minuten. In den mit siRNA gegen Smad-3 transfizierten Zellen ist mittels Western Blot weder Smad-3 noch dessen aktivierte Form, Phospho-Smad-3, nachweisbar.

3.3 Nachweis von löslichem FAP α in humanem Plasma: Validierung des ELISA

Zur Validierung des ELISA für zirkulierendes FAP α wurden Plasma- und Serumproben von 20 gesunden Medizinstudenten, von deren gesunden Verwandten sowie von 11 Patienten mit kongestiver Herzinsuffizienz und 6 KHK-Patienten gesammelt.

Um festzustellen, ob entweder Plasma oder Serum sich als geeigneter zum Nachweis von FAP α erweist, wurden die Plasma- bzw. Serumproben zweier Probanden zur Validierung des ELISAs zunächst 1:500 verdünnt. Es wurde ein „Kontroll-Spike“ (rekombinantes FAP α in Reagent Diluent) mit einer Konzentration von 2 ng/ml hergestellt, den nichtvalidierten Proben wurde dieselbe Konzentration des rekombinanten FAP α hinzugegeben. Diese „gespikten“ Proben wurden wiederum seriell verdünnt. Es wurde sowohl die Wiederfindung des tatsächlich in der Probe befindlichen FAP α gemessen, indem die Differenz der „gespikten“ Proben und des „Kontroll-Spikes“ zur reinen Probe ins Verhältnis gesetzt wurde, als auch die Wiederfindung der seriellen Verdünnungen als Relation des erhaltenen Wertes zum Erwartungswert. Hierbei zeigte sich eine Wiederfindung des „Spikes“ von 86 und 89 % im Plasma und 73 und 78 % im Serum (Abbildung 19 a). Auch die Parallelität der seriellen Verdünnung zeigte im Plasma eine geringere Streuung (82 – 99 %, Mittelwert der Daten $93,7 \pm 5,3$ %) als im Serum (74 – 109 %, Mittelwert der Daten $99,7 \pm 11,3$ %; Abbildung 19 b). Daher wurde im weiteren Verlauf zur Messung der FAP α -Spiegel nur EDTA-Plasma verwendet. Um die Wiederfindung der FAP α -Konzentrationen zu optimieren, wurde außerdem die Konzentration des Erstantikörpers von 1 $\mu\text{g/ml}$ auf bis zu 3 $\mu\text{g/ml}$ variiert. Hierzu wurde das Plasma von 4 Probanden sowie zum Ausschluss eventueller Kreuzreaktionen das Plasma zweier Ratten 1:100 verdünnt gemessen als auch nach vorheriger Zugabe von rekombinantem FAP α und darauffolgender 1:100-Verdünnung. Dies geschah auf einer Mikrotiterplatte, deren eine Hälfte mit 1 $\mu\text{g/ml}$ und deren zweite Hälfte mit 2 $\mu\text{g/ml}$ des Erstantikörpers beschichtet waren. Auch hier wurde die Wiederfindungsrate des rekombinanten FAP α in Relation zu einem „Kontroll-Spike“ gemessen und in Prozent wiedergegeben.

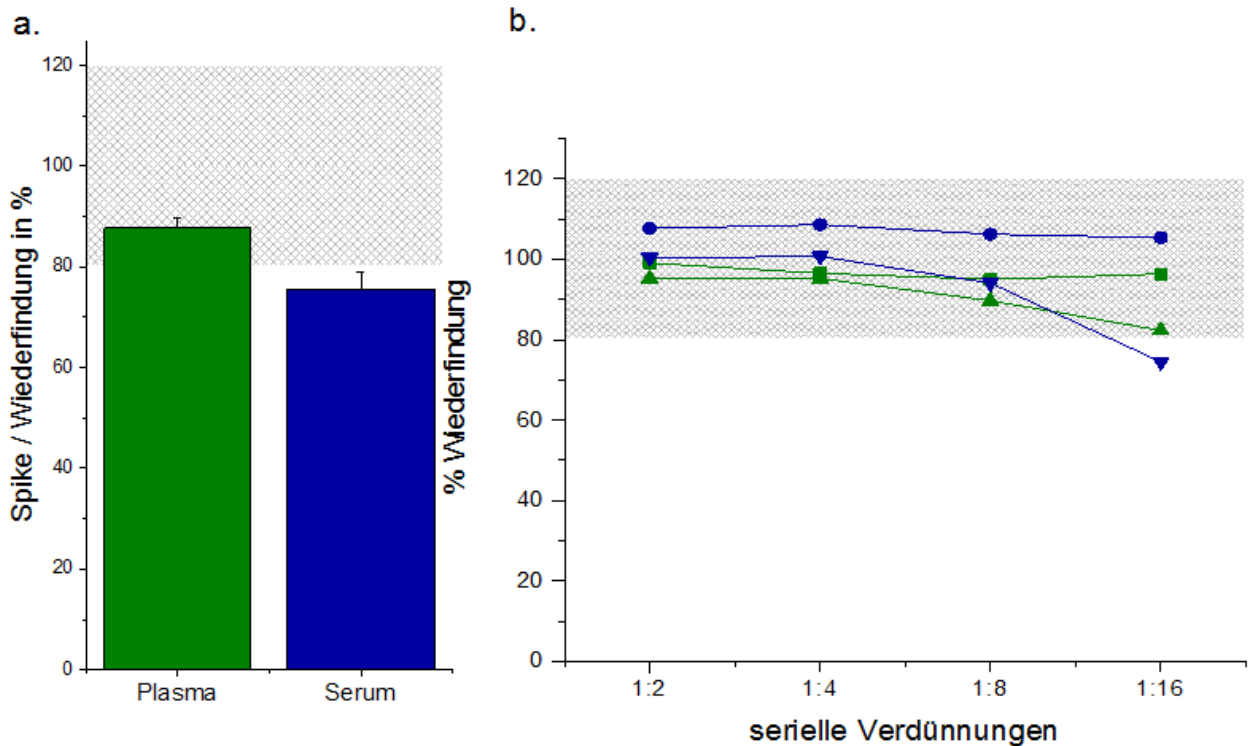


Abbildung 19: Plasma vs. Serum in der Validierung des ELISAs

a) Wiederfindung der „gespiketen“ Probe in % (Quotient aus Differenz der „gespiketen“ Probe und Kontrollspike mit der reinen Probe) im Plasma und im Serum. Die Wiederfindungsrate im Plasma ist im Vergleich zum Serum erhöht. (n=2, 1 µg/ml Erstantikörper) **b)** Wiederfindung der seriellen Verdünnungen (Relation vom gemessenen Wert zum Erwartungswert). Fast alle Proben liegen im gewünschten Bereich von 80 – 120 % (grau schraffiert), doch zeigen die Wiederfindungsraten der Plasma-Proben eine geringere Streuung als die der Serumproben (rote Linien: Plasma; blaue Linien: Serum)

Es ergab sich bei einer Erstantikörperkonzentration 2 µg/ml eine signifikant ($p < 0,05$) verbesserte Wiederfindungsrate (81 – 95 %, Mittelwert 88 ± 8 %) gegenüber einer Konzentration von 1 µg/ml (54 – 97 %, Mittelwert 71 ± 15 %; Abbildung 20). Eine weitere Konzentrationssteigerung des Erstantikörpers wurde analog durch Vergleich der Wiederfindungsrate eines „Spikes“ sowie der Parallelität zur seriellen Verdünnung bei einer Erstantikörperkonzentration von 2 und 3 µg/ml untersucht. Hierbei zeigte sich kein signifikanter Unterschied der beiden Gruppen mit verschiedenen Antikörperkonzentrationen. Sowohl Wiederfindungsrate als auch Parallelität der Verdünnung bei einer Beschichtung mit 3 µg/ml Erstantikörper schien hierbei leicht gegenüber der geringeren Konzentration verbessert (Wiederfindung bei 2 µg/ml zwischen 89 und 98 %, Mittelwert 93 ± 5 %, Parallelität der Verdünnung bei 2 µg/ml zwischen 101 und 117 %; Wiederfindung bei 3 µg/ml zwischen 95 und 107 %, Mittelwert 101 ± 5 %, Parallelität der Verdünnung bei 3 µg/ml zwischen 97 und 102 %; Abbildung 20 und Abbildung 21). Für die weiteren Versuche wurde jedoch bei ähnlich gutem Ergebnis eine Erstantikörperkonzentration von 2 µg/ml verwendet.

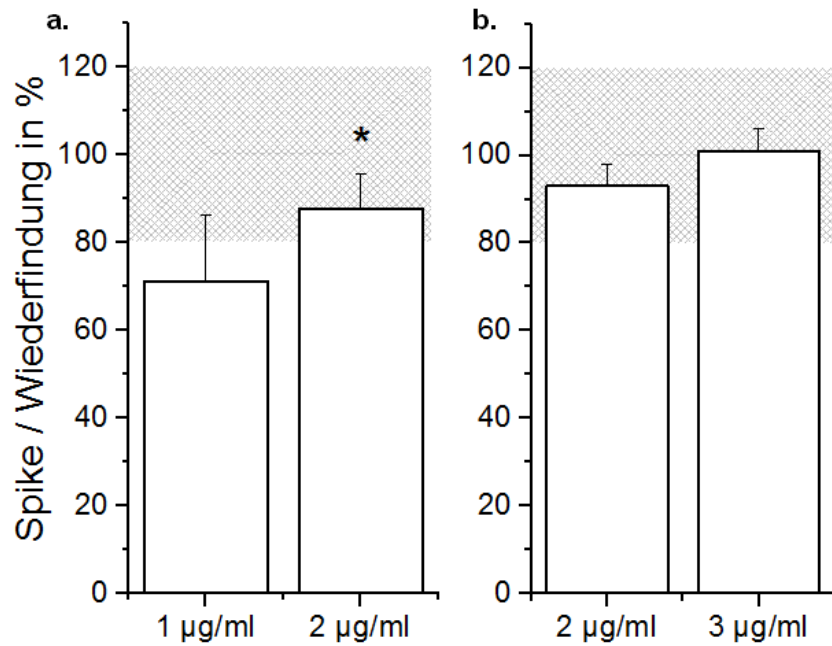


Abbildung 20: Wiederfindungsrate der Proben bei unterschiedlichen Erstantikörper-Konzentrationen

a) Die Wiederfindungsrate ist bei einer Beschichtung mit 2 µg/ml des Erstantikörpers signifikant erhöht gegenüber einer Konzentration von 1 µg/ml ($p < 0,05$, $n = 6$). Weiterhin liegt hierbei die Wiederfindungsrate im gewünschten Bereich von 80 – 120 % (grau schraffiert). **b)** Eine Konzentrationserhöhung des Erstantikörpers auf 3 µg/ml erbringt in einem anderen Versuch keine signifikante Verbesserung der Wiederfindungsrate im Vergleich zur Konzentration von 2 µg/ml ($n = 4$)

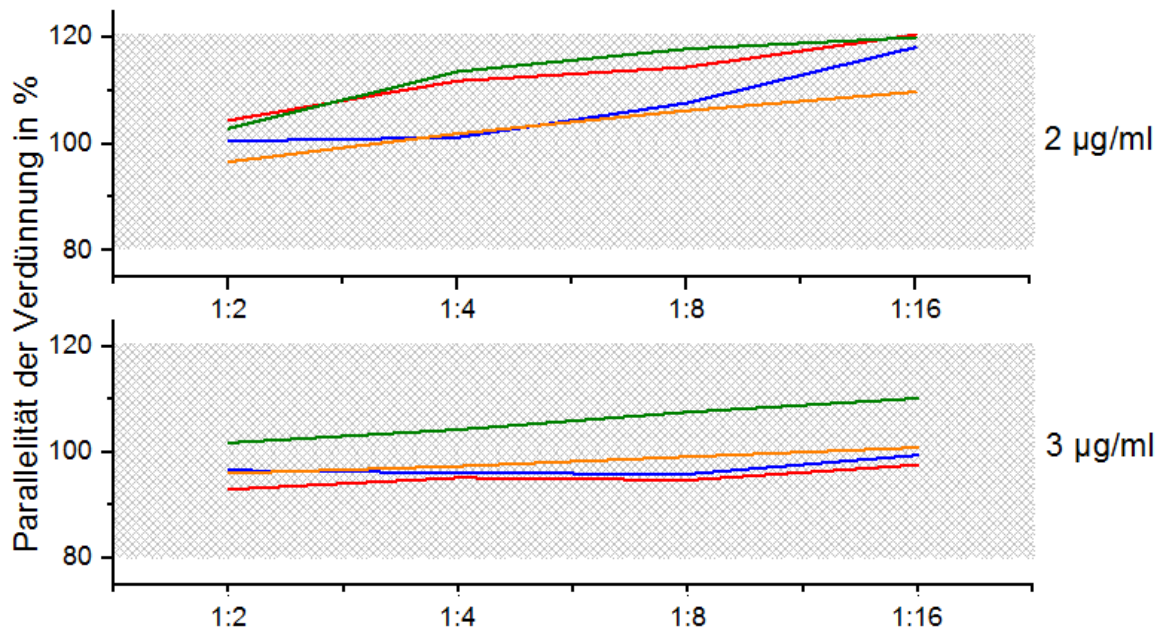


Abbildung 21: Parallelität der Verdünnungen bei unterschiedlichen Erstantikörper-Konzentrationen

Wiederfindungsrate der seriellen Verdünnungen bei einer Beschichtung mit 2 µg/ml (oberer Abschnitt) vs. 3 µg/ml Erstantikörper (unterer Abschnitt) von jeweils 4 Plasmaproben. Die Wiederfindungsrate liegt bei allen Verdünnungen im gewünschten Bereich.

3.4 Präanalytik vor Beginn der Studie

Zum Ausschluss eines FAP α -Zerfalls durch mehrere Einfrier- und Auftauzyklen oder inadäquate Lagerung wurde weiterhin der Einfluss von Aufbewahrungsbedingungen auf die gemessene FAP α -Konzentration im Plasma untersucht. Hierfür wurden zunächst bei 10 Probanden in Triplikaten gewonnene EDTA-Proben verwendet, wobei eine der Proben direkt nach der Gewinnung zentrifugiert und das Plasma bei -80°C eingefroren wurde, die anderen wurden bei 4°C für einen bzw. drei Tage vor der Verarbeitung gelagert. Insgesamt zeigte sich eine Schwankung der Werte nach eintägiger Lagerung bei 4°C von 79,5 bis 126,7% des jeweiligen Wertes bei direkter Verarbeitung der Probe und eine Schwankung von 68,6 bis 125,9 % bei dreitägiger Lagerung. Die FAP α -Konzentration im Plasma der direkt verarbeiteten Proben lag zwischen 51,3 – 201,5 ng/ml (Abbildung 22). Weiterhin wurde die Lagerung der Plasmaproben bei Raumtemperatur untersucht. Hierfür wurde die Hälfte des in Duplikaten gewonnenen Plasmas von 9 Probanden für 24 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert und erst dann verarbeitet, der andere Anteil wurde sofort nach Protokoll verarbeitet. Hier zeigte sich ebenfalls eine Schwankung der gemessenen FAP α -Konzentration von 91,5 bis 126,8 % im Vergleich zum Ausgangswert bei einer FAP α -Konzentration im Plasma von 36,6 bis 142,4 ng/ml (Abbildung 23). Auch zwei- und dreifache Einfrier- und Auftauzyklen des Plasmas von 4 Probanden von -80°C auf Raumtemperatur zeigten keine signifikante Änderung der FAP α -Konzentration im Vergleich zur direkten Messung bei FAP α -Konzentrationen zwischen 51,3 und 142,4 ng/ml und einen prozentualen Schwankung von 93,2 bis 114,4 % bei einem zweimaligem Zyklus und 90,6 – 117,9% beim dreifachen Zyklus (Standardabweichungen der prozentualen Abweichungen bei zweifachem Zyklus 9%, bei dreifachem Zyklus 11%; Abbildung 24). Eine 2- und 4-fache Verdünnung von 5 Plasmaproben resultierte in einem weitestgehend linearen Abfall der FAP α -Konzentrationen in allen Proben, so dass eine sichere Detektion der FAP α -Spiegel bei der vorliegenden Verdünnung (1:100) vermutet werden kann (Abbildung 25).

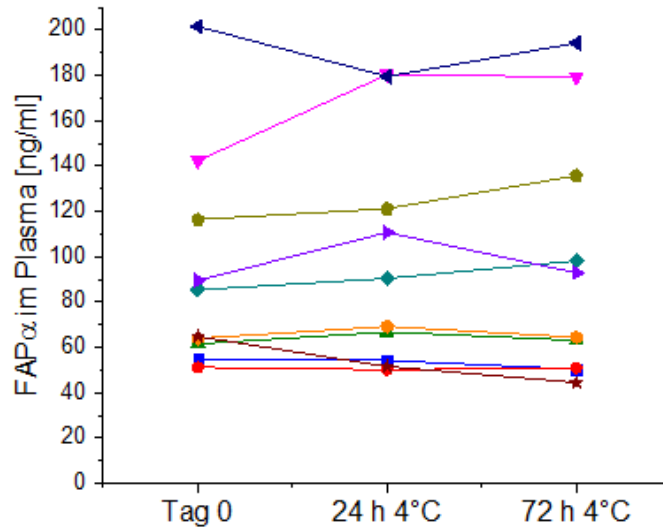


Abbildung 22: Einfluss der Lagerung bei 4° auf die gemessenen FAP α -Konzentrationen
 In Triplikaten gewonnene Plasmaproben von 10 Probanden wurden entweder direkt oder nach 2- bzw. 3-tägiger Lagerung bei 4°C vor der Messung mittels ELISA zunächst eingefroren und dann einmalig wieder aufgetaut. Dargestellt ist der Verlauf der gemessenen FAP α -Konzentrationen. Bei 3 Proben zeigen sich stärkere Schwankungen über das tolerierte Maß hinaus, bei den restlichen Proben bleiben die FAP α -Konzentrationen auch nach längerer Lagerung annähernd stabil.

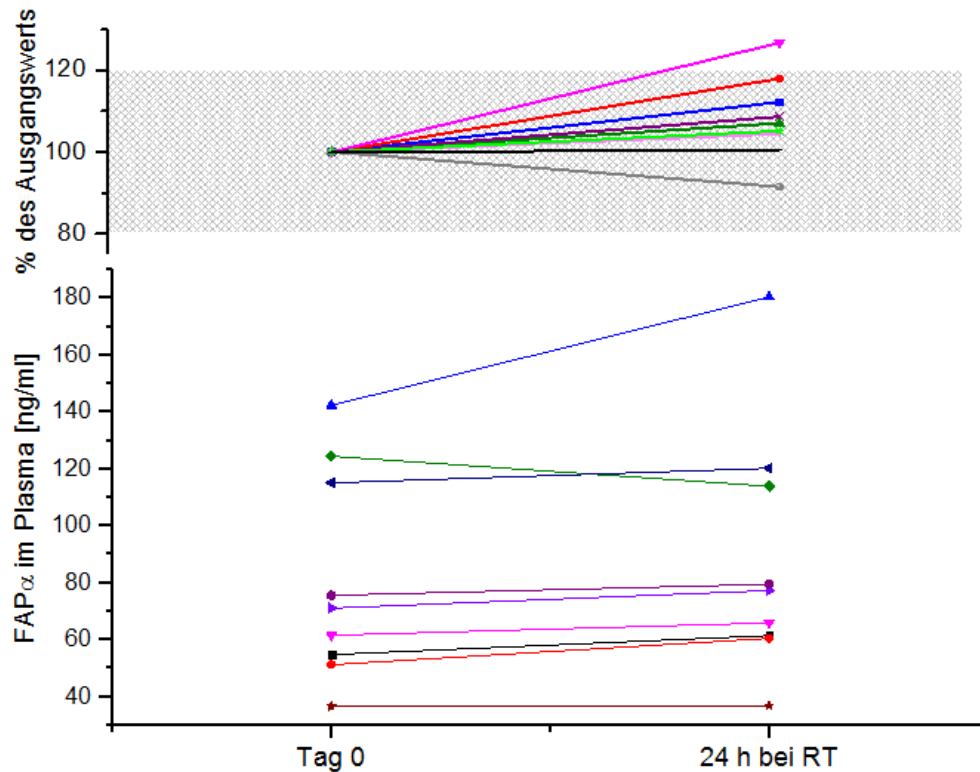


Abbildung 23: Einfluss der Lagerung bei Raumtemperatur auf die gemessenen FAP α -Konzentrationen
 Bestimmung der FAP α -Konzentrationen mittels ELISA von in Duplikaten gewonnenen Plasmaproben von 9 Probanden, die entweder direkt oder nach eintägiger Lagerung bei Raumtemperatur gemessen wurden. Die Proben zeigen sich bis auf eine einzelne im Verlauf stabil, es werden nur geringe prozentuale Abweichungen des Ausgangswertes erreicht.

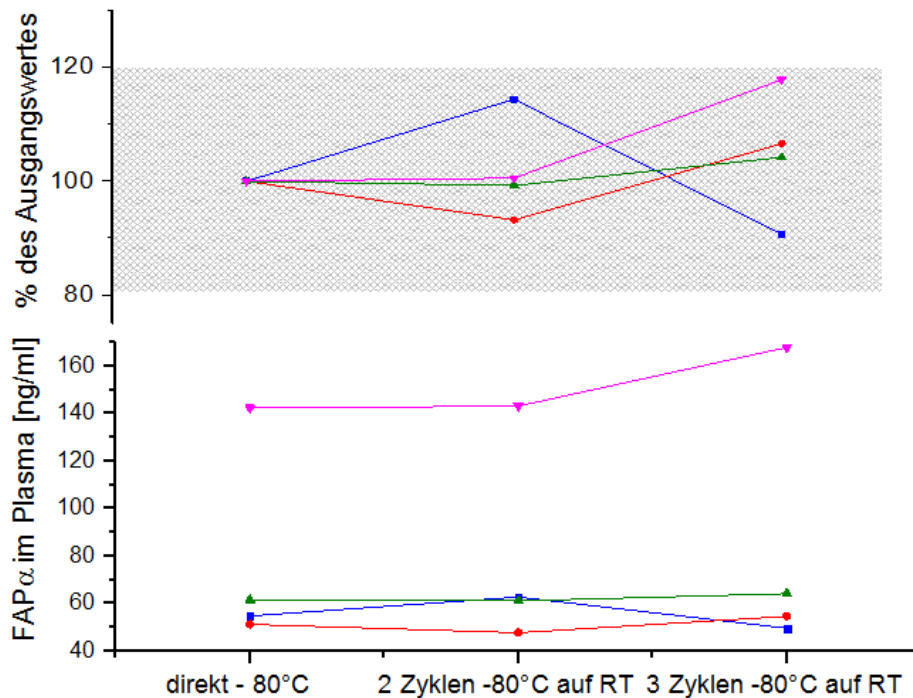


Abbildung 24: Einfluss von mehreren Einfrier- und Auftauzyklen der Plasmaprobe auf die gemessene FAP α -Konzentration

Die in Triplikaten gewonnenen Plasmaproben von 4 Probanden wurden entweder einmalig eingefroren oder 2 bzw. 3 Einfrier- und Auftauzyklen vor der Messung durchgeführt. Die Bestimmung der FAP α -Konzentration erfolgte mittels ELISA. Es zeigt sich in allen Proben eine geringe Schwankung der Werte innerhalb der Grenzen von 80 – 120 % des Ausgangswertes (oberer Abschnitt der Grafik).

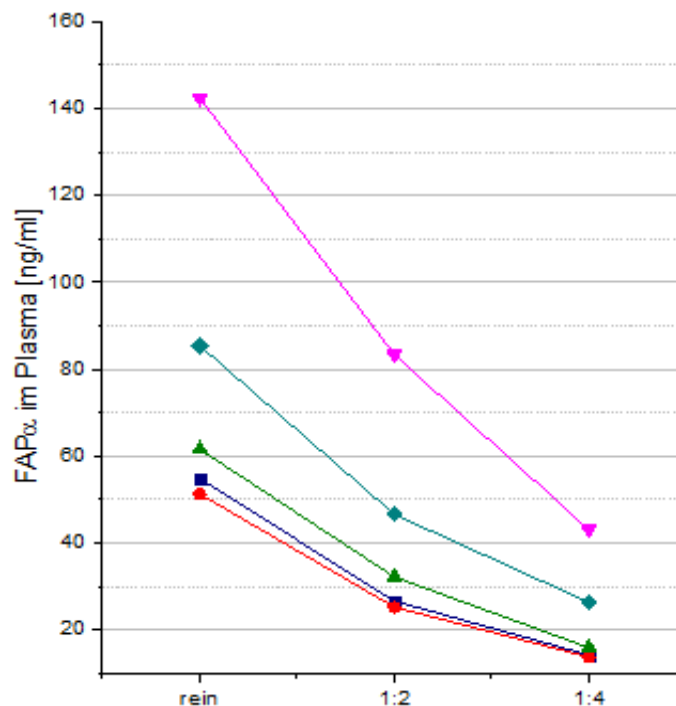


Abbildung 25: FAP α -Konzentrationen nach linearer Verdünnung der Plasmaproben

2- und 4-fache Verdünnung von 5 Plasmaproben. Es zeigt sich ein annähernd linearer Verlauf der Konzentrationen nach Verdünnung, was eine gute Detektion der FAP α -Konzentration der reinen Probe vermuten lässt.

3.5 Eigenschaften des FAP α -ELISA

Die Qualitätskontrolle des Herstellers des kommerziell erwerblichen hFAP ELISA Kits sieht einen niedrigen Blank-Wert von weniger als 0,2 OD, ein maximales Signal von 1,5-3 OD sowie eine Differenz der OD zwischen dem niedrigstem Standard und dem Blank-Wert von mehr als 0,001 OD vor, was in den durchgeführten ELISA bestätigt werden konnte.

Zur Festlegung der Nachweisgrenze jedes ELISA wurde der Blank-Wert jeweils in Doppelbestimmung gemessen und zu dessen arithmetischem Mittel 3 Standardabweichungen addiert. Die korrespondierende FAP α -Konzentration zu diesem OD-Wert konnte so mittels der Kalibrierungskurve des Assays ermittelt werden. Die Werte schwankten in allen ELISA zwischen 0,01 und 0,06 ng/ml. Weiterhin wurde die Bestimmungsgrenze, festgelegt als die niedrigste FAP α -Konzentration, die mit einer Abweichung von weniger als 20% des Erwartungswertes gemessen werden kann, durch bis zu 16-fache Verdünnung von 11 Plasma-Proben bestimmt und liegt mit 3 – 14 ng/ml deutlich oberhalb der Nachweisgrenze des ELISA. Darüber hinaus wurde die Inter-Assay-Variabilität bestimmt, indem 4 gepoolte Plasma-Proben in 18 Assays, die an verschiedenen Tagen durchgeführt wurden, gemessen wurden. Hier ergab sich eine prozentuale relative Standardabweichung der Daten aller 4 gepoolten Proben von 8,9 bis 13,1 %. Die Intra-Assay-Variabilität wurde mit Hilfe der 4 gepoolten Proben in 6 Parallel-Versuchen untersucht, wobei sich die prozentuale relative Standardabweichung auf 3,6 bis 5,5 % belief (Abbildung 26).

3.6 FAP α -Konzentrationen in gesunden Blutspendern

In dieser Studie wurden 101 offensichtlich gesunde Blutspender im Alter von 51 bis 71 Jahren auf deren FAP α -Konzentration im Plasma untersucht. Das Geschlechterverhältnis wurde mit 76 Männern und 25 Frauen so gewählt, dass es dem der Patienten mit akutem Koronarsyndrom entsprach. Die mediane FAP α -Konzentration im Plasma lag bei 108 ng/ml (55 - 189 ng/ml, 25. - 75. Perzentile 87 – 124 ng/ml). Ein signifikanter Unterschied der FAP α -Konzentration im Plasma zwischen den Geschlechtern bestand nicht (Männer: 55 – 189 ng/ml, Median 108 ng/ml, 25. – 75. Perzentile 86 – 122 ng/ml; Frauen: 74 – 154 ng/ml, Median 111 ng/ml, 25. – 75. Perzentile 88 – 126 ng/ml; $p = 0,45$; Abbildung 27a). Auch gab es keine Korrelation der FAP α -Konzentration mit dem Alter ($R = -0,09$; $p = 0,36$).

3.7 FAP α -Konzentrationen bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom

Die Studiengruppe bestand aus 407 Patienten und Patientinnen, die mit akutem Koronarsyndrom in die Medizinische Hochschule Hannover eingewiesen wurden. 310 dieser Patienten waren männlich (76 %) und zwischen 36 und 94 Jahre alt (medianes Alter 64 Jahre). Dagegen waren 24 % weiblich (97 Patientinnen) und zwischen 41 und 89 Jahre alt (medianes Alter 70 Jahre). Das Geschlechterverhältnis zwischen der Studien- und der Kontrollgruppe zeigte somit keine signifikanten Unterschiede (Männer 76 vs. 74 %; Frauen 24 vs. 26 %, $p = 0,799$, Abbildung 27a), wohingegen die Probanden der Studiengruppe älter als die der Kontrollgruppe waren (Alter zwischen 36 und 94 Jahre, Median 66, versus Alter zwischen 51 und 71 Jahre, Median 57 Jahre; $p < 0,001$). Die Probanden der Studiengruppe wiesen eine mediane FAP α -Konzentration im Plasma von 84 ng/ml auf (25-236 ng/ml, 25. – 75. Perzentile 69-101 ng/ml). Bei der gesunden Kontrollgruppe lag der mediane FAP α -Plasmaspiegel hingegen bei 108,2 ng/ml (55-189 ng/ml, 25. – 75. Perzentile 87-124 ng/ml).

Es bestand eine signifikante Erniedrigung der gemessenen Konzentrationen von FAP α im Plasma von ACS-Patienten gegenüber dem von gesunden Blutspendern ($p < 0,001$, Abbildung 27b). Darüber hinaus konnte eine leichte Erhöhung der FAP α -Plasmakonzentrationen bei den männlichen Patienten mit akutem Koronarsyndrom im Vergleich zu den Frauen festgestellt werden (Männer: 25-236 ng/ml, Median 87 ng/ml, 25. – 75. Perzentile 69–102 ng/ml; Frauen: 30-171 ng/ml, Median 80 ng/ml, 25. – 75. Perzentile 68– 99 ng/ml; $p = 0,044$). Auch Patienten mit erhöhter Killip-Klasse, die zur Risikostratifikation für Patienten mit akutem Herzinfarkt zur Mortalitätsabschätzung der folgenden 30 Tage dient, zeigten, wie auch Raucher, signifikant erniedrigte FAP α -Plasmakonzentrationen. Es bestand weiterhin eine inverse Korrelation von CRP und NT-proBNP zu den FAP α -Konzentrationen (Tabelle 1).

Die FAP α -Plasmakonzentrationen von Patienten mit instabiler Angina pectoris (32-236 ng/ml, Median 87 ng/ml, 25.–75. Perzentile 70–111 ng/ml), Non-STEMI (25-174 ng/ml, Median 84 ng/ml, 25.–75. Perzentile 67–100 ng/ml) oder STEMI (25-236 ng/ml, Median 84 ng/ml, 25.–75. Perzentile 69–100 ng/ml) unterschieden sich nicht ($p = 0,68$).

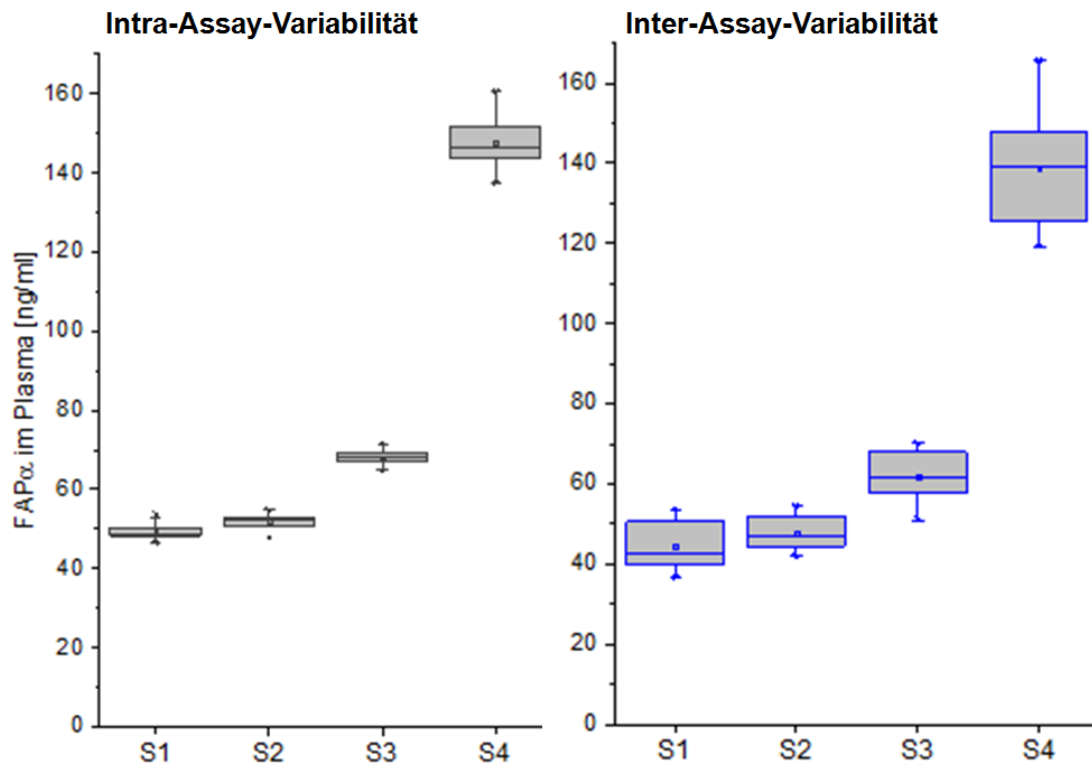


Abbildung 26: Intra- und Inter-Assay-Variabilität der ELISAs zur Messung von FAP α im Plasma

Messung von 4 gepoolten Plasmaproben in 6 Parallel-Versuchen zur Bestimmung der Intra-Assay-Variabilität (links) und Messung derselben Proben in 18 Assays an verschiedenen Tagen zur Bestimmung der Inter-Assay-Variabilität (rechts). Vor allem bei der Probe mit der höheren FAP α -Konzentration (S4) zeigte sich im Vergleich zu den restlichen Proben eine deutlichere Schwankung der gemessenen Werte.

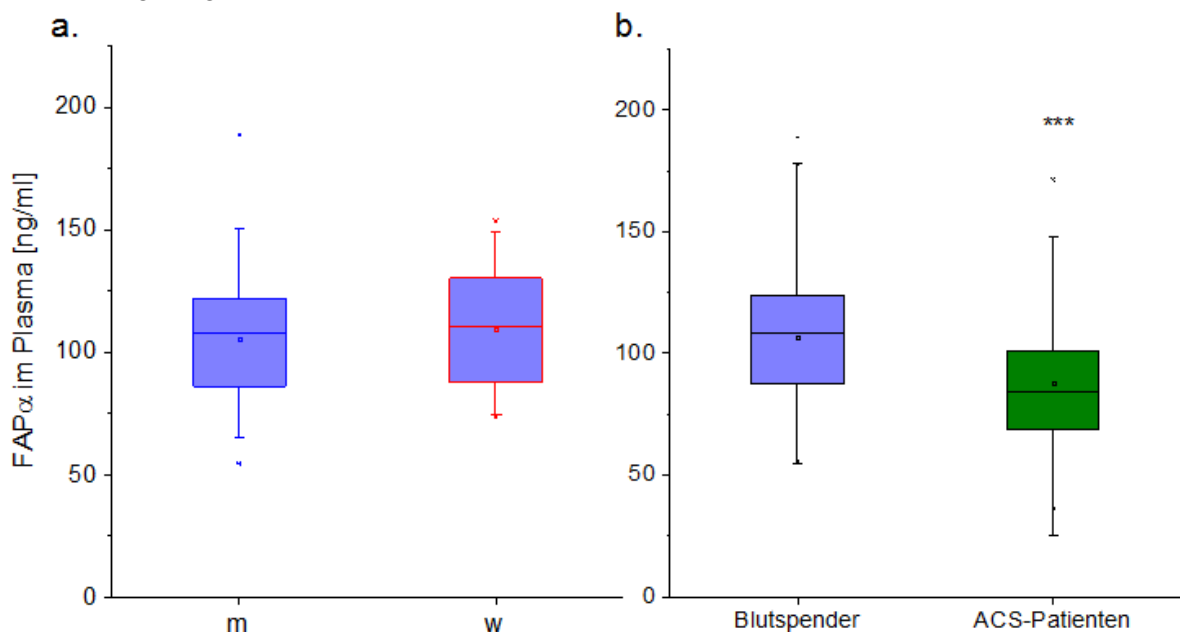


Abbildung 27: Darstellung der FAP α -Plasmaspiegel in der Kontrollgruppe und bei ACS-Patienten

a) FAP α -Plasmaspiegel im Blutspenderkollektiv: Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede der FAP α -Konzentration im Plasma männlicher (m) und weiblicher (w) Probanden. **b)** Die FAP α -Plasmaspiegel der Blutspendergruppe waren signifikant erhöht gegenüber den Plasmaspiegeln der ACS-Patienten (p < 0,001).

Tabelle 1: FAP α -Plasmaspiegel und kardiovaskuläre Marker/Risikofaktoren

Darstellung der Daten als absolute Zahl (in %) oder als Median (25.-75. Perzentile), aufgeteilt nach den jeweiligen Quartilen der FAP α -Spiegel. Zur Bestimmung der Korrelation und Berechnung des p-Werts wurden lineare Regressionsanalysen verwendet. FAP α , NT-proBNP und CRP waren nicht normalverteilt und wurden deshalb zum natürlichen Logarithmus transformiert. Quelle: Tillmanns *et al.*¹⁰⁸

	1. Quartil	2. Quartil	3. Quartil	4. Quartil	p
FAP im Plasma [ng/ml]	25-68	69-83	84-100	101-236	
Alter in Jahren	68 (58-77)	67 (56-71)	62 (53-71)	66 (58-75)	0,049
Männliches Geschlecht	75 (74)	71 (70)	84 (82)	80 (79)	0,115
Raucher (früherer und aktueller Konsum)	38 (38)	39 (38)	32 (31)	25 (25)	0,030
Bluthochdruck	67 (66)	73 (72)	70 (69)	68 (67)	1,00
Diabetes mellitus	14 (14)	20 (20)	19 (19)	19 (19)	0,415
Vorheriger Myokardinfarkt	28 (28)	22 (22)	23 (23)	26 (26)	0,796
Killip Klasse >1	16 (16)	10 (10)	10 (10)	5 (5)	0,016
Linksventrikuläre Ejektionsfraktion					0,070
Normal	34 (33)	31 (30)	25 (25)	31 (31)	
Leicht reduziert	26 (25)	35 (34)	35 (34)	41 (41)	
Mäßig reduziert	11 (11)	17 (17)	23 (23)	14 (14)	
Stark reduziert	17 (17)	9 (9)	10 (10)	6 (6)	
Koronare Herzerkrankung					0,303
1-Gefäß-Erkrankung	37 (36)	35 (34)	34 (33)	36 (36)	
2-Gefäß-Erkrankung	32 (31)	24 (24)	36 (35)	32 (32)	
3-Gefäß-Erkrankung	26 (25)	41 (40)	27 (26)	28 (28)	
Geschätzte GFR [ml/min]	82 (59-103)	85 (65-99)	84 (69-102)	84 (64-97)	0,805
hsTnT [ng/l]	74 (22-670)	95 (13-659)	63 (14-376)	55 (16-357)	0,269
CRP [mg/l]	4,9 (2,1-18,4)	2,8 (1,2-7,8)	2,1 (1,1-5,9)	2,5 (1,2-5,6)	<0,001
NT-proBNP [ng/l]	677 (161-2130)	361 (121-1269)	317 (129-880)	296 (97-1259)	0,034

3.8 FAP α in ACS-Patienten

Im Zeitintervall von 12 Monaten nach stationärer Aufnahme und Abnahme der Blutproben starben 29 Patienten der Studiengruppe. Patienten, deren FAP α -Konzentration im untersten Quartil (Plasmakonzentration < 69 ng/ml) lag, zeigten eine signifikant erhöhte Mortalität im Vergleich zu Patienten mit höheren FAP α -Plasmaspiegeln. Bei Patienten, deren Plasma-FAP α -Konzentration im 2. bis 4. Quartil lag, war die Mortalität annähernd gleich (Hazard Ratio 1. Quartil vs. 2.-4. Quartil = 3,0; 95% Konfidenzintervall 1,4-6,2; p = 0,021). Die inverse Korrelation der Plasma-FAP α -Konzentration mit der Mortalität bestand auch nach Korrektur für Alter und Geschlecht (Hazard Ratio 2,5; 95% Konfidenzintervall 1,2-5,2; p = 0,016).

3.9 Einfluss von stabiler KHK auf FAP α Konzentration

Aufgrund der niedrigen FAP α -Konzentrationen, die im Plasma von ACS-Patienten im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe gefunden wurden, sollte weiterhin bestimmt werden, ob das Vorliegen einer koronaren Herzkrankheit (KHK) einen Einfluss auf die Konzentration von zirkulierendem FAP α hat. Hierfür wurden die FAP α -Plasmaspiegel von 25 Patienten mit stabiler KHK bestimmt (11-180 ng/mL, Median 103 ng/ml), wobei sich kein signifikanter Unterschied im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe zeigte.

4. Diskussion

4.1 Zelluläres und lösliches FAP α in HCF

Im Rahmen dieser Arbeit konnte erneut gezeigt werden, dass humane kardiale Fibroblasten FAP α *in vitro* exprimieren. Dieses Protein konnte sowohl zellständig als auch im Zellkulturüberstand nachgewiesen werden, wobei die Spezifität des Nachweises für beide Varianten mit Hilfe von siRNA-Knockdown Experimenten bewiesen werden konnte. Auch in den Stimulationsversuchen mit TGF β_1 konnte ein Zusammenhang zwischen den FAP α -Konzentrationen im Zelllysat und im Zellkulturüberstand hergestellt werden. Weiterhin war eine Dynamik der FAP α -Spiegel im Zellkulturüberstand erkennbar. Hier konnte durch unterschiedlich lange Inkubation der HCF in den Nährmedien gezeigt werden, dass die FAP α -Konzentration im Überstand im Zeitverlauf ansteigt.

Die zu klärende Frage bleibt, auf welchem Weg das detektierte FAP α in den Zellkulturüberstand gelangt. In der Malignen Melanom-Zelllinie LOX wurde aktives FAP als integrales Membranprotein sowohl in der Zellmembran als auch in Membranvesikeln im Zellkulturüberstand detektiert, wohingegen weder im Zytoplasma noch im Medium FAP α gefunden werden konnte^{33, 38, 39}. Diese als Exosomen bezeichneten Vesikel werden von fast jeder Zelllinie in der Zellkultur sezerniert¹⁰⁹, so wurde dies auch für die murine Fibroblastenlinie NIH3T3 gezeigt¹¹⁰. Die in der vorliegenden Arbeit verwendete Probenaufbereitungsmethode für Zellkulturüberstände ermöglichte mit einem einzelnen Zentrifugationsschritt bei 14000 g zwar eine Separation des Überstands von ganzen Zellen oder Zelltrümmern, zur Trennung von Mikrosomen oder Exosomen sind allerdings wesentlich höhere g-Zahlen erforderlich¹¹¹, sodass das Vorhandensein von Exo-

somen im Überstand angenommen werden muss. So könnte auch das hier detektierte FAP α Bestandteil der von den HCFs abgeschilferten Vesikel sein.

Eine weitere Möglichkeit zur Erklärung des Vorhandenseins von FAP α im Überstand wäre, dass dieses durch proteolytisches Abspalten der N-terminalen zytoplasmatischen und transmembranen Domäne in das Medium abgegeben wird. Ein Enzym, das die FAP α -Abspaltung katalysiert, wurde bisher nicht gefunden. Allerdings gibt es Hinweise dafür, dass rekombinantes lösliches FAP α in der humanen Melanom-Zelllinie LOX durch endogene Proteasen zu verkürzten Formen umgewandelt wird ¹¹².

4.2 Der TGF β ₁-Signalweg zur Induktion der FAP α -Expression

Die mittels ELISA analysierten Lysate und Zellkulturüberstände der mit TGF β ₁ inkubierten HCFs zeigten einen signifikanten Anstieg der FAP α -Konzentration bei TGF β ₁-Stimulation. Weiterhin konnte in den Versuchen mit unterschiedlich langer TGF β ₁-Stimulation ebenfalls in den Lysatproben nach Stimulation ein Unterschied zur unstimulierten Gruppe festgestellt werden. Der ebenfalls leichte Anstieg der FAP α -Konzentrationen in den unstimulierten Proben trotz einer Normierung auf das Gesamtprotein lässt sich nur durch eine ebenfalls im Vergleich zum Ausgangswert höhere FAP α -Produktion pro Zelle erklären. Auch in den dazugehörigen Zellkulturüberständen stiegen die FAP α -Konzentrationen wie zu erwarten zeitabhängig an, wobei sich die FAP α -Konzentrationen in der unstimulierten und der stimulierten Gruppe bei 48 Stunden signifikant unterschieden. Dies steht im Einklang mit den bisher in der Literatur veröffentlichten Daten zur TGF β ₁-Aktivierung von Fibroblasten mit konsekutiver FAP α -Expression ^{53, 70, 71}.

Dass Smad-2 und -3 durch die ALK-5 (TGF β -Rezeptor-I) aktiviert werden, wurde bereits in einer Vielzahl von Zellen gezeigt ¹¹³⁻¹¹⁷. Dennoch ist über eine differenzielle Aktivierung von Smad-2 oder Smad-3 bisher wenig bekannt. In embryonalen Maus-Fibroblasten konnte gezeigt werden, dass die Expression bestimmter Proteine Smad-2- bzw. Smad-3-abhängig verläuft. Die Smads besitzen verschiedene Funktionen in der Embryonalentwicklung: Während ein Smad-2-Knockout in Mäusen in dem fehlenden Aufbau der Anterior-Posterior-Achse und damit einem letalen Phänotyp resultiert, zeigen Smad-3-Null Mäuse lediglich eine beeinträchtigte Immunfunktion mit chronischer Entzündung mehrerer Organe ¹¹⁸. In einer weiteren Maus-Fibroblastenlinie, die für Smad-3 defizient war, konnte gezeigt werden, dass Smad-3 für die TGF β -abhängige

Hemmung der Zellproliferation essentiell ist ¹¹⁹. Auch scheint es für den gesteigerten Aufbau der Extrazellulärmatrix bei strahleninduzierter Fibrose in der Haut von Mäusen verantwortlich zu sein ¹²⁰.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die TGF β ₁-induzierte FAP α -Expression Smad-3-abhängig verläuft. Als molekulare Antwort auf die Stimulation der HCF mit TGF β ₁ kam es zur Smad-3-Phosphorylierung. Ein Knockdown von Smad-3 mittels siRNA hob die induzierende Wirkung von TGF β ₁ auf FAP α vollständig auf.

Weiterhin wiesen die unstimulierten Zellen der Kontrollgruppe höhere FAP α -Werte auf als die der mit Smad-3 siRNA transfizierten Gruppe. Dies legt die Schlussfolgerung nahe, dass auch die basale FAP α -Expression, sei es durch endogene Produktion von TGF β ₁ oder über eine andere Form der Aktivierung, über Smad-3 reguliert wird. Dieses Ergebnis wird gestützt durch Daten, die zeigen, dass in embryonalen Maus-Fibroblasten sowohl die basale als auch die autoinduzierte TGF β -Expression abhängig von Smad-3 ist, nicht jedoch von Smad-2 ¹¹⁸.

Im Gegensatz hierzu bewirkte die Herunterregulation von Smad-2 in der vorliegenden Arbeit eine leichte Reduktion der prozentualen FAP α -Konzentrationserhöhung durch TGF β ₁. Im Western Blot waren allerdings in dem mit Smad-2 siRNA transfizierten Zelllysaten noch geringe Mengen an Smad-2, nicht aber an der aktiven Form Phospho-Smad-2, nachweisbar. Smad-2 scheint aber, wie auch für Smad-3 gezeigt, ein essentieller Bestandteil des TGF β ₁-Signalwegs zur Expression von FAP α zu sein.

Durch selektive Hemmung des ALK-5-Rezeptors (TGF β RI) durch SB431542 wurde weiterhin die intrazelluläre Smad-Aktivierung durch Hemmung der Phosphorylierung unterdrückt. ALK-5 entspricht einem TGF β -Rezeptor der Klasse I, der zusammen mit dem TGF β -Rezeptor der Klasse II, an den TGF β bindet, einen tetrameren Komplex bildet. Aktivierte ALK-5 besitzt Kinaseeigenschaften und phosphoryliert intrazelluläres Smad-2/-3 ¹¹³. Eine andere Signalkaskade von TGF β läuft über die Aktivierung von p38, einer MAP-Kinase. Der Inhibitor SB431542 wurde als selektiver Hemmstoff gegen ALK-5 hergestellt, wobei dieser mit niedrigerer Affinität auch ALK4 hemmt, gegen p38 konnte hingegen keine Affinität festgestellt werden. In A498-Zellen eines Nierenkarzinoms wurde mittels mRNA-Analysen festgestellt, dass ALK-5 für die TGF β -1-abhängige Expression der extrazellulären Marker Fibronectin, Collagen I α 1 und PAI-1 notwendig ist ¹²¹.

Eine Hemmung der Smad-Aktivierung durch ALK-5-Hemmung mittels SB431542 verhinderte die TGF β ₁-induzierte Phosphorylierung von Smad-2 und Smad-3. Dies führte zu einer signifikanten Reduktion der FAP α -Konzentration im Vergleich zur mit TGF β ₁-stimulierten Kontrollgruppe. Die TGF β ₁-abhängige Stimulation der FAP α -Expression wird also, zumindest teilweise, durch den ALK-5-Rezeptor und Smad-2 und -3 vermittelt.

Die selektive Inhibition von MEK1/2, einer MAPK/ERK-Kinase, durch U0126¹²² modulierte die FAP α -Konzentrationen in den so behandelten Zellen nicht. In verschiedenen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass innerhalb des TGF β -Signalwegs der durch TGF β IR aktivierte TGF β IR das Adapterprotein ShcA phosphoryliert^{101, 102}. Dieses kann als Heterotrimer der Reihe nach Ras, Raf, MEK1/2 und Erk1/2 MAP-Kinasen aktivieren¹²³. Auch konnte eine ERK-Phosphorylierungsstelle in Smad-3 gefunden werden, die eine mögliche Rolle in dessen Aktivierung spielt⁶¹. Eine Bedeutung von MEK1/2 in der Expression von FAP α im Rahmen des TGF β -Signalwegs konnte anhand der Ergebnisse dieser Arbeit jedoch nicht nachvollzogen werden.

4.3 Rolle von EGR-1, CTGF und TNF α in der Regulation der FAP α -Expression

In vorherigen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass EGR-1 als DNA-bindendes Zink-Finger-Protein von einer Reihe von Wachstums- und Differenzierungssignalen induziert wird¹²⁴. Weiterhin wurde bereits die Funktion von EGR-1 als Transkriptionsfaktor für FAP α durch Transfektion von EGR-1 siRNA in HOS-Zellen demonstriert, die in einer deutlich verminderten FAP α -Expression resultierte¹⁰⁴. In den hier durchgeführten Versuchen konnte allerdings in den HCFs keine Expressionsregulation von FAP α durch EGR-1 gezeigt werden. Dies könnte möglicherweise an einer zu geringen Herunterregulation durch die siRNA liegen. Zwar wurden die Proben mittels Western Blot für EGR-1 auf dessen Konzentration überprüft und eine deutlich verminderte EGR-1-Expression gezeigt, doch könnte die trotzdem vorhandene EGR-1-Menge ausreichend für eine ungeminderte FAP α -Expression sein. Da EGR-1 jedoch ebenfalls über den ERK-Signalweg aktiviert wird, der ebenfalls in HCF die FAP α -Expression nicht modulierte, ist eher davon auszugehen, dass EGR-1 in HCF keinen Effekt auf die FAP α -Expression hat. Weiterhin wäre es möglich, dass die bereits gezeigte Induktion von FAP α durch TGF β ₁-Stimulation über andere Signalwege, z.B. eine direkte Aktivierung durch die Smad-Komplexe, resultiert.

CTGF wird von Fibroblasten nach TGF β -Stimulation sezerniert und fungiert als Mediator der Fibroblastenproliferation und -differenzierung¹²⁵⁻¹²⁹. In den hier durchgeführten Versuchen konnte kein Einfluss auf die FAP α -Expression in HCF durch eine exogene CTGF-Stimulation nachgewiesen werden. Allerdings zeigte sich eine Tendenz zu höheren FAP α -Werten bei simultaner Stimulation der Zellen mit TGF β_1 im Vergleich zu den nur mit TGF β_1 stimulierten Zellen. Für CTGF konnte bereits beschrieben werden, dass dieses die TGF β -Bindung an dessen Rezeptor sowie den TGF β -Signalweg verstärkt und so unter anderem zur durch TGF β -induzierten Fibroblastendifferenzierung beiträgt, wahrscheinlich indem es TGF β wie ein Chaperon bindet und dessen Präsentation am Rezeptor erleichtert^{126, 130}. Durch einen ähnlichen Mechanismus ließen sich auch die hier gewonnenen Ergebnisse mit einer leichten Steigerung der FAP α -Expression bei simultaner Stimulation erklären. Die nur leichte Zunahme der FAP α -Konzentration könnte durch eine nur mäßige zusätzliche Stimulation bei bereits bestehender TGF β_1 -induzierter endogener CTGF-Produktion durch zusätzliche exogene Zugabe von CTGF erklärt werden.

TNF α ist ein proinflammatorischer Mediator, der bei Entzündungsreaktionen die Zytokinproduktion, die Aktivierung und Expression von Adhäsionsmolekülen und die Stimulation durch Wachstumsfaktoren fördert. Ferner kann durch TNF α auch über die Aktivierung von Caspasen die Apoptose induziert werden^{131, 132}. Daneben scheint TNF α die Fibrosierung von Geweben zu fördern. So wurde vor allem im Rahmen von Lungenerkrankungen eine Überexpression von TNF α mit konsekutiver Rekrutierung von Entzündungszellen, Induktion von TGF β_1 und Förderung der Myofibroblastenaktivierung beschrieben¹³³. Eine Stimulation von HASMCs (Human Aortic Smooth Muscle Cells) mit TNF α bewirkt eine erhöhte FAP α -Expression in diesen Zellen⁵². Die hier durchgeführte TNF α -Stimulation der HCFs zeigte keinen signifikanten Einfluss auf die FAP α -Expression. Bei Stimulation mit 1 ng/ml TNF α stellte sich dennoch eine leicht erhöhte FAP α -Konzentration im Vergleich zur unstimulierten Kontrollgruppe dar. Physiologisch im Serum gemessene TNF α -Konzentrationen liegen jedoch im unteren nanomolaren Bereich^{134, 135}. Es konnte beschrieben werden, dass im Gegensatz zu geringen TNF α -Konzentrationen, durch hohe Konzentrationen die Apoptose induziert werden kann¹³². Die hier durchgeführte *in vitro* Stimulation mit deutlich höheren Zytokin-Konzentrationen könnte daher zu einem reduzierten FAP α -Level geführt haben. Weiterhin ergab sich auch hier ein Trend zu leicht höheren FAP α -Werten bei gleichzeitiger Stimulation mit TGF β_1 im Vergleich zur alleinigen TNF α -Stimulation in niedriger Kon-

zentration. Auch bei diesem Ergebnis wäre ein Zusammenspiel des TGF β ₁- und des TNF α -Signalwegs möglich, das zu einer gesteigerten FAP α -Expression führt. Auch konnte bereits in Fibroblasten der Lunge die Induktion von TGF β durch TNF α -Stimulation nachgewiesen werden^{136, 137}. Im Rahmen dieser Ergebnisse wäre ein möglicher Erklärungsversuch der gesteigerten FAP α -Konzentration in den durchgeführten Experimenten durch TNF α -abhängige Induktion von TGF β und konsekutive TGF β -abhängige FAP α -Expression gegeben. Dennoch bleibt der TNF α -Signalweg sehr komplex und trotz intensiver Forschung nicht vollständig geklärt, sodass auch im Einklang mit der aktuellen Forschung ein möglicher Effekt von TNF α auf die FAP α -Expression in HCFs nicht gezeigt werden kann.

4.4 Strukturvariabilität von FAP α

Die Sensitivität zur Detektion von Proteinen im ELISA ist der des Western Blots deutlich überlegen. Allerdings lässt die elektrophoretische Auftrennung der Proteine im Western Blot Rückschlüsse auf das Molekulargewicht der von den spezifischen Antikörpern markierten Banden zu. So bleibt letztendlich die Frage offen, ob das im Überstand detektierte Protein ausschließlich intaktes FAP α ist, oder ob hier auch Isoformen oder Bruchstücke von FAP α nachgewiesen werden und, falls dies der Fall ist, inwiefern diese abgewandelten Formen auch katalytische Aktivität aufweisen. Eine Detektion von FAP α im reinen Zellkulturüberstand mittels Western Blot ist aufgrund der niedrigeren Sensitivität nicht möglich, sodass hier zunächst Aufreinigungsverfahren angewandt werden müssten.

Deshalb wurden zunächst Western Blots eingesetzt, um FAP α zusätzlich zum ELISA in den Zelllysaten nachzuweisen. Hierbei fiel beim Western Blot der mit FAP α siRNA transfizierten HCF mit dem Antikörper ab54651, der Kreuzreaktivität zu DPP-IV besitzt, auf, dass sich in den Kontrollproben 3 Banden mit unterschiedlichen Molekulargewichten detektieren ließen: DPP-IV markierte mit 105 kDa die oberste Bande, FAP α wurde auf Höhe von 88 kDa detektiert. Die dritte Bande mit ca. 27 kDa ließ sich nicht sicher zuordnen. Sowohl FAP α als auch die unterste Bande waren in den Zellen, in denen FAP α herunterreguliert war, nicht nachzuweisen.

In der humanen Melanom-Zelllinie LOX wurde eine Splice-Variante von FAP α beschrieben, deren codiertes Protein mit 239 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 27 kDa mit der C-terminalen katalytischen Region des membrangebundenen FAP α

übereinstimmt⁸⁰. Daher wäre es denkbar, dass auch die im Western Blot detektierte Proteinbande mit einer Molekularmasse von ~ 27 kDa der alternativen Splicing-Form entspricht. Auch bei murinem FAP α wurde bereits alternatives Splicing beschrieben und durch Sequenzierung von RT-PCR-Produkten konnten drei verschiedene Splice-Varianten gefunden werden¹³⁸. Ferner könnte es sich bei dem unbekanntem Protein mit dem Molekulargewicht von 27 kDa um ein proteolytisches Spaltprodukt von FAP α handeln. Inwieweit die verkürzte FAP α -Form weiterhin proteolytische Aktivität aufweist, ist bisher nicht bekannt und Gegenstand weiterer Forschung. So konnte gezeigt werden, dass rekombinant hergestelltes FAP ohne zytoplasmatische und transmembranäre Domäne mit einer Molekularmasse von 160 kDa durch EDTA-sensitive Proteasen zu gekürzten Formen (100 - 85 und 70 - 50 kDa Molekularmasse) umgewandelt wird, bei denen die katalytische Aktivität weiterhin erhalten ist. In Zymographie-Assays zeigten diese sogar eine 7-fache Steigerung der Gelatinaseaktivität im Vergleich zum Wildtyp-FAP, was die Vermutung nahelegte, dass durch die N-terminale Abspaltung die sterische Behinderung für dieses Substrat verringert werden könnte¹¹².

Diese Daten deuten auf eine große Strukturvariabilität des bisher als Membranprotein bekannten FAP α hin, einerseits durch alternative Splice-Vorgänge, andererseits durch proteolytische Spaltung des Enzyms. Vor dem Hintergrund, dass auch die verkürzten Formen katalytische Aktivität besitzen und dass diese darüber hinaus sogar im Vergleich zur Wildtyp-Form verstärkt sein kann, lässt sich auch die Funktion von FAP α in Zellkulturüberständen neu interpretieren. Welche Rolle von den HCF sezerniertes FAP α für die Degradation der Extrazellulärmatrix spielt, bleibt weiterhin offen.

4.5 Etablierung eines FAP α -ELISA für humanes Plasma

Der etablierte FAP α -ELISA für humane Plasmaproben lieferte in Validierungsschritten reproduzierbare Werte mit akzeptablen Abweichungen der prozentualen Wiederfindung. Durch Erhöhen der Erstantikörperkonzentration auf 2 $\mu\text{g/ml}$ konnte die Wiederfindungsrate im Plasma ohne bemerkbare Anhebung des Hintergrundsignals signifikant verbessert werden. Eine weitere Konzentrationssteigerung auf 3 $\mu\text{g/ml}$ erbrachte keine zusätzliche Verbesserung des Signals. Durch Analyse der Spike-Wiederfindung konnte gezeigt werden, dass die FAP α -Detektion im Plasma nicht von einem Unterschied des Reagent Diluents zum Plasma beeinflusst wird, da der Spike sowohl in Reagent Diluent als auch in der Probe zuverlässig mit einer akzeptablen Abweichung der Werte im Rahmen von 80 - 120 % erkannt wurde. Die Parallelität der verdünnten Proben zur

Standardkurve, also die Vorhersagbarkeit der Wiederfindung des Spikes oder der Probe bei bekannten Verdünnungen, zeigte ebenfalls im Rahmen des ELISA-Detektionsrahmens akzeptable Werte.

Warum EDTA-Plasmaproben im FAP α -ELISA eine bessere Wiederfindungsrate als Serumproben zeigen, ist nicht geklärt. Ein interessanter Aspekt ist, dass *in vitro* die Spaltung von FAP α in verkürzte, ebenfalls proteolytisch aktive Formen durch EDTA-sensitive Proteasen demonstriert werden konnte¹¹². So könnte die Anwesenheit von EDTA in den Plasmaproben eine Stabilisierung des FAP α -Proteins bewirken. Für das FAP α -Protein können eine Reihe möglicher Schnittstellen durch verschiedene Enzyme mit Hilfe spezieller Software (PeptideCutter, ExPASy, http://web.expasy.org/peptide_cutter) vorhergesagt werden, die unter anderem Schnittstellen für Faktor Xa und Thrombin beinhalten. Diese Enzyme sind während der calciumabhängigen Gerinnung, die für die Gewinnung von Serumproben erforderlich ist, aktiv. Daher wäre auch durch diese Enzyme eine proteolytische Degradation von FAP α denkbar, die in Anwesenheit von EDTA gehemmt wird.

Im Rahmen der Präanalytik wurde untersucht, inwiefern sich die Lagerungsbedingungen auf die gemessene FAP α -Konzentration im Plasma auswirken. Weder wiederholte Einfrier- und Auftau-Zyklen, noch die mehrtägige Lagerung der Proben bei 4°C oder bei Raumtemperatur bewirkten ausgeprägte Messwertschwankungen. Als Qualitätsmaß in der Bestimmung der FAP α -Plasmaspiegel wurden weiterhin Intra- und Interassay-Variabilität von vier gepoolten Plasmaproben bestimmt. Die prozentualen relativen Standardabweichungen der gemessenen FAP α -Spiegel lagen für die Intra- und Inter-Assay-Variabilität in einem akzeptablen Bereich im Rahmen der Messungenauigkeit. Interessanterweise waren diese Werte jeweils für die Proben mit der höchsten (S4) und der niedrigsten (S1) FAP α -Konzentration höher als für die mittleren Konzentrationen (S2 und S3), wahrscheinlich auf Grund der Tatsache, dass diese näher an den Bestimmungsgrenzen des ELISAs lagen.

4.6 FAP α als potentieller prognostischer Marker in ACS-Patienten

Im Rahmen der Messungen der FAP α -Plasmaspiegel mittels ELISA zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Werten der gesunden Blutspendergruppe und der Patientengruppe mit akutem Koronarsyndrom. Wie im Studienaufbau vorgesehen gliederten sich die beiden Gruppen im Geschlechterverhältnis, allerdings lag sowohl das me-

diane als auch das mittlere Alter der Blutspender deutlich unter dem der Patientengruppe. Daher ist ein direkter Vergleich dieser beiden Gruppen nur bedingt möglich, jedoch ergab sich in der statistischen Auswertung kein Hinweis auf eine Korrelation der FAP α -Konzentration mit dem Alter. Ebenfalls zu bedenken ist der Aspekt, dass für die Probanden der Blutspendergruppe bis auf eine „Momentaufnahme“ ihrer FAP α -Konzentration zum Zeitpunkt des Blutspendens keine weiteren Informationen, insbesondere über etwaige kardiovaskuläre Neuerkrankungen in der Folge, vorlagen. Innerhalb der ACS-Gruppe konnte eine Korrelation niedriger FAP α -Konzentrationen mit einer erhöhten Mortalität während des Ein-Jahres-Überwachungszeitraums sowie mit einem erhöhten CRP und zum Nikotinkonsum gezeigt werden. Es ist bekannt, dass die Höhe des CRP-Wertes eine Aussage zur Risikostratifizierung zukünftiger kardiovaskulärer Erkrankungen zulässt. Auch ist eine Assoziation erhöhter CRP-Werte mit gesteigerter Mortalität nach Myokardinfarkt bekannt¹³⁹⁻¹⁴¹. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass erhöhte Werte von humanem CRP bei transgenen Mäusen zu gesteigerter kardialer Fibrose bei Hypertension führen¹⁴². Insofern ist eine hier nachgewiesene inverse Korrelation von FAP α und CRP, das bereits als kardiovaskulärer Marker zur Prognoseeinschätzung nach Infarkten eingesetzt wird, sehr interessant. Patienten mit stabiler KHK zeigten hingegen keine Änderung der FAP α -Plasmaspiegel im Vergleich zur gesunden Blutspendergruppe.

Aufgrund der erhobenen Daten stellt sich die Frage, inwieweit zirkulierendes FAP α als Biomarker für Myokardinfarkte oder zur Prognoseabschätzung beim akuten Koronarsyndrom nützlich sein kann. Die Assoziation deutlich erniedrigter FAP α -Plasmaspiegel mit einer erhöhten Mortalität im Ein-Jahres-Zeitintervall bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom deutet darauf hin, dass FAP α im Rahmen eines kardiovaskulären Ereignisses herabreguliert wird und diese Herabregulation längerfristige Konsequenzen haben könnte. Ob hierbei der Pathomechanismus durch das erniedrigte FAP α selbst reguliert wird, oder ob dessen Expression nur sekundär reduziert wird, ist nicht geklärt. Bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang eine kürzlich erschienene Arbeit von Javidroozi *et al.*, die in ihrer Studie eine Reduktion der FAP α -Serumspiegel bei einem Patientenkollektiv mit malignen Grunderkrankungen im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe sowie eine inverse Korrelation der Serumspiegel mit dem Überleben der Patienten zeigen konnten¹⁴³.

Diese Beobachtungen stehen allerdings im Gegensatz zur bisher untersuchten FAP α -Expression im Herzen nach Myokardinfarkt, wo eine deutliche FAP α -Überexpression nachgewiesen werden konnte⁵³. Insofern scheint das FAP α im Plasma mit dem FAP α im Gewebe nicht direkt in Verbindung zu stehen. Daher sollte die Frage geklärt werden, wodurch bei ACS-Patienten die im Vergleich zur Blutspendergruppe erniedrigten FAP α -Konzentrationen im Plasma entstanden sein könnten. Eine iatrogen herbeigeführte FAP α -Konzentrationsminderung, zum Beispiel durch eine medikamentöse Intervention bei den ACS-Patienten, kann hier nicht beiseite gelassen werden. So ist eine Interaktion eines Medikaments mit FAP α selbst oder den Zellen, die dieses exprimieren, nicht auszuschließen, was in einer Reduktion des gemessenen FAP α im Plasma resultieren könnte. Die gängigen Standardtherapeutika zur Behandlung der koronaren Herzkrankheit scheinen jedoch keinen Einfluss auf die FAP α -Plasmaspiegel zu besitzen, da sich die Werte der Patienten mit stabiler KHK nicht von denen der Blutspendergruppe unterscheiden. Auch zeigt die Korrelation niedriger FAP α -Spiegel zur Mortalität, zur Höhe des CRP und zum Rauchen in der ACS-Gruppe einen Effekt, der einen Pathomechanismus niedriger FAP α -Konzentrationen nahe legt.

Dennoch bleibt auf Grund fehlender Daten die Frage offen, ob FAP α zunächst schon vor einem kardiovaskulären Ereignis, zum Beispiel als Marker einer schwerwiegenden Atherosklerose, erniedrigt war, oder ob es im Anschluss daran reaktiv zur Reduktion der FAP α -Plasmaspiegel kam.

Die biologische Funktion von zirkulierendem FAP α /APCE bleibt weiter im Hinblick auf erniedrigte Spiegel nach kardiovaskulären Ereignissen oder als prognostischer Marker für zukünftige Ereignisse zu klären. Darüber hinaus bleibt die Herkunft des zirkulierenden FAP α /APCE offen. Zwar konnte gezeigt werden, dass dieses von aktivierten Fibroblasten synthetisiert wird und auch im Zellkulturüberstand nachweisbar ist, doch erklärt dies weder eine erhöhte FAP α -Konzentration in Gesunden noch erniedrigte Spiegel in ACS-Patienten. Zirkulierendes und gewebeexprimiertes FAP α scheinen nicht voneinander abhängig zu sein.

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmalig im Hinblick auf den Signalweg zu Expression von FAP α gezeigt werden, dass die TGF β ₁-induzierte FAP α -Expression Smad-3-abhängig verläuft. Weiterhin wurde im Rahmen der Arbeit ein ELISA zur quantitativen Messung von humanem FAP α im Plasma etabliert. Durch Anwendung dieses ELISA konnte erstmalig die FAP α -Konzentrationen eines Kollektivs von Patienten mit akutem

Koronarsyndrom sowie einer gesunden Kontrollgruppe gemessen werden. Hier zeigte sich ein signifikanter Unterschied der FAP α -Konzentrationen zwischen den beiden Gruppen, weiterhin konnte eine Assoziation von erniedrigten FAP α -Werten mit einer erhöhten Mortalität beschrieben werden ¹⁰⁸.

5. Zusammenfassung

FAP α ist ein Membranglykoprotein mit Dipeptidyl-Peptidase- und Typ I Kollagenase-Aktivität, das eine wichtige Rolle im Rahmen des Gewebeumbaus und der Angiogenese spielt. Die Expression von FAP α wurde für eine Reihe von Geweben gezeigt. So konnte bereits gezeigt werden, dass FAP α nach Myokardinfarkt auf humanen kardialen Fibroblasten (HCF) verstärkt exprimiert wird. Ausgehend von der Erkenntnis, dass eine im Blut zirkulierende Form von FAP α , APCE, gefunden wurde, sollte in der vorliegenden Arbeit eine mögliche Assoziation des in HCF exprimierten FAP α mit dem zirkulierenden APCE untersucht werden. Hierfür wurden ebenfalls die Signalwege, die zur Induktion von FAP α führen, näher untersucht.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass das von humanen kardialen Fibroblasten exprimierte FAP α ebenfalls im Zellkulturüberstand nachgewiesen werden kann. Wie bereits beschrieben führte eine Stimulation mit TGF β ₁ zur Expression von FAP α . Diese ist abhängig von Smad-3 und konnte durch Zugabe des Inhibitors SB431542 blockiert werden. Auch Smad-2 scheint die FAP α -Expression zu beeinflussen. Ein Effekt von EGR-1, CTGF und TNF α auf die FAP α -Expression konnte hingegen nicht nachgewiesen werden.

Darüber hinaus wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit ein ELISA zur Messung von humanem FAP α im Plasma erstmalig etabliert. In der Evaluation des ELISA wurden die Grenzwerte für die Detektion und Quantifizierung bestimmt, die Intra- und Intervariabilität des ELISAs berechnet und die Linearität der Wiederfindung von humanem rekombinantem FAP α bewertet, sowie die Stabilität von FAP α nach mehrfachen Einfrier-Auftau-Zyklen und nach der Lagerung bei verschiedenen Temperaturen evaluiert. Da hier nur kommerziell erwerbliche Materialien verwendet wurden, ist eine Anwendung durch Dritte leicht durchführbar.

Es wurde weiterhin eine klinische Studie zur Messung der FAP α -Plasmaspiegel in 101 gesunden Blutspendern und 407 Patienten mit akutem Koronarsyndrom (ACS) sowie von 25 Patienten mit stabiler koronarer Herzerkrankung (KHK) durchgeführt. Hierbei konnten erstmals Referenzwerte für zirkulierendes FAP α im Plasma beschrieben werden. Die FAP α -Plasmaspiegel der gesunden Kontrollgruppe unterschieden sich nicht von denen der Patienten mit stabiler KHK. Bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom war die FAP α -Konzentration im Vergleich mit den FAP α -Plasmaspiegeln der Kontroll-

gruppe hingegen signifikant erniedrigt. Auch zeigte sich bei den Patienten mit FAP α -Spiegeln im kleinsten Quartil eine erhöhte Mortalität. Die biologische Funktion von FAP α bzw. dessen mögliche Pathophysiologie im Rahmen eines ACS sowie die mit niedrigen FAP α -Spiegeln assoziierte Mortalität sind noch unklar und bleiben Gegenstand der weiteren Forschung.

6. Literatur

1. Statistisches Bundesamt Wiesbaden, *Gesundheit - Krankheitskosten 2002, 2004, 2006 und 2008*, Destatis, Editor. 2010.
2. Lloyd-Jones DM, Larson MG et al., *Lifetime risk of developing coronary heart disease*. *Lancet*, 1999. **353**(9147): p. 89-92.
3. Lange C und Ziese T, *Prävalenz der koronaren Herzerkrankung*, in *Beiträge zur Gesundheitsberichterstattung des Bundes*. 2009, Robert Koch Institut.
4. Lloyd-Jones D, Adams RJ et al., *Executive summary: heart disease and stroke statistics--2010 update: a report from the American Heart Association*. *Circulation*, 2010. **121**(7): p. 948-54.
5. Murray CJ und Lopez AD, *Alternative projections of mortality and disability by cause 1990-2020: Global Burden of Disease Study*. *Lancet*, 1997. **349**(9064): p. 1498-504.
6. Murray CJ und Lopez AD, *Mortality by cause for eight regions of the world: Global Burden of Disease Study*. *Lancet*, 1997. **349**(9061): p. 1269-76.
7. Hahn J, *Checkliste Innere Medizin*. Vol. 6. 2010: Thieme.
8. Herold Gea, *Innere Medizin*. 2010.
9. Hamm CW, Bassand JP et al., *ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation: The Task Force for the management of acute coronary syndromes (ACS) in patients presenting without persistent ST-segment elevation of the European Society of Cardiology (ESC)*. *Eur Heart J*, 2011. **32**(23): p. 2999-3054.
10. Hansson GK, Robertson AK und Soderberg-Naucler C, *Inflammation and atherosclerosis*. *Annu Rev Pathol*, 2006. **1**: p. 297-329.
11. Hansson GK, *Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease*. *N Engl J Med*, 2005. **352**(16): p. 1685-95.
12. Sary HC, Chandler AB et al., *A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association*. *Circulation*, 1995. **92**(5): p. 1355-74.
13. Sary HC, Chandler AB et al., *A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association*. *Circulation*, 1994. **89**(5): p. 2462-78.
14. Kume N, Cybulsky MI und Gimbrone MA, Jr., *Lysophosphatidylcholine, a component of atherogenic lipoproteins, induces mononuclear leukocyte adhesion molecules in cultured human and rabbit arterial endothelial cells*. *J Clin Invest*, 1992. **90**(3): p. 1138-44.
15. Hansson GK, *Inflammatory mechanisms in atherosclerosis*. *J Thromb Haemost*, 2009. **7 Suppl 1**: p. 328-31.
16. Skalen K, Gustafsson M et al., *Subendothelial retention of atherogenic lipoproteins in early atherosclerosis*. *Nature*, 2002. **417**(6890): p. 750-4.
17. Kovanen PT, Kaartinen M und Paavonen T, *Infiltrates of activated mast cells at the site of coronary atheromatous erosion or rupture in myocardial infarction*. *Circulation*, 1995. **92**(5): p. 1084-8.
18. Mewis C, Spyridopoulos, I., Riessen, R., *Kardiologie compact: Alles für Station und Facharztprüfung*. 2006.

19. Ait-Oufella H, Salomon BL et al., *Natural regulatory T cells control the development of atherosclerosis in mice*. Nat Med, 2006. **12**(2): p. 178-80.
20. Lutgens E, Gijbels M et al., *Transforming growth factor-beta mediates balance between inflammation and fibrosis during plaque progression*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2002. **22**(6): p. 975-82.
21. Mallat Z, Gojova A et al., *Inhibition of transforming growth factor-beta signaling accelerates atherosclerosis and induces an unstable plaque phenotype in mice*. Circ Res, 2001. **89**(10): p. 930-4.
22. Robertson AK, Rudling M et al., *Disruption of TGF-beta signaling in T cells accelerates atherosclerosis*. J Clin Invest, 2003. **112**(9): p. 1342-50.
23. Gojova A, Brun V et al., *Specific abrogation of transforming growth factor-beta signaling in T cells alters atherosclerotic lesion size and composition in mice*. Blood, 2003. **102**(12): p. 4052-8.
24. Ross R, *Atherosclerosis--an inflammatory disease*. N Engl J Med, 1999. **340**(2): p. 115-26.
25. Cohn JN, Ferrari R und Sharpe N, *Cardiac remodeling--concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. Behalf of an International Forum on Cardiac Remodeling*. J Am Coll Cardiol, 2000. **35**(3): p. 569-82.
26. Lindahl B, Toss H et al., *Markers of myocardial damage and inflammation in relation to long-term mortality in unstable coronary artery disease. FRISC Study Group. Fragmin during Instability in Coronary Artery Disease*. N Engl J Med, 2000. **343**(16): p. 1139-47.
27. Antman EM, Tanasijevic MJ et al., *Cardiac-specific troponin I levels to predict the risk of mortality in patients with acute coronary syndromes*. N Engl J Med, 1996. **335**(18): p. 1342-9.
28. Luscher MS, Thygesen K et al., *Applicability of cardiac troponin T and I for early risk stratification in unstable coronary artery disease. TRIM Study Group. Thrombin Inhibition in Myocardial ischemia*. Circulation, 1997. **96**(8): p. 2578-85.
29. Toss H, Lindahl B et al., *Prognostic influence of increased fibrinogen and C-reactive protein levels in unstable coronary artery disease. FRISC Study Group. Fragmin during Instability in Coronary Artery Disease*. Circulation, 1997. **96**(12): p. 4204-10.
30. Danesh J, Collins R et al., *Association of fibrinogen, C-reactive protein, albumin, or leukocyte count with coronary heart disease: meta-analyses of prospective studies*. JAMA, 1998. **279**(18): p. 1477-82.
31. Ridker PM, Cushman M et al., *Inflammation, aspirin, and the risk of cardiovascular disease in apparently healthy men*. N Engl J Med, 1997. **336**(14): p. 973-9.
32. Park JE, Lenter MC et al., *Fibroblast activation protein, a dual specificity serine protease expressed in reactive human tumor stromal fibroblasts*. J Biol Chem, 1999. **274**(51): p. 36505-12.
33. Pineiro-Sanchez ML, Goldstein LA et al., *Identification of the 170-kDa melanoma membrane-bound gelatinase (seprase) as a serine integral membrane protease*. J Biol Chem, 1997. **272**(12): p. 7595-601.
34. O'Brien P und O'Connor BF, *Seprase: an overview of an important matrix serine protease*. Biochim Biophys Acta, 2008. **1784**(9): p. 1130-45.
35. Aertgeerts K, Levin I et al., *Structural and kinetic analysis of the substrate specificity of human fibroblast activation protein alpha*. J Biol Chem, 2005. **280**(20): p. 19441-4.

36. Rettig WJ, Chesa PG et al., *Differential expression of cell surface antigens and glial fibrillary acidic protein in human astrocytoma subsets*. Cancer Res, 1986. **46**(12 Pt 1): p. 6406-12.
37. Garin-Chesa P, Old LJ und Rettig WJ, *Cell surface glycoprotein of reactive stromal fibroblasts as a potential antibody target in human epithelial cancers*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(18): p. 7235-9.
38. Monsky WL, Lin CY et al., *A potential marker protease of invasiveness, seprase, is localized on invadopodia of human malignant melanoma cells*. Cancer Res, 1994. **54**(21): p. 5702-10.
39. Aoyama A und Chen WT, *A 170-kDa membrane-bound protease is associated with the expression of invasiveness by human malignant melanoma cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(21): p. 8296-300.
40. Bae S, Park CW et al., *Fibroblast activation protein alpha identifies mesenchymal stromal cells from human bone marrow*. Br J Haematol, 2008. **142**(5): p. 827-30.
41. Dolznig H, Schweifer N et al., *Characterization of cancer stroma markers: in silico analysis of an mRNA expression database for fibroblast activation protein and endosialin*. Cancer Immun, 2005. **5**: p. 10.
42. Keane FM, Yao TW et al., *Quantitation of fibroblast activation protein (FAP)-specific protease activity in mouse, baboon and human fluids and organs*. FEBS Open Bio, 2013. **4**: p. 43-54.
43. Rettig WJ, Garin-Chesa P et al., *Regulation and heteromeric structure of the fibroblast activation protein in normal and transformed cells of mesenchymal and neuroectodermal origin*. Cancer Res, 1993. **53**(14): p. 3327-35.
44. Brown DD, Wang Z et al., *The thyroid hormone-induced tail resorption program during Xenopus laevis metamorphosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(5): p. 1924-9.
45. Acharya PS, Zukas A et al., *Fibroblast activation protein: a serine protease expressed at the remodeling interface in idiopathic pulmonary fibrosis*. Hum Pathol, 2006. **37**(3): p. 352-60.
46. Levy MT, McCaughan GW et al., *Fibroblast activation protein: a cell surface dipeptidyl peptidase and gelatinase expressed by stellate cells at the tissue remodelling interface in human cirrhosis*. Hepatology, 1999. **29**(6): p. 1768-78.
47. Levy MT, McCaughan GW et al., *Intrahepatic expression of the hepatic stellate cell marker fibroblast activation protein correlates with the degree of fibrosis in hepatitis C virus infection*. Liver, 2002. **22**(2): p. 93-101.
48. Dienus K, Bayat A et al., *Increased expression of fibroblast activation protein-alpha in keloid fibroblasts: implications for development of a novel treatment option*. Arch Dermatol Res, 2010. **302**(10): p. 725-31.
49. Bauer S, Jendro MC et al., *Fibroblast activation protein is expressed by rheumatoid myofibroblast-like synoviocytes*. Arthritis Res Ther, 2006. **8**(6): p. R171.
50. Ibrahim SM, Koczan D und Thiesen HJ, *Gene-expression profile of collagen-induced arthritis*. J Autoimmun, 2002. **18**(2): p. 159-67.
51. Milner JM, Kevorkian L et al., *Fibroblast activation protein alpha is expressed by chondrocytes following a pro-inflammatory stimulus and is elevated in osteoarthritis*. Arthritis Res Ther, 2006. **8**(1): p. R23.
52. Brokopp CE, Schoenauer R et al., *Fibroblast activation protein is induced by inflammation and degrades type I collagen in thin-cap fibroatheromata*. Eur Heart J, 2011. **32**(21): p. 2713-22.

53. Hoffmann D, *Charakterisierung des Enzyms FAP alpha im Herzen nach Myokardinfarkt (Med. Diss.)*, in *Medizinische Klinik und Poliklinik I*. 2012, Julius-Maximilians-Universität Würzburg.
54. Wesley UV, Albino AP et al., *A role for dipeptidyl peptidase IV in suppressing the malignant phenotype of melanocytic cells*. *J Exp Med*, 1999. **190**(3): p. 311-22.
55. Ramirez-Montagut T, Blachere NE et al., *FAPalpha, a surface peptidase expressed during wound healing, is a tumor suppressor*. *Oncogene*, 2004. **23**(32): p. 5435-46.
56. Cheng JD, Dunbrack RL, Jr. et al., *Promotion of tumor growth by murine fibroblast activation protein, a serine protease, in an animal model*. *Cancer Res*, 2002. **62**(16): p. 4767-72.
57. Goodman JD, Rozypal TL und Kelly T, *Seprase, a membrane-bound protease, alleviates the serum growth requirement of human breast cancer cells*. *Clin Exp Metastasis*, 2003. **20**(5): p. 459-70.
58. Huang Y, Wang S und Kelly T, *Seprase promotes rapid tumor growth and increased microvessel density in a mouse model of human breast cancer*. *Cancer Res*, 2004. **64**(8): p. 2712-6.
59. Aimes RT, Zijlstra A et al., *Endothelial cell serine proteases expressed during vascular morphogenesis and angiogenesis*. *Thromb Haemost*, 2003. **89**(3): p. 561-72.
60. Border WA und Noble NA, *Transforming growth factor beta in tissue fibrosis*. *N Engl J Med*, 1994. **331**(19): p. 1286-92.
61. Leask A und Abraham DJ, *TGF-beta signaling and the fibrotic response*. *FASEB J*, 2004. **18**(7): p. 816-27.
62. Massague J, *TGF-beta signal transduction*. *Annu Rev Biochem*, 1998. **67**: p. 753-91.
63. Hartsough MT und Mulder KM, *Transforming growth factor-beta signaling in epithelial cells*. *Pharmacol Ther*, 1997. **75**(1): p. 21-41.
64. Varga J und Jimenez SA, *Stimulation of normal human fibroblast collagen production and processing by transforming growth factor-beta*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1986. **138**(2): p. 974-80.
65. Overall CM, Wrana JL und Sodek J, *Independent regulation of collagenase, 72-kDa progelatinase, and metalloendoproteinase inhibitor expression in human fibroblasts by transforming growth factor-beta*. *J Biol Chem*, 1989. **264**(3): p. 1860-9.
66. Roberts AB, Anzano MA et al., *Type beta transforming growth factor: a bifunctional regulator of cellular growth*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1985. **82**(1): p. 119-23.
67. Dean RG, Balding LC et al., *Connective tissue growth factor and cardiac fibrosis after myocardial infarction*. *J Histochem Cytochem*, 2005. **53**(10): p. 1245-56.
68. Deten A, Holzl A et al., *Changes in extracellular matrix and in transforming growth factor beta isoforms after coronary artery ligation in rats*. *J Mol Cell Cardiol*, 2001. **33**(6): p. 1191-207.
69. Bujak M und Frangogiannis NG, *The role of TGF-beta signaling in myocardial infarction and cardiac remodeling*. *Cardiovasc Res*, 2007. **74**(2): p. 184-95.
70. Rettig WJ, Su SL et al., *Fibroblast activation protein: purification, epitope mapping and induction by growth factors*. *Int J Cancer*, 1994. **58**(3): p. 385-92.
71. Chen H, Yang WW et al., *TGF-beta induces fibroblast activation protein expression; fibroblast activation protein expression increases the proliferation,*

- adhesion, and migration of HO-8910PM [corrected]. Exp Mol Pathol, 2009. 87(3): p. 189-94.*
72. Goldstein LA, Gherzi G et al., *Molecular cloning of seprase: a serine integral membrane protease from human melanoma. Biochim Biophys Acta, 1997. 1361(1): p. 11-9.*
 73. Zucker S und Chen WT, *Cell Surface Proteases. Current Topics in Developmental Biology. 2003: Academic Press.*
 74. De Meester I, Korom S et al., *CD26, let it cut or cut it down. Immunol Today, 1999. 20(8): p. 367-75.*
 75. Cordero OJ, Imbernon M et al., *Potential of soluble CD26 as a serum marker for colorectal cancer detection. World J Clin Oncol, 2011. 2(6): p. 245-61.*
 76. Matic IZ, Ethordic M et al., *Serum activity of DPPIV and its expression on lymphocytes in patients with melanoma and in people with vitiligo. BMC Immunol, 2012. 13: p. 48.*
 77. Scanlan MJ, Raj BK et al., *Molecular cloning of fibroblast activation protein alpha, a member of the serine protease family selectively expressed in stromal fibroblasts of epithelial cancers. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. 91(12): p. 5657-61.*
 78. Gherzi G, Dong H et al., *Regulation of fibroblast migration on collagenous matrix by a cell surface peptidase complex. J Biol Chem, 2002. 277(32): p. 29231-41.*
 79. Gherzi G, Zhao Q et al., *The protease complex consisting of dipeptidyl peptidase IV and seprase plays a role in the migration and invasion of human endothelial cells in collagenous matrices. Cancer Res, 2006. 66(9): p. 4652-61.*
 80. Goldstein LA und Chen WT, *Identification of an alternatively spliced seprase mRNA that encodes a novel intracellular isoform. J Biol Chem, 2000. 275(4): p. 2554-9.*
 81. Lee KN, Jackson KW et al., *Antiplasmin-cleaving enzyme is a soluble form of fibroblast activation protein. Blood, 2006. 107(4): p. 1397-404.*
 82. Collins PJ, McMahon G et al., *Purification, identification and characterisation of seprase from bovine serum. Int J Biochem Cell Biol, 2004. 36(11): p. 2320-33.*
 83. Mullertz S und Clemmensen I, *The primary inhibitor of plasmin in human plasma. Biochem J, 1976. 159(3): p. 545-53.*
 84. Lee KN, Jackson KW et al., *A novel plasma proteinase potentiates alpha2-antiplasmin inhibition of fibrin digestion. Blood, 2004. 103(10): p. 3783-8.*
 85. Pepper MS, Vassalli JD et al., *Urokinase-type plasminogen activator is induced in migrating capillary endothelial cells. J Cell Biol, 1987. 105(6 Pt 1): p. 2535-41.*
 86. Schafer BM, Maier K et al., *Plasminogen activation in healing human wounds. Am J Pathol, 1994. 144(6): p. 1269-80.*
 87. Goodnight SH und Hathaway WE, *Disorders of Hemostasis & Thrombosis: A Clinical Guide. Vol. 2. 2001: McGraw Hill Professional.*
 88. Kiefel V, *Transfusionsmedizin und Immunhämatologie. Vol. 4. 2011: Springer Verlag.*
 89. Kanno Y, Hirade K et al., *Lack of alpha2-antiplasmin improves cutaneous wound healing via over-released vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis in wound lesions. J Thromb Haemost, 2006. 4(7): p. 1602-10.*
 90. Lee KN, Jackson KW et al., *Why alpha-antiplasmin must be converted to a derivative form for optimal function. J Thromb Haemost, 2007. 5(10): p. 2095-104.*

91. Christiansen VJ, Jackson KW et al., *Effect of fibroblast activation protein and alpha2-antiplasmin cleaving enzyme on collagen types I, III, and IV*. Arch Biochem Biophys, 2007. **457**(2): p. 177-86.
92. Keane FM, Nadvi NA et al., *Neuropeptide Y, B-type natriuretic peptide, substance P and peptide YY are novel substrates of fibroblast activation protein-alpha*. FEBS J, 2011. **278**(8): p. 1316-32.
93. Federico C, *Natriuretic Peptide system and cardiovascular disease*. Heart Views, 2010. **11**(1): p. 10-5.
94. Heeschen C, Hamm CW et al., *N-terminal pro-B-type natriuretic peptide levels for dynamic risk stratification of patients with acute coronary syndromes*. Circulation, 2004. **110**(20): p. 3206-12.
95. Zukowska Z, Pons J et al., *Neuropeptide Y: a new mediator linking sympathetic nerves, blood vessels and immune system?* Can J Physiol Pharmacol, 2003. **81**(2): p. 89-94.
96. Kuo LE, Kitlinska JB et al., *Neuropeptide Y acts directly in the periphery on fat tissue and mediates stress-induced obesity and metabolic syndrome*. Nat Med, 2007. **13**(7): p. 803-11.
97. Elbashir SM, Harborth J et al., *Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells*. Nature, 2001. **411**(6836): p. 494-8.
98. Elbashir SM, Martinez J et al., *Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in Drosophila melanogaster embryo lysate*. EMBO J, 2001. **20**(23): p. 6877-88.
99. Cejka D, Losert D und Wacheck V, *Short interfering RNA (siRNA): tool or therapeutic?* Clin Sci (Lond), 2006. **110**(1): p. 47-58.
100. Hannon GJ und Rossi JJ, *Unlocking the potential of the human genome with RNA interference*. Nature, 2004. **431**(7006): p. 371-8.
101. Mulder KM, *Role of Ras and Mapks in TGFbeta signaling*. Cytokine Growth Factor Rev, 2000. **11**(1-2): p. 23-35.
102. Lee MK, Pardoux C et al., *TGF-beta activates Erk MAP kinase signalling through direct phosphorylation of ShcA*. EMBO J, 2007. **26**(17): p. 3957-67.
103. Levey AS, Bosch JP et al., *A more accurate method to estimate glomerular filtration rate from serum creatinine: a new prediction equation. Modification of Diet in Renal Disease Study Group*. Ann Intern Med, 1999. **130**(6): p. 461-70.
104. Zhang J, Valianou M und Cheng JD, *Identification and characterization of the promoter of fibroblast activation protein*. Front Biosci (Elite Ed). **2**: p. 1154-63.
105. Heldin CH, Miyazono K und ten Dijke P, *TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins*. Nature, 1997. **390**(6659): p. 465-71.
106. Itoh S, Itoh F et al., *Signaling of transforming growth factor-beta family members through Smad proteins*. Eur J Biochem, 2000. **267**(24): p. 6954-67.
107. Massague J, *How cells read TGF-beta signals*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2000. **1**(3): p. 169-78.
108. Tillmanns J, Widera C et al., *Circulating concentrations of fibroblast activation protein alpha in apparently healthy individuals and patients with acute coronary syndrome as assessed by sandwich ELISA*. Int J Cardiol, 2013. **168**(4): p. 3926-31.
109. Thery C, Zitvogel L und Amigorena S, *Exosomes: composition, biogenesis and function*. Nat Rev Immunol, 2002. **2**(8): p. 569-579.
110. Ji H, Erfani N et al., *Difference gel electrophoresis analysis of Ras-transformed fibroblast cell-derived exosomes*. Electrophoresis, 2008. **29**(12): p. 2660-71.

111. Raposo G, Nijman HW et al., *B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles*. J Exp Med, 1996. **183**(3): p. 1161-72.
112. Chen D, Kennedy A et al., *Activation of EDTA-resistant gelatinases in malignant human tumors*. Cancer Res, 2006. **66**(20): p. 9977-85.
113. Macias-Silva M, Abdollah S et al., *MADR2 is a substrate of the TGFbeta receptor and its phosphorylation is required for nuclear accumulation and signaling*. Cell, 1996. **87**(7): p. 1215-24.
114. Zhang Y, Feng X et al., *Receptor-associated Mad homologues synergize as effectors of the TGF-beta response*. Nature, 1996. **383**(6596): p. 168-72.
115. Nakao A, Imamura T et al., *TGF-beta receptor-mediated signalling through Smad2, Smad3 and Smad4*. EMBO J, 1997. **16**(17): p. 5353-62.
116. Brown KA, Pietenpol JA und Moses HL, *A tale of two proteins: differential roles and regulation of Smad2 and Smad3 in TGF-beta signaling*. J Cell Biochem, 2007. **101**(1): p. 9-33.
117. Nakao A, Roijer E et al., *Identification of Smad2, a human Mad-related protein in the transforming growth factor beta signaling pathway*. J Biol Chem, 1997. **272**(5): p. 2896-900.
118. Piek E, Ju WJ et al., *Functional characterization of transforming growth factor beta signaling in Smad2- and Smad3-deficient fibroblasts*. J Biol Chem, 2001. **276**(23): p. 19945-53.
119. Datto MB, Frederick JP et al., *Targeted disruption of Smad3 reveals an essential role in transforming growth factor beta-mediated signal transduction*. Mol Cell Biol, 1999. **19**(4): p. 2495-504.
120. Roberts AB, Russo A et al., *Smad3: a key player in pathogenetic mechanisms dependent on TGF-beta*. Ann N Y Acad Sci, 2003. **995**: p. 1-10.
121. Laping NJ, Grygielko E et al., *Inhibition of transforming growth factor (TGF)-beta1-induced extracellular matrix with a novel inhibitor of the TGF-beta type I receptor kinase activity: SB-431542*. Mol Pharmacol, 2002. **62**(1): p. 58-64.
122. Favata MF, Horiuchi KY et al., *Identification of a novel inhibitor of mitogen-activated protein kinase kinase*. J Biol Chem, 1998. **273**(29): p. 18623-32.
123. Pelicci G, Lanfrancone L et al., *A novel transforming protein (SHC) with an SH2 domain is implicated in mitogenic signal transduction*. Cell, 1992. **70**(1): p. 93-104.
124. Cao XM, Koski RA et al., *Identification and characterization of the Egr-1 gene product, a DNA-binding zinc finger protein induced by differentiation and growth signals*. Mol Cell Biol, 1990. **10**(5): p. 1931-9.
125. Duncan MR, Frazier KS et al., *Connective tissue growth factor mediates transforming growth factor beta-induced collagen synthesis: down-regulation by cAMP*. FASEB J, 1999. **13**(13): p. 1774-86.
126. Garrett Q, Khaw PT et al., *Involvement of CTGF in TGF-beta1-stimulation of myofibroblast differentiation and collagen matrix contraction in the presence of mechanical stress*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2004. **45**(4): p. 1109-16.
127. Kothapalli D, Frazier KS et al., *Transforming growth factor beta induces anchorage-independent growth of NRK fibroblasts via a connective tissue growth factor-dependent signaling pathway*. Cell Growth Differ, 1997. **8**(1): p. 61-8.
128. Kothapalli D, Hayashi N und Grotendorst GR, *Inhibition of TGF-beta-stimulated CTGF gene expression and anchorage-independent growth by cAMP identifies a CTGF-dependent restriction point in the cell cycle*. FASEB J, 1998. **12**(12): p. 1151-61.

129. Grotendorst GR, Rahmanie H und Duncan MR, *Combinatorial signaling pathways determine fibroblast proliferation and myofibroblast differentiation*. FASEB J, 2004. **18**(3): p. 469-79.
130. Abreu JG, Ketpura NI et al., *Connective-tissue growth factor (CTGF) modulates cell signalling by BMP and TGF-beta*. Nat Cell Biol, 2002. **4**(8): p. 599-604.
131. Hehlhans T und Pfeffer K, *The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games*. Immunology, 2005. **115**(1): p. 1-20.
132. Wajant H, Pfizenmaier K und Scheurich P, *Tumor necrosis factor signaling*. Cell Death Differ, 2003. **10**(1): p. 45-65.
133. Sime PJ, Marr RA et al., *Transfer of tumor necrosis factor-alpha to rat lung induces severe pulmonary inflammation and patchy interstitial fibrogenesis with induction of transforming growth factor-beta1 and myofibroblasts*. Am J Pathol, 1998. **153**(3): p. 825-32.
134. Gurrola-Diaz CM, Sanchez-Enriquez S et al., *Establishment of a cut-point value of serum TNF-alpha levels in the metabolic syndrome*. J Clin Lab Anal, 2009. **23**(1): p. 51-6.
135. Pavese I, Satta F et al., *High serum levels of TNF-alpha and IL-6 predict the clinical outcome of treatment with human recombinant erythropoietin in anaemic cancer patients*. Ann Oncol, 2010. **21**(7): p. 1523-8.
136. Sullivan DE, Ferris M et al., *Tumor necrosis factor-alpha induces transforming growth factor-beta1 expression in lung fibroblasts through the extracellular signal-regulated kinase pathway*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2005. **32**(4): p. 342-9.
137. Sullivan DE, Ferris M et al., *TNF-alpha induces TGF-beta1 expression in lung fibroblasts at the transcriptional level via AP-1 activation*. J Cell Mol Med, 2009. **13**(8B): p. 1866-76.
138. Niedermeyer J, Scanlan MJ et al., *Mouse fibroblast activation protein: molecular cloning, alternative splicing and expression in the reactive stroma of epithelial cancers*. Int J Cancer, 1997. **71**(3): p. 383-9.
139. Pietila KO, Harmoinen AP et al., *Serum C-reactive protein concentration in acute myocardial infarction and its relationship to mortality during 24 months of follow-up in patients under thrombolytic treatment*. Eur Heart J, 1996. **17**(9): p. 1345-9.
140. Ridker PM, *C-reactive protein: eighty years from discovery to emergence as a major risk marker for cardiovascular disease*. Clin Chem, 2009. **55**(2): p. 209-15.
141. Wilson PW, Pencina M et al., *C-reactive protein and reclassification of cardiovascular risk in the Framingham Heart Study*. Circ Cardiovasc Qual Outcomes, 2008. **1**(2): p. 92-7.
142. Zhang R, Zhang YY et al., *C-reactive protein promotes cardiac fibrosis and inflammation in angiotensin II-induced hypertensive cardiac disease*. Hypertension, 2010. **55**(4): p. 953-60.
143. Javidroozi M, Zucker S und Chen WT, *Plasma seprase and DPP4 levels as markers of disease and prognosis in cancer*. Dis Markers, 2012. **32**(5): p. 309-20.

7. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung des FAP α -ELISA.....	18
Abbildung 2: Exemplarische Darstellung einer Standardkurve	19
Abbildung 3: FAP α im Zellkulturüberstand und Lysat nach konzentrationsabhängiger TGF β -Stimulation.....	25
Abbildung 4: FAP α -Konzentration im HCF-Lysat nach zeitabhängiger TGF β -Stimulation	26
Abbildung 5: FAP α -Konzentration in den Zellkulturüberständen nach zeitabhängiger TGF β -Stimulation.....	27
Abbildung 6: Reduktion der FAP α -Konzentration im Lysat und Überstand nach siFAP-Transfektion.....	28
Abbildung 7: Western Blot der HCF-Lysate nach siRNA-Transfektion	29
Abbildung 8: Western Blot der mit siEGR-1 transfizierten HCF	30
Abbildung 9: FAP α -Konzentration der HCF-Lysate nach EGR-1-Knockdown.....	30
Abbildung 10: FAP α Western Blot der Proben vom EGR-1 Knockdown.....	31
Abbildung 11: CTGF-Stimulation hat keinen Einfluss auf die FAP α -Konzentration ...	32
Abbildung 12: TNF α hat keinen Einfluss auf die FAP α -Expression in HCF	33
Abbildung 13: FAP α -Konzentrationen nach ALK- und MEK-Inhibition	34
Abbildung 14: Smad-2 und Phospho-Smad-2 Western Blot der Proben der ALK- und MEK-Inhibition	35
Abbildung 15: Smad-3 und Phospho-Smad-3 Western Blot der Proben der ALK- und MEK-Inhibition	35
Abbildung 16: FAP α -Konzentrationen im Lysat von HCFs nach Smad-2/3-Knockdown	37
Abbildung 17: Smad-2 und Phospho-Smad-2 Western Blot der mit Smad-2- bzw. Smad-3-siRNA transfizierten HCF-Lysate	38
Abbildung 18: Smad-3 und Phospho-Smad-3 Western Blot der mit Smad-2- bzw. Smad-3-siRNA transfizierten HCF-Lysate	38

Abbildung 19: Plasma vs. Serum in der Validierung des ELISAs	40
Abbildung 20: Wiederfindungsrate der Proben bei unterschiedlichen Erstantikörper- Konzentrationen.....	41
Abbildung 21: Parallelität der Verdünnungen bei unterschiedlichen Erstantikörper- Konzentrationen.....	41
Abbildung 22: Einfluss der Lagerung bei 4° auf die gemessenen FAP α -Konzentrationen	43
Abbildung 23: Einfluss der Lagerung bei Raumtemperatur auf die gemessenen FAP α - Konzentrationen.....	43
Abbildung 24: Einfluss von mehreren Einfrier- und Auftauzyklen der Plasmaprobe auf die gemessene FAP α -Konzentration	44
Abbildung 25: FAP α -Konzentrationen nach linearer Verdünnung der Plasmaprobe ..	44
Abbildung 26: Intra- und Inter-Assay-Variabilität der ELISAs zur Messung von FAP α im Plasma	47
Abbildung 27: Darstellung der FAP α -Plasmaspiegel in der Kontrollgruppe und bei ACS-Patienten	47

Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle bei all den Personen bedanken, die mich bei der Erstellung dieser Arbeit unterstützt haben:

Ein besonderes Wort des Dankes gilt Herrn Dr. med. Jochen Tillmanns für die exzellente Betreuung und Begleitung während der gesamten Promotionsphase, den Freiraum, den er mir für die Fertigstellung der Arbeit in den letzten Monaten ließ und die Begutachtung meiner Arbeit.

Meine besondere Dankbarkeit möchte ich Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Hofmann sowie Herrn Prof. Dr. rer. medic. Samnick aussprechen für ihre Bereitschaft, sich als Referent bzw. Koreferent für die vorliegende Arbeit zur Verfügung zu stellen.

Besonderer Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. med. Bauersachs für die Bereitstellung des Themas. Auch möchte ich mich bei der gesamten AG Bauersachs - und speziell bei Frau Annette Berbner, Frau Dr. rer. nat. Daniela Fraccarollo und Herrn Dr. rer. nat. Paolo Galuppo - bedanken, die mir stets mit ihren Erfahrungen tatkräftig zur Seite standen.

Mein Dank richtet sich auch an meine Freunde Dr. rer. nat. Christina Pachel und Dr. rer. nat. Martin Chopra für den Rat bei inhaltlichen und methodischen Fragen, die immerwährende Motivation, das sorgfältige Korrekturlesen und deren Unterstützung in sämtlichen Bereichen.

Besonderer Dank gilt ebenfalls meinem Partner Lucas, der mich stets in meiner Arbeit bestärkt und mir den Rücken frei gehalten hat.

Und nicht zuletzt möchte ich meinen Eltern danken, die in jeglicher Hinsicht die Grundsteine für meinen Weg gelegt haben.

Lebenslauf

YASMIN HABBABA

Akademischer Werdegang

1996 – 2005	Klettgau Gymnasium Tiengen Abiturnote 1,2
10/05 – 07/08 02/08 – 05/08	Studium der Biomedizin an der Universität Würzburg Bachelorthesis im Institut für klinische Biochemie und Pathobiologie, Thema: „ <i>Klonierung eines Vektors zur transgenen Expression der Dihydrolipoamid-Dehydrogenase</i> “, Note 1,0
07/2008	Abschluss des Biomedizin-Studiums mit dem Akademischen Grad Bachelor of Science (B. Sc.) Abschlussnote 1,8
10/2007 – 11/2013	Studium der Humanmedizin an der Universität Würzburg
Herbst 2009	Abschluss des 1. Abschnitts der Ärztlichen Prüfung, Note 2,0
12/09 – 08/11	Experimentelle Doktorarbeit an der Medizinischen Klinik und Poliklinik I, AG Bauersachs Thema: „ <i>Rolle von zirkulierendem Fibroblast Activation Protein alpha im humanen Plasma</i> “ Publ.: Tillmanns et al., <i>Circulating concentrations of fibroblast activation protein alpha in apparently healthy individuals and patients with acute coronary syndrome as assessed by sandwich ELISA</i> . Int J Cardiol, 2013
11/2013	2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung Schriftliches Examen: Note 1, mündliches Examen: Note 1 Abschluss des Studiums der Humanmedizin, Gesamtnote: sehr gut (1,3)
Seit 01/2014	Assistenzärztin an der Universitätsklinik Würzburg, Klinik und Poliklinik für Psychiatrie, Psychotherapie und Psychosomatik