

Evaluation von GRP78 als Biomarker bei chronischen Lungenerkrankungen

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Hohen Medizinischen Fakultät

der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

Bonn

Vanessa Sophie Marggraf

aus Ahlen

2025

Angefertigt mit der Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Dirk Skowasch
2. Gutachter: PD Dr. med. Philipp Lutz

Tag der Mündlichen Prüfung: 22.01.2025

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik II – Kardiologie, Angiologie, Pneumologie

Meiner Mutter gewidmet

Inhaltsverzeichnis

	Abkürzungsverzeichnis	6
1.	Deutsche Zusammenfassung	7
1.1	Einleitung	7
1.2	Material und Methoden	9
1.3	Ergebnisse	12
1.4	Diskussion	17
1.5	Zusammenfassung	21
1.6	Literaturverzeichnis der deutschen Zusammenfassung	23
2.	Veröffentlichung	27
	Abstract	27
	Introduction	27
	Materials and Methods	28
	Results	29
	Discussion	30
	References	34
3.	Danksagung	36

Abkürzungsverzeichnis

BAL	bronchoalveoläre Lavage
COPD	Chronisch obstruktive Lungenerkrankung
CRP	C-reaktive Protein
ELISA	Englisch: <i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
ER	Endoplasmatische Retikulum
FEV1	Einsekundenkapazität, forciertes expiratorisches Volumen nach einer Sekunde
GRP78	Englisch: <i>Glucose-regulated-protein, 78kDa</i>
IL	Interleukin
ILD	Interstitielle Lungenerkrankung, Englisch: <i>Interstitial Lung Disease</i>
IPF	Idiopathische Lungenfibrose
T _H 2-Zelle	Typ-2-T-Helferzelle oder T-Helfer-2-Zelle
UPR	ungefaltete Protein-Antwort, Englisch: <i>Unfolded Protein Response</i>

1. Deutsche Zusammenfassung

1.1 Einleitung

1.1.1 Einleitung

Lungenerkrankungen wie die chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD), Asthma bronchiale oder die interstitiellen Lungenerkrankungen (ILD) betreffen einen großen Teil der internistischen Patienten. Die Anzahl an Patienten mit COPD wurde 2016 weltweit auf 251 Millionen geschätzt, die von Patienten mit einem Asthma bronchiale auf 339 Millionen und mit einer interstitiellen Lungenerkrankung (ILD) auf 3,9 Millionen (Burden of Disease Study 2016. Lancet. 2017 Sep). Diese Zahlen sind mit Sicherheit nicht absolut zu sehen, können aber einen Hinweis auf die Verbreitung dieser Erkrankungen liefern. Vor allem für die Patientenzahl mit einer ILD sind aufgrund ihrer Heterogenität nur eingeschränkte globale Zahlen vorhanden (Kaul et al., 2021).

Biomarker spielen eine entscheidende Rolle in der Medizin, da sie messbare Indikatoren liefern, die unterschiedlichen Zwecken, wie beispielsweise der Diagnose von Krankheiten, Prognose, Überwachung des Therapieansprechens und Beurteilung des Krankheitsverlaufs dienen können (Strimbu and Tavel, 2011).

Bei GRP78 (auch bekannt als Glucose-regulated-protein 78kDa, BiP oder HSPA5) handelt es sich um ein molekulares Chaperon-Protein, das eine entscheidende Rolle in der Stressantwort des endoplasmatischen Retikulums (ER) spielt (Ibrahim et al, 2019).

Chaperone sind eine Klasse von Proteinen, die bei der korrekten Faltung anderer Proteine assistieren. Ihre Rolle ist entscheidend, da die korrekte dreidimensionale Struktur eines Proteins für seine ordnungsgemäße Funktion unerlässlich ist. Chaperone helfen neu synthetisierten Proteinen, ihre richtige Konfiguration zu erreichen, oder sie falten denaturierte Proteine unter Stressbedingungen erneut. Des Weiteren spielen sie eine Rolle bei der Proteindegradierung. Eine Untergruppe von Chaperonen, die als Hitzeschockproteine bekannt sind, wird als Reaktion auf zellulären Stress, wie hohe Temperaturen oder andere Umweltbelastungen, induziert. Diese Proteine sind über verschiedene Spezies hinweg hoch konserviert und betonen die grundlegende Bedeutung

der Protein-Faltung für die zelluläre Funktion (Fink, 1999; Saibil, 2013). GRP78 gehört zu den Hitzeschockproteinen.

Das endoplasmatische Retikulum (ER) ist ein Zellorganell, das an der Synthese, Faltung und dem Transport von Proteinen beteiligt ist.

ER-Stress, oder endoplasmatischer Retikulum-Stress, bezieht sich auf einen Zustand der zellulären Dysfunktion, der auftritt, wenn es ein Ungleichgewicht zwischen der Proteinfaltungskapazität des endoplasmatischen Retikulums (ER) und der Menge an ungefalteten oder fehlgefalteten Proteinen im ER gibt. Dieses Ungleichgewicht kann durch verschiedene Bedingungen wie Nährstoffmangel, Hypoxie, Calcium-Ungleichgewicht, oxidativen Stress oder genetische Mutationen, die die Protein-Faltung beeinflussen, verursacht werden (Hetz et al., 2020; Ibrahim et al, 2019).

ER-Stress löst einen Signalweg namens ungefaltete Proteinantwort (unfolded protein response, UPR) aus, der darauf abzielt, die ER-Homöostase wiederherzustellen. Die UPR umfasst die Aktivierung spezifischer Proteine und Transkriptionsfaktoren, die die Proteinfaltung, Abbau von Proteinen und die Proteinsynthese regulieren (Chaudhari et al., 2014; Walter und Ron, 2011). Wenn der ER-Stress jedoch schwerwiegend oder anhaltend ist und nicht behoben werden kann, kann die UPR auch den programmierten Zelltod durch Apoptose auslösen (Wu und Kaufman, 2006).

Wenn das endoplasmatische Retikulum Stress erfährt, wird GRP78 hochreguliert. Seine Hauptfunktion besteht darin, bei der Faltung von Proteinen zu assistieren, um deren Aggregation zu verhindern und die korrekte Konfiguration zu fördern (Ibrahim et al, 2019; Luo und Lee, 2013). Zusätzlich dazu ist GRP78 ein Schlüsselregulator der ungefalteten Proteinantwort (UPR).

Über seine intrazellulären Funktionen hinaus wurde festgestellt, dass GRP78 auch in extrazellulären Räumen vorkommt und mit verschiedenen physiologischen und pathologischen Prozessen in Verbindung steht, darunter Krebs, neurodegenerative Erkrankungen und Herz-Kreislauf-Erkrankungen. Die Anwesenheit erhöhter Mengen von GRP78 in bestimmten Krankheiten legt nahe, dass es als Biomarker und therapeutisches Ziel dienen könnte (Dos Santos et al, 2023; Ninkovic et al., 2020).

Bereits in vorausgegangenen Studien konnte festgestellt werden, dass GRP78 als Mortalitätsprädiktor bei Patienten mit Aortenklappenstenose und kathetergestützter Herzklappenoperation dienen kann. Ein reduzierter Serumspiegel ging dabei mit einer erhöhten Mortalität einher (Aksoy et al., 2021). Des Weiteren konnte festgestellt werden, dass Patienten mit pulmonal-arterieller Hypertonie und einem erhöhten GRP78-Spiegel einen tendenziell günstigeren klinischen Verlauf hatten (Al Zaidi et al., 2022).

Wie bereits oben erwähnt führt auch Hypoxie zu ER-Stress, sodass die Spiegel von GRP78 um mehr als das Vierfache gesteigert werden können (Ibrahim et al, 2019). Auch fördern Umweltreize wie beispielsweise Nikotinkonsum oder Allergene ER-Stress.

Aufgrund dieser Erkenntnisse wurde die Hypothese aufgestellt, dass GRP78 bei Lungenerkrankungen wie beispielsweise der COPD, Asthma bronchiale oder ILD als Biomarker dienen könnte. Studien, die dies stützen, konnten bereits zeigen, dass bei chronischen Rauchern eine verstärkte GRP78-Sekretion in der bronchoalveolären Lavage nachzuweisen ist (Aksoy et al., 2017). Des Weiteren konnte der ER-Stress als Faktor bei der Entstehung von Lungenfibrose ausgemacht werden (Dickens et al., 2019).

1.1.2 Fragestellung

Die Eignung von GRP78 als Biomarker bei COPD, Asthma bronchiale oder der interstitiellen Lungenerkrankung (ILD) wurde bisher noch nicht untersucht. Ziel dieser Arbeit war es also, die GRP78-Spiegel bei Menschen mit den genannten Erkrankungen zu messen und auf eine mögliche Korrelation zur Schwere der Erkrankung hin zu untersuchen. Weitere Parameter wie beispielsweise Symptomlast wurden ebenfalls erfasst.

1.2 Material und Methoden

Probandenrekrutierung

Die Rekrutierung der Probanden erfolgte aus dem Kollektiv der Patienten der Sektion Pneumologie (Medizinische Klinik und Poliklinik II) des Universitätsklinikums Bonn. Es wurden Patienten eingeschlossen, die sich entweder ambulant zu einer routinemäßigen

Kontrolle vorstellen oder die sich in stationärer Behandlung in der Pneumologie befanden. Vor Einschluss in die Studie wurden die Teilnehmer schriftlich und mündlich aufgeklärt, eine schriftliche Einverständniserklärung wurde eingeholt. Die Studie wurde zuvor von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn genehmigt (Ethik-Votum Nr. 273/19) und folgte den Grundsätzen Deklaration von Helsinki. Alle Probanden erhielten eine Spirometrie, eine Bodyplethysmographie, eine Messung der Diffusionskapazität, eine kapilläre Blutgasanalyse sowie eine Blutabnahme. Der Einschluss der Probanden erfolgte zwischen Dezember 2020 und April 2021. Die Gesamtzahl der Teilnehmer lag bei 78. Es wurden nur Patienten eingeschlossen, die an einer gesicherten COPD, einem Asthma bronchiale oder einer ILD litten. Die Diagnose der COPD oder des Asthma bronchiale war entsprechend der bestehenden Leitlinien zum Zeitpunkt des Einschlusses gestellt worden (GOLD – Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease 2020 und GINA - Global Initiative for Asthma 2020). Die Diagnose der ILD wurde nach Vorstellung der jeweiligen Patienten im interdisziplinären ILD-Board der Universitätsklinik Bonn bestätigt.

Lungenfunktionstests und kapilläre Blutgasanalyse

Die Lungenfunktionstests bestanden aus einer Spirometrie, Bodyplethysmographie und Bestimmung der Diffusionskapazität für Kohlenmonoxid (Bodyplethysmograph Jaeger®, Alveo-Diffusionstest Jaeger®, Wuppertal, Deutschland). Sie wurden in Übereinstimmung mit den Richtlinien der European Respiratory Society (Graham et al., 2019) durchgeführt. Zur Gewährleistung einer präzisen Interpretation wurden die Parameter an standardisierte Referenzwerte angeglichen, die von der bevölkerungsbezogenen Norm abgeleitet wurden. Eine Bestimmung des Partialdrucks von Sauerstoff (pO_2) und des Partialdrucks von Kohlendioxid (pCO_2) wurde durch eine Blutprobe aus dem hyperämischen Ohrläppchen im Rahmen einer kapillären Blutgasanalyse durchgeführt.

Blutproben

Die Blutabnahmen erfolgten im Rahmen der klinischen Routine, sodass kein zusätzlicher Eingriff für die Probanden notwendig wurde.

Die Blutproben wurden nach Abnahme innerhalb von 30 Minuten verarbeitet. Die Serumisolation erfolgte mittels Zentrifugation ($1500 \times g$, 15 Minuten). Das abpipettierte Serum wurde bis zur weiteren Analyse bei -80°C gelagert. Die GRP78-Spiegel wurden mithilfe kommerziell erhältlicher Elisa-Kits analysiert (Hersteller: Enzo Life Sciences, Inc, Farmingdale, NY, USA). Im Anschluss wurde die Konzentration durch Anwendung einer logistischen Regression mit vier Parametern unter Anwendung von Graphpad Prism 9.0.0 durchgeführt. Zusätzlich wurden das hochsensitive C-reaktive Protein und ein großes Blutbild als weitere Parameter bestimmt.

Statistische Analyse

Die statistische Analyse wurde mithilfe der Programme SPSS Statistics Version 26.0 (IBM, Armonk, NY, USA) und GraphPad Prism 9.0.0 durchgeführt. Die Darstellung der Daten richtet sich nach ihrer Verteilung. Falls kontinuierliche Daten einer Normalverteilung unterliegen, wurden sie durch den Mittelwert $\pm$ Standardabweichung repräsentiert. Bei einer nicht-normalen Verteilung erfolgte die Darstellung hingegen durch den Median und den Interquartilbereich (IQR).

Der t-Test nach „Student“ (William Sealy Gosset) oder der Mann-Whitney U-Test wurden verwendet, um festzustellen, ob es einen signifikanten Unterschied zwischen den Mittelwerten von zwei Gruppen gab. Der Mann-Whitney U-Test wurde eingesetzt, wenn die Annahmen des t-Tests (die Normalverteilung der Daten) nicht erfüllt werden konnten. Zur Prüfung auf eine Normalverteilung wurde der Kolmogorow-Smirnow-Test angewendet. Der Fisher-Exakt-Test wurde zur Feststellung genutzt, ob es nicht zufällige Zusammenhänge zwischen zwei kategorialen Variablen gab. Der Pearson-Korrelationskoeffizient wurde eingesetzt, um den Grad und die Richtung der Verbindung zwischen zwei kontinuierlichen Variablen zu bewerten. Ein statistisch signifikanter Zusammenhang wurde angenommen, wenn der P-Wert unterhalb des Schwellenwerts von 0,05 lag.

1.3 Ergebnisse

Zunächst wurden wie oben beschrieben die GRP78-Spiegel gemessen. Danach wurden die Probanden in zwei Gruppen eingeteilt, abhängig von dem medianen GRP78-Plasmaspiegel von 763,6 ng/ml.

Dabei fiel auf, dass kein Unterschied der Konzentration in Bezug auf die verschiedenen Erkrankungen bestand (vgl. Abbildung 1).

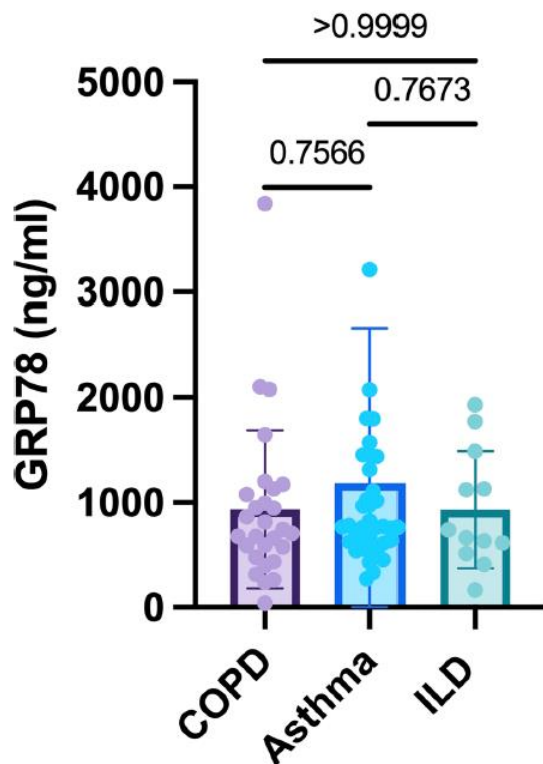


Abb. 1: GRP78-Serumspiegel in Abhängigkeit von der bestehenden pulmonalen Grunderkrankung. Abkürzungen: COPD: Chronisch obstruktive Lungenerkrankung; ILD: Interstitielle Lungenerkrankung. Modifiziert nach Al Zaidi, Marggraf et al., 2023

Die weiteren Charakteristika der Patienten zeigte ein weitgehend ausgeglichenes Geschlechterverhältnis (48,7 % weiblich). Das mittlere Alter lag bei $59,8 \pm 12,4$ Jahre. Die Gruppe der Probanden mit COPD umfasste 28 Personen (35,9%), 38 Probanden litten an Asthma bronchiale (48,7%) und 12 an einer ILD (15,4%). Bei Patienten mit einer höheren GRP78-Konzentration im Blut zeigte sich ein signifikant erhöhter Sauerstoffpartialdruck

(pO₂) in der kapillären Blutgasanalyse ($75,3 \pm 11,7$ mmHg gegenüber $67,8 \pm 15,9$ mmHg, $p = 0,02$; vgl. Tabelle 1)

Tab. 1: Die Daten werden als n (%), Mittelwert $\pm$ Standardabweichung oder Median dargestellt. Der P-Wert bezieht sich auf den Datenvergleich zwischen den Patienten, aufgeteilt nach dem medianen GRP78-Plasmaspiegel von 763,6 ng/ml (GRP78 < 763,6 ng/ml vs. GRP78 $\geq$ 763,6 ng/ml). Modifiziert nach Al Zaidi, Marggraf et al., 2023

	Probanden (n=78)	GRP78 < 763,6 ng/ml n=39	GRP78 $\geq$ 763,6 ng/ml n=39	P-Wert
Alter (Jahren)	$59,8 \pm 12,4$	$58,23 \pm 12,6$	$61,4 \pm 12,1$	0,27
weiblich	38 (48,7%)	18 (46,2%)	20 (51,3%)	0,82
Raucherstatus				
niemals	34 (43,6%)	15 (38,5%)	19 (48,7%)	0,49
ehemalig	32 (41,0%)	16 (41,0%)	16 (41,0%)	
fortgeführt	12 (15,4%)	8 (20,5%)	4 (10,3%)	
Packungsjahre	6,5 (0-40)	15 (0-40)	2 (0-40)	0,31
Kapillarblutanalyse				
pH-Wert	$7,44 \pm 0,35$	$7,44 \pm 0,03$	$7,45 \pm 0,04$	0,04
Sauerstoffpartialdruck (pO ₂) mmHG	$71,6 \pm 14,4$	$67,8 \pm 15,9$	$75,3 \pm 11,7$	0,02
Kohlenstoffdioxid-Partialdruck (pCO ₂) mmHG	$34,8 \pm 4,3$	$35,5 \pm 4,1$	$34,1 \pm 4,3$	0,17
Gehäufte Exazerbationen	44 (56,4%)	18 (46,2%)	26 (66,7%)	0,11

Die GRP78-Messung wurde auf eine Abhängigkeit der Schweregradklassifikation der spezifischen zugrunde liegenden Lungenerkrankung untersucht. Dabei konnte festgestellt werden, dass Patienten, die an einer interstitiellen Lungenerkrankung litten und eine Diffusionskapazität von kleiner 40% aufwiesen, einen signifikant niedrigeren GRP78-Spiegel hatten (524 ng/ml (226-656) gegenüber 1126 ng/ml (647–1701), $P = 0,01$, vgl. Abbildung 2). Somit korrelierten die GRP78-Spiegel bei einer interstitiellen Lungenerkrankung positiv mit der Diffusionskapazität (Pearson's $r = 0,58$, $P = 0,048$).

Der Grenzwert von 40% bei der Diffusionskapazität wurde gewählt, da unter 40% klinisch zwischen einer mäßigen und einer schwergradigen Störung der Diffusionskapazität unterschieden wird.

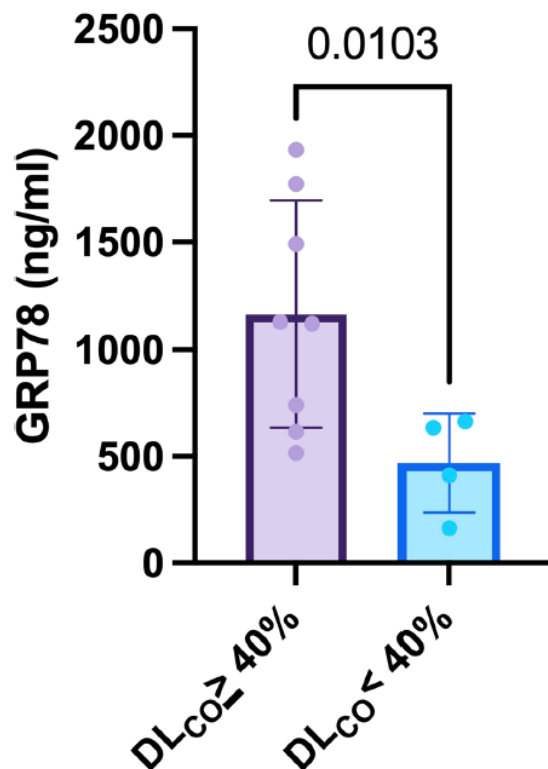


Abb. 2: GRP78-Serumspiegel bei Probanden mit einer interstitiellen Lungenerkrankung und einer schwergradig eingeschränkten Diffusionskapazität (DLCO < 40% des berechneten Sollwertes). Abkürzungen: DLCO: Diffusionskapazität für Kohlenstoffmonoxid; ILD: interstitielle Lungenerkrankung. Modifiziert nach Al Zaidi, Marggraf et al., 2023

Bei den obstruktiven Lungenerkrankungen COPD und Asthma bronchiale unterscheidet man anhand des forcierten expiratorischen Volumens nach einer Sekunde in der Lungenfunktion (FEV1) <40% des vorhergesagten Wertes zwischen einer mittelgradigen und einer schwergradigen obstruktiven Ventilationsstörung (Criée et al., 2015). Ab einer FEV1 <30% erfolgt bei COPD die Einteilung in das schwerste GOLD Stadium IV (GOLD – Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease 2020). In der Population der Probanden mit COPD oder Asthma bronchiale zeigte sich bei dem Wert FEV1 <30% ebenfalls ein signifikant niedriger GRP78-Spiegel ($p = 0,0075$, vgl. Abbildung 3).

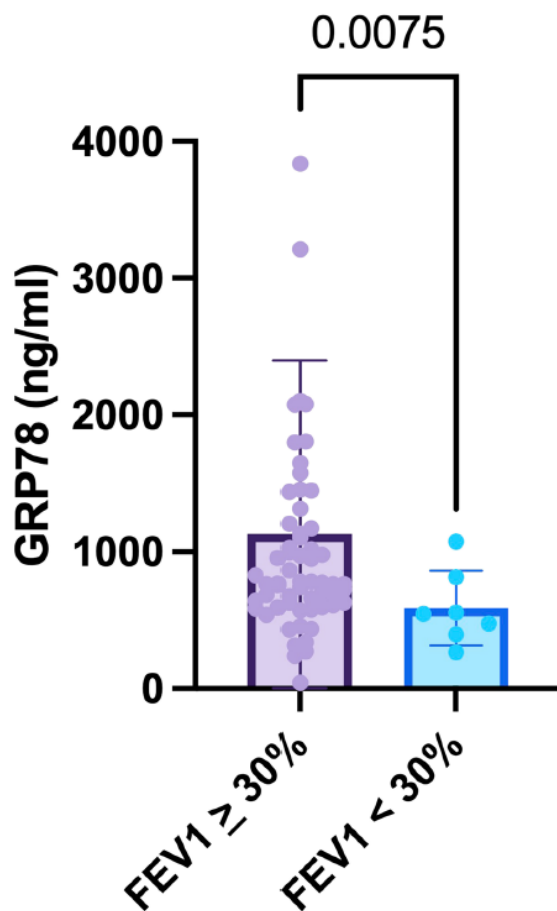


Abb. 3: GRP78-Serumspiegel bei Proben mit COPD oder Asthma bronchiale und einer schwergradigen obstruktiven Ventilationsstörung (FEV1 <30% des vorhergesagten Werts). Abkürzungen: COPD: Chronisch obstruktive Lungenerkrankung; FEV1: forciertes expiratorisches Volumen nach einer Sekunde, auch Einsekundenkapazität genannt. Modifiziert nach Al Zaidi, Marggraf et al., 2023

Auch konnten statistisch signifikante Korrelationen zwischen der GRP78-Konzentration und dem Hämoglobinwert, dem hochsensitiven C-reaktiven Protein (CRP) und der Anzahl der Eosinophilen ausgemacht werden (vgl. Abbildung 4). Die Leukozyten zeigten allerdings keine Korrelation zu der GRP78-Konzentration.

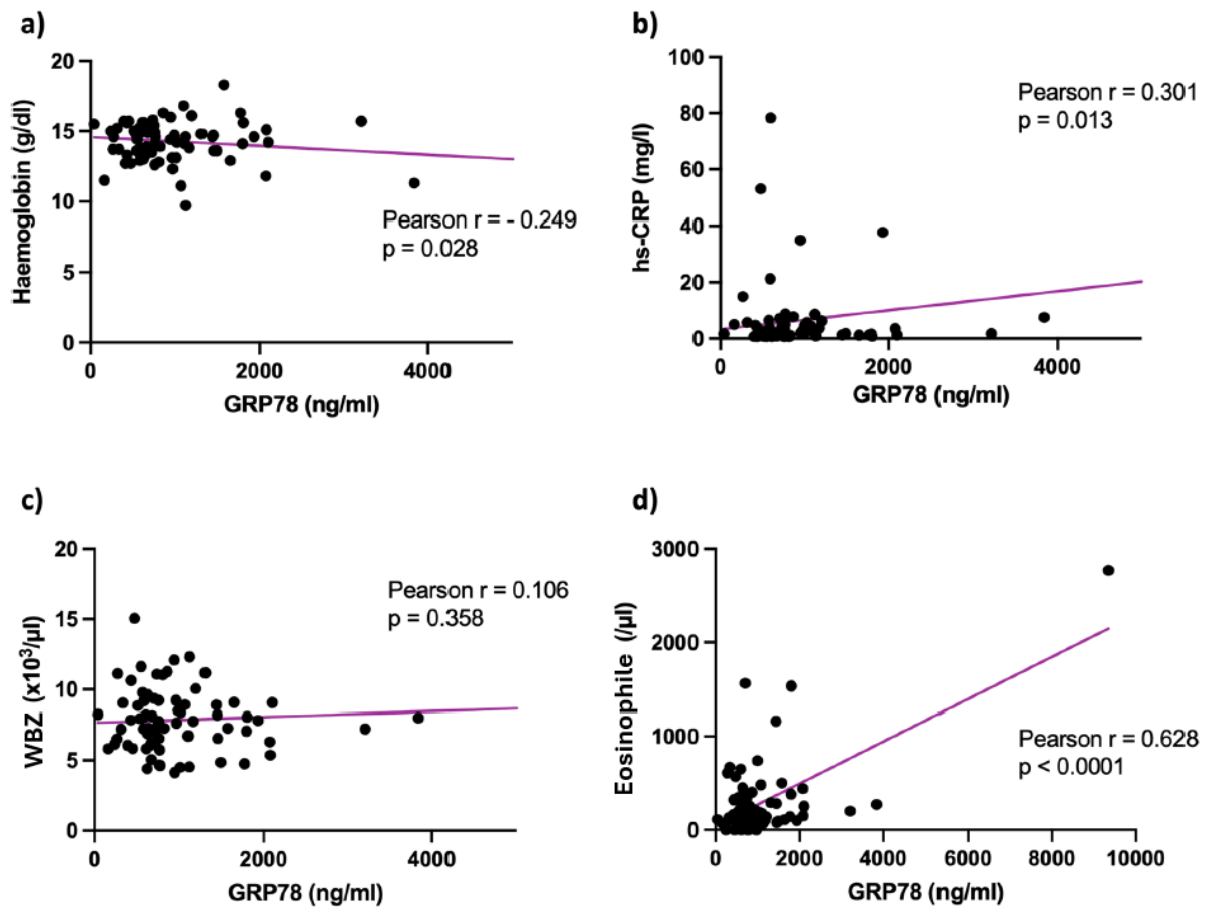


Abb. 4: Korrelationsanalyse zwischen der GRP78-Serumkonzentration und (a) Hämoglobin, (b) hochsensitivem C-reaktivem Protein (hs-CRP), (c) Gesamtzahl der weißen Blutkörperchen (WBZ) und (d) Eosinophilen. Abkürzungen: hs-CRP: hochsensitives C-reaktives Protein; WBZ: Gesamtzahl der weißen Blutkörperchen. Modifiziert nach Al Zaidi, Marggraf et al., 2023

Unterschiede zwischen der subjektiven Symptomlast zeigten sich in der Gruppe COPD/Asthma bronchiale nicht. Die Symptomlast wurde mithilfe des COPD Assessment Tests (CAT) bei den Probanden mit COPD und des Asthma Control Test (ACT) bei den Probanden mit Asthma bronchiale abgefragt. Ein CAT-Score ≥ 10 und ein ACT-Score < 16 können dabei einen Hinweis auf eine unzureichende Symptomkontrolle geben. In Bezug auf unsere Asthma-Kohorte zeigte die Symptombelastung keine Assoziation mit den GRP78-Messungen ($p = 0,35$, vgl. Abbildung 5). In Bezug auf unsere COPD-Kohorte

gaben alle in die Studie aufgenommenen Patienten eine schlechte Symptomkontrolle an (CAT-Score ≥ 10). Diese war somit unabhängig von den GRP78-Spiegeln.

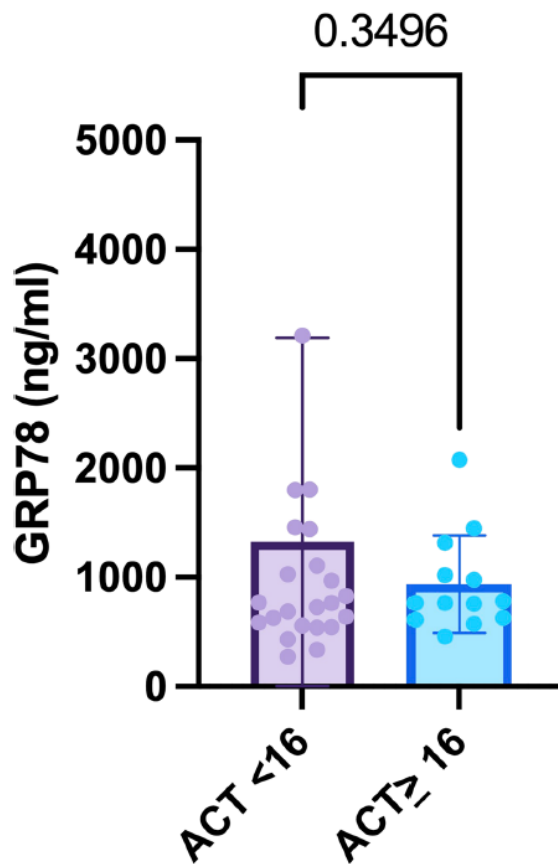


Abb. 5: GRP78-Serumspiegel bei Probanden mit Asthma bronchiale in Abhängigkeit von der subjektiven Symptomkontrolle. Abkürzungen: ACT: Asthma-Kontrolltest. Modifiziert nach Al Zaidi, Marggraf et al., 2023

1.4 Diskussion

Ziel der hier vorliegenden Arbeit war es, die Eignung von GRP78 als Biomarker bei den Lungenerkrankungen COPD, Asthma bronchiale und ILD zu charakterisieren. Es konnte nachgewiesen werden, dass ein niedriger GRP78-Spiegel mit einer schwereren Einschränkung der Diffusionskapazität bei der ILD einhergeht. Des Weiteren korreliert ein niedriger Spiegel ebenfalls mit einer schwergradigen Ventilationsstörung bei COPD und Asthma bronchiale. Auch lag bei geringeren GRP78-Spiegeln eine schlechtere

Oxygenierung vor. Somit kann angenommen werden, dass bei erniedrigten GRP78-Spiegeln ein schwerer Krankheitsverlauf bei den genannten pulmonalen Erkrankungen besteht. Gegebenenfalls könnten sich höhere Spiegel auch auf einen milderen Krankheitsverlauf auswirken, sodass sich die weitere Frage ergibt, ob GRP78 protektiv bei diesen Erkrankungen wirken kann. Dies war nicht die eigentliche Frage der Studie, wobei diese Hypothese weitere Untersuchungen in diese Richtung anstoßen könnte.

In Bezug auf die einzelnen pulmonalen Erkrankungen ergaben sich verschiedene Beobachtungen. Bei ILD handelt es sich um einen Sammelbegriff, der eine Gruppe von mehr als 200 verschiedenen, teilweise sehr seltenen parenchymalen Lungenerkrankungen umfasst (Mueller-Mang et al., 2017). Die einzelnen Erkrankungen innerhalb der Gruppe der ILD unterscheiden sich in Ätiologie, Verlauf und Therapie, als Gemeinsamkeit weisen sie aber ähnliche klinische, radiologische und pathophysiologische Merkmale auf. Innerhalb der Gruppe der ILD ist die Erkrankung der idiopathischen Lungenfibrose (IPF) verhältnismäßig gut erforscht und beschrieben. Diese ist charakterisiert durch eine fortschreitende Lungenfibrose; insgesamt geht die Erkrankung mit einer hohen Mortalität einher (Raghu et al., 2022).

In verschiedenen Studien wurden bereits Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen ER-Stress sowie der damit einhergehenden Aktivierung der UPR und der IPF gefunden. Dabei konnte unter anderem festgestellt werden, dass bei IPF-Patienten eine erhöhte Expression von GRP78 in den alveolaren Epithelzellen vorliegt (Lawson et al., 2008). Als mögliche Auslöser oder begünstigender Faktor bei der Entwicklung einer IPF wurden verschiedene Schadstoffe diskutiert und erforscht, unter anderem Nikotin oder Feinstaub (Wolters et al., 2018). Aus früheren Studien ist bereits bekannt, dass diese ebenfalls ER-Stress und die UPR auslösen können (Laing et al, 2010; Wong et al, 2016). Dies weist darauf hin, dass ER-Stress und die UPR eine Beteiligung bei der Entwicklung der IPF oder deren Fortschritt haben könnten. Innerhalb unserer Studienpopulation litt nur ein kleinerer Teil der Patienten an einer ILD und weniger noch an einer IPF. Die weiteren interstitiellen Lungenerkrankungen, an denen die Probanden unserer Studie erkrankt waren, teilten sich jedoch das Charakteristikum einer fortschreitenden Fibrose. Bei ILD-Patienten korrelierte der GRP78-Spiegel positiv mit der DLCO. Dies ist ein gut etablierter Wert zur Einordnung des Schweregrades und Progresses der ILD. Des Weiteren zeigte

sich bei höheren GRP78-Spiegeln eine bessere Oxygenierung. Dieser Wert kann ebenfalls zur Beurteilung der Schwere der Erkrankung herangezogen werden, da bei höhergradigen Diffusionseinschränkungen häufig eine schlechtere Oxygenierung vorliegt und im fortgeschrittenen Stadium bei vielen ILD-Patienten eine kontinuierliche Sauerstoffpflichtigkeit besteht. Somit kommt GRP78 als Biomarker für interstitielle Lungenerkrankungen in Frage, besonders für die IPF. Da die Anzahl der Probanden mit ILD in der hier vorliegenden Studie sehr gering war, was grundsätzlich auch der Seltenheit der Erkrankung geschuldet ist, sind bereits Folgestudien in Planung, die den Zusammenhang zwischen ILD, insbesondere IPF und GRP78 mithilfe einer größeren Studienpopulation genauer charakterisieren sollen.

In Bezug auf COPD wurde GRP78 bereits 2014 als möglicher Biomarker mit Korrelation zur Einsekundenkapazität FEV₁ beschrieben (Merali et al., 2014). Bei der COPD sind ebenfalls bereits Studien durchgeführt worden, die die Rolle von ER-Stress und der UPR bei der Entstehung dieser Erkrankung genauer zu bestimmen versuchen. Der Verlauf der COPD ist durch eine anhaltende chronische Entzündung der Lunge gekennzeichnet. Der Übergang zu einer chronisch anhaltenden Entzündung wird sowohl durch langfristige Gewebeschäden als auch durch akute Entzündungen verursacht, die durch schädliche Partikel wie Zigarettenrauch ausgelöst werden. Dieser dauerhafte entzündliche Zustand führt zu strukturellen Veränderungen in den Atemwegen und resultiert aus einer langen Exposition gegenüber schädlichen Substanzen (Oudijk et al., 2003). Die kontinuierliche Exposition von Lungenzellen gegenüber verschiedenen Umweltreizen kann spezifisch in der Lunge ER-Stress und die UPR-Signalwege aktivieren. Die Schädigung von Zellen in den Atemwegen bei COPD resultiert vorrangig aus oxidativem Stress, der durch die Einwirkung eingeatmeter Umweltreize entsteht. Dieser oxidative Stress wird durch Oxidantien, wie zum Beispiel reaktive Sauerstoffspezies, vermittelt und führt zur Aktivierung der UPR. Bei COPD gibt es eine erhöhte Expression von Transkriptionsfaktoren der UPR, es besteht eine positive Korrelation zwischen der Expression dieser UPR-Transkriptionsfaktoren und dem Grad sowie der Schwere der Atemwegsobstruktion (Aghaei et al, 2020). Die genauen pathophysiologischen Vorgänge und Interaktionen sind bisher aber noch nicht geklärt. Auch konnte nachgewiesen werden, dass Rauchen zu einer erhöhten Expression von verschiedenen UPR-Proteinen in der

Lunge führt (Kelsen et al., 2008). Dabei wurden Lungenbiopsien von Organspendern untersucht, bei denen bisher keine Erkrankung der Lunge bekannt war, die allerdings entweder aktive Raucher, ehemalige Raucher oder Nichtraucher (Kontrollgruppe) waren. Da das Rauchen einer der wichtigsten Risikofaktoren der COPD ist, kann hier ebenfalls ein Zusammenhang zu ER-Stress und der UPR-Aktivierung vermutet werden.

Diese Vorbefunde decken sich mit den in der vorliegenden Studie erhobenen Daten. So konnten wir beobachten, dass die GRP78-Konzentration mit zunehmender Schwere der Obstruktion (definiert durch eine FEV1 <30% des vorhergesagten Werts) ebenfalls signifikant reduziert war. Dazu passt die Hypothese, dass höhere GRP78-Konzentrationen eine protektive Wirkung auf die Entwicklung und den Progress von COPD haben könnte. Eine erhöhte GRP78-Konzentration könnte die verursachte Lungenentzündung und Apoptose mildern und damit schützende Wirkungen bei entzündlichen Lungenerkrankungen zeigen.

Das Asthma bronchiale repräsentiert neben der COPD eine weitere obstruktive Lungenerkrankung, die ebenfalls durch eine chronische Entzündung der Atemwege gekennzeichnet ist. Hier konnten wir auch eine Korrelation zwischen niedrigen GRP78-Spiegel und einer zunehmenden Atemwegsobstruktion in der Lungenfunktion nachweisen. Bei Asthma bronchiale handelt es sich um eine heterogene Erkrankung. Anders als bei der ILD, die über 200 unterschiedliche Krankheitsentitäten umfasst, werden beim Asthma bronchiale aber verschiedene Phänotypen unterschieden (GINA - Global Initiative for Asthma 2020). Diese werden durch den zugrundeliegende Krankheitsprozess sowie die klinischen und pathophysiologischen Merkmale bestimmt. So umfassen sie beispielsweise allergische, eosinophile und neutrophile Asthmaformen. Asthmasymptome werden auch durch verschiedene Umweltfaktoren ausgelöst, wie beispielsweise Rauchen, allergische Reaktionen oder Pilzinfektionen. Asthma bronchiale wird als chronische entzündliche Atemwegserkrankung definiert und grob in T_H2-assoziiert und nicht-T_H2-assoziiert unterteilt. Eosinophiles Asthma geht oft mit einer T_H2-high-Immunantwort einher. T_H2-Zellen sind eine Untergruppe von T-Helfer-Zellen, die eine Schlüsselrolle in der Immunantwort spielen, insbesondere bei allergischen und asthmatischen Reaktionen. T_H2-Zellen produzieren Zytokine, wie beispielsweise Interleukin-4 (IL-4), Interleukin-5 (IL-5) und Interleukin-13 (IL-13). Diese tragen zur

Rekrutierung und Aktivierung von Eosinophilen in den Atemwegen bei. Diese Immunantwort führt zu Entzündungen und den charakteristischen Symptomen von Asthma, beispielsweise Husten, Schleimproduktion und Dyspnoe (Walford et al., 2014). In der vorliegenden Studie konnte ebenfalls eine Korrelation zwischen GRP78 und der Anzahl der Eosinophilen im Blut nachgewiesen werden. Hier ist anzumerken, dass die positive Korrelation zwischen GRP78 und der Eosinophilen-Zahl in der gesamten Patientenpopulation ausschließlich durch die Asthma-Kohorte getrieben wurde.

In vorausgegangenen Studien konnte bereits nachgewiesen werden, dass ein erhöhter ER-Stress bei Asthma bronchiale mit der klinischen Schwere der Erkrankung zusammenhängt. Ebenfalls konnten Hinweise auf gesteigerten ER-Stress sowie UPR in Sputum und BAL-Proben von Asthmapatienten gefunden werden. ER-Stress-Proteine (unter anderem auch GRP78) zeigten eine signifikante Korrelation mit klassischen T_H2 -Markern (Interleukin-4, IL-4/13) im Sputum von Probanden mit Asthma bronchiale (Pathinayake et al., 2022). Zusätzlich wurde die Genexpression von GRP78 mit einer schlechteren Lungenfunktion, insbesondere Einsekundenkapazität FEV₁, in Verbindung gebracht. Dieser ER-Stress wurde vorrangig bei Patienten mit einer eosinophilen oder neutrophilen Entzündungsreaktion bei Asthma bronchiale beobachtet. Die genaue Rolle von ER-Stress bei Asthma bronchiale verbleibt aber weiterhin unklar (Miao et al., 2020).

1.5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Studie wurde die Eignung von GRP78 als Biomarker bei den Lungenerkrankungen Asthma bronchiale, der chronisch obstruktiven Lungenerkrankung (COPD) und den interstitiellen Lungenerkrankungen (ILD) untersucht. Vor allem bei der chronisch obstruktiven Lungenerkrankung und bei den interstitiellen Lungenerkrankungen gibt es trotz Fortschritten in der Prävention und Therapie weiterhin eine hohe Krankheitslast innerhalb der Bevölkerung ohne Therapieansätze, die den Progress dieser Erkrankungen vollständig verhindern können. Bei Asthma bronchiale konnten in den letzten Jahren durch Einführung der Biologika-Therapie größere Fortschritte erzielt werden, wobei weiterhin keine optimale Therapie für alle bekannten Asthma-Phänotypen

besteht. Daher sind neue Möglichkeiten der Therapieüberwachung, der Risikostratifizierung und letztendlich neue Therapieoptionen wichtig für eine Senkung der Mortalität und Morbidität dieser Lungenerkrankungen.

Zusammenfassend konnte in dieser Studie eine Korrelation von GRP78 und der Krankheitsschwere bei der chronisch obstruktiven Lungenerkrankung und Asthma bronchiale sowie den interstitiellen Lungenerkrankungen nachgewiesen werden. Die Konzentration von GRP78 war mit zunehmendem Schweregrad der Erkrankung reduziert. Ebenfalls konnten wir höhere GRP78-Spiegel bei Probanden mit einer besseren Oxygenierung messen. Die Daten sprechen somit dafür, dass GRP78 protektive Effekte auf den Verlauf chronischer entzündlicher Lungenerkrankungen wie der chronisch obstruktiven Lungenerkrankung (COPD), Asthma bronchiale oder den interstitiellen Lungenerkrankungen (ILD) ausüben könnte. Gleichzeitig scheint es als Biomarker für diese Erkrankungen geeignet zu sein.

Die Ergebnisse legen nahe, dass GRP78 klinisch als zusätzlicher Marker für die Risikostratifizierung bei Patienten mit Lungenerkrankungen genutzt werden könnte. Patienten mit niedrigeren Konzentrationen von GRP78 könnten von einer engmaschigeren Überwachung profitieren, um gegebenenfalls frühzeitig die Therapie zu eskalieren.

Des Weiteren wurden bereits Folgestudien begonnen, um die Korrelation zwischen GRP78 und den interstitiellen Lungenerkrankungen noch genauer anhand einer größeren Studienpopulation zu charakterisieren. Hier liegt auch eine der Limitationen der vorgelegten Studie. Es handelte sich um eine Single-Center-Studie, sodass keine größere Patientenzahl eingeschlossen werden konnte.

Nichtsdestotrotz liegt aufgrund der Daten zumindest die Hypothese nahe, dass GRP78 an der Entstehung und dem Progress von chronischen Lungenerkrankungen beteiligt sein könnte. Auch kann eine protektive Wirkung von höheren Konzentrationen vermutet werden. Schlussendlich scheint GRP78 als Biomarker geeignet zu sein, wobei hier vor Etablierung weitere, umfassende Studien notwendig sein werden.

1.6 Literaturverzeichnis der deutschen Zusammenfassung

Aghaei M, Dastghaib S, Aftabi S, Aghanoori MR, Alizadeh J, Mokarram P, Mehrbod P, Ashrafizadeh M, Zarrabi A, McAlinden KD, Eapen MS, Sohal SS, Sharma P, Zeki AA, Ghavami S. The ER Stress/UPR Axis in Chronic Obstructive Pulmonary Disease and Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Life (Basel)* 2020; 11: 1

Aksoy A, Al-Kassou B, Zaidi MA, Shamekhi J, Repges E, Sedaghat A, Becher MU, Treede H, Jansen F, Sinning JM, Zimmer S, Nickenig G, Tiyerili V. Circulating chaperones in patients with aortic valve stenosis undergoing TAVR: impact of concomitant chronic kidney disease. *Translational Research* 2021; 233: 117-126

Aksoy, M.O., Kim, V., Cornwell, W.D. et al. Secretion of the endoplasmic reticulum stress protein, GRP78, into the BALF is increased in cigarette smokers. *Respiratory Research* 2017; 18: Article number: 78

Al Zaidi M, Pizarro C, Bley C, Repges E, Sedaghat A, Zimmer S, Jansen F, Tiyerili V, Nickenig G, Skowasch D, Aksoy A. ER-stress-induced secretion of circulating glucose-regulated protein 78kDa (GRP78) ameliorates pulmonary artery smooth muscle cell remodelling. *Cell Stress Chaperones* 2022; 27: 561-572

Chaudhari N, Talwar P, Parimisetty A, Lefebvre d'Hellencourt C, Ramanan P. A molecular web: endoplasmic reticulum stress, inflammation, and oxidative stress. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 2014; 8: 213

Criée CP, Baur X, Berdel D, Bösch D, Gappa M, Haidl P, Husemann K, Jörres RA, Kabitz HJ, Kardos P, Köhler D, Magnussen H, Merget R, Mitfessel H, Nowak D, Ochmann U, Schürmann W, Smith HJ, Sorichter S, Voshaar T, Worth H. Leitlinie zur Spirometrie. *Pneumologie* 2015; 69: 147-164

Dickens JA, Malzer E, Chambers JE, Marciniak SJ. Pulmonary endoplasmic reticulum stress-scars, smoke, and suffocation. *The FEBS Journal* 2019; 286: 322-341

Dos Santos NS, Gonçalves DR, Balbinot B, Visioli F. Is GRP78 (Glucose-regulated protein 78) a prognostic biomarker in different types of cancer? A systematic review and meta-analysis. *Pathology - Research and Practice* 2023; 242: 154301

Fink AL. Chaperone-mediated protein folding. *Physiological Reviews* 1999; 79: 425-449

GBD 2016 Disease and Injury Incidence and Prevalence Collaborators. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 328 diseases and injuries for 195 countries, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet* 2017; 390: 1211-1259

Global Initiative for Asthma (GINA). (2020). Global strategy for asthma management and prevention. https://ginasthma.org/wp-content/uploads/2020/04/Main-pocket-guide_2020_04_03-final-wms.pdf (Zugriffsdatum: 30.01.2024)

Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD). (2020). Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease. https://goldcopd.org/wp-content/uploads/2019/12/GOLD-2020-FINAL-ver1.2-03Dec19_WMV.pdf (Zugriffsdatum 30.01.2024)

Hetz C, Zhang K, Kaufman RJ. Mechanisms, regulation and functions of the unfolded protein response. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2020; 21: 421-438

Ibrahim IM, Abdelmalek DH, Elfiky AA. GRP78: A cell's response to stress. *Life Sciences* 2019; 226: 156-163

Kaul B, Cottin V, Collard HR, Valenzuela C. Variability in Global Prevalence of Interstitial Lung Disease. *Frontiers in Medicine (Lausanne)* 2021; 8: 751181

Laing S, Wang G, Briazova T, Zhang C, Wang A, Zheng Z, Gow A, Chen AF, Rajagopalan S, Chen LC, Sun Q, Zhang K. Airborne particulate matter selectively activates endoplasmic reticulum stress response in the lung and liver tissues. *American Journal of Physiology Cell Physiology* 2010; 299: 736-749

Lawson WE, Crossno PF, Polosukhin VV, Roldan J, Cheng DS, Lane KB, Blackwell TR, Xu C, Markin C, Ware LB, Miller GG, Loyd JE, Blackwell TS. Endoplasmic reticulum stress in alveolar epithelial cells is prominent in IPF: association with altered surfactant protein processing and herpesvirus infection. *American Journal of Physiology Lung Cellular and Molecular Physiology* 2008; 294: 1119-1126

Luo B, Lee AS. The critical roles of endoplasmic reticulum chaperones and unfolded protein response in tumorigenesis and anticancer therapies. *Oncogene* 2013; 32: 805-818

Merali S, Barrero CA, Bowler RP, Chen DE, Criner G, Braverman A, Litwin S, Yeung A, Kelsen SG. Analysis of the plasma proteome in COPD: Novel low abundance proteins reflect the severity of lung remodeling. *COPD* 2014; 11:177-189

Miao K, Zhang L, Pan T, Wang Y. Update on the role of endoplasmic reticulum stress in asthma. *American Journal of Translational Research* 2020; 12: 1168-1183

Mueller-Mang C, Ringl H, Herold C. Interstitial Lung Diseases. *Multislice CT* 2017; 24: 261–288

Ninkovic S, Harrison SJ, Quach H. Glucose-regulated protein 78 (GRP78) as a potential novel biomarker and therapeutic target in multiple myeloma. *Expert Review of Hematology* 2020; 13: 1201-1210

Pathinayake PS, Waters DW, Nichol KS, Brown AC, Reid AT, Hsu AC, Horvat JC, Wood LG, Baines KJ, Simpson JL, Gibson PG, Hansbro PM, Wark PAB. Endoplasmic reticulum-unfolded protein response signalling is altered in severe eosinophilic and neutrophilic asthma. *Thorax* 2022; 77: 443-451

Raghu G, Remy-Jardin M, Richeldi L, Thomson CC, Inoue Y, Johkoh T, Kreuter M, Lynch DA, Maher TM, Martinez FJ, Molina-Molina M, Myers JL, Nicholson AG, Ryerson CJ, Strek ME, Troy LK, Wijsenbeek M, Mammen MJ, Hossain T, Bissell BD, Herman DD, Hon SM, Kheir F, Khor YH, Macrea M, Antoniou KM, Bouros D, Buendia-Roldan I, Caro F, Crestani B, Ho L, Morisset J, Olson AL, Podolanczuk A, Poletti V, Selman M, Ewing T, Jones S, Knight SL, Ghazipura M, Wilson KC. Idiopathic Pulmonary Fibrosis (an Update) and Progressive Pulmonary Fibrosis in Adults: An Official ATS/ERS/JRS/ALAT Clinical Practice Guideline. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 2022; 205: e18-e47

Saibil H. Chaperone machines for protein folding, unfolding and disaggregation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2013; 14: 630-642.

Strimbu K, Tavel JA. What are biomarkers? *Current Opinion in HIV and AIDS* 2010; 5: 463-466

Walford HH, Doherty TA. Diagnosis and management of eosinophilic asthma: a US perspective. *Journal of Asthma and Allergy* 2014; 7: 53-65

Walter P, Ron D. The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *Science* 2011; 334: 1081-1086.

Wolters PJ, Blackwell TS, Eickelberg O, Loyd JE, Kaminski N, Jenkins G, Maher TM, Molina-Molina M, Noble PW, Raghu G, Richeldi L, Schwarz MI, Selman M, Wuyts WA, Schwartz DA. Time for a change: is idiopathic pulmonary fibrosis still idiopathic and only fibrotic? *Lancet Respiratory Medicine* 2018; 6: 154-160

Wong MK, Holloway AC, Hardy DB. Nicotine Directly Induces Endoplasmic Reticulum Stress Response in Rat Placental Trophoblast Giant Cells. *Toxicological Sciences* 2016; 151: 23-34

Wu J, Kaufman RJ. From acute ER stress to physiological roles of the Unfolded Protein Response. *Cell Death & Differentiation* 2006; 13: 374-384

2. Veröffentlichung

Cell Stress and Chaperones (2023) 28:333–341
<https://doi.org/10.1007/s12192-023-01341-0>

ORIGINAL ARTICLE



Relevance of serum levels of the endoplasmic reticulum stress protein GRP78 (glucose-regulated protein 78 kDa) as biomarker in pulmonary diseases

Muntadher Al Zaidi¹ · Vanessa Marggraf¹ · Elena Repges¹ · Georg Nickenig¹ · Dirk Skowasch¹ · Adem Aksoy¹ · Carmen Pizarro¹

Received: 4 February 2023 / Revised: 15 March 2023 / Accepted: 26 March 2023 / Published online: 5 April 2023
 © The Author(s) 2023

Abstract

Cellular stress and inflammation contribute to the initiation and progression of a variety of pulmonary diseases. Endoplasmic reticulum (ER) stress and its main regulator GRP78 (glucose-regulated protein 78 kDa) appear to be involved in the pathogenesis of pulmonary diseases, and GRP78 was found to be a biomarker in a wide range of inflammatory diseases. The aim of this study was to investigate the relevance of serum GRP78 in pulmonary disorders.

In this prospective cohort study, 78 consecutive patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD, $n = 28$), asthma ($n = 38$) or interstitial lung disease (ILD, $n = 12$) underwent measurement of serum GRP78 levels by ELISA.

The mean age of patients was 59.8 ± 12.4 years, 48.7% were female. Patients with elevated GRP78 levels ($>$ median) offered a significantly better oxygenation status (capillary pO₂: 75.3 ± 11.7 mmHg vs. 67.8 ± 15.9 mmHg, $p = 0.02$). Significant correlations were observed between GRP78, on the one hand, and haemoglobin, high-sensitivity C-reactive protein (hs-CRP) and eosinophil counts, on the other hand (haemoglobin: Pearson's $r = -0.25$, hs-CRP: $r = 0.30$, eosinophils: $r = 0.63$).

Subsequently, we evaluated GRP78 measurements in function of severity stratifiers of the specific underlying pulmonary disease. ILD patients with a severe diffusion impairment ($DL_{CO} < 40\%$ of predicted), exhibited a significant decrease in GRP78 levels ($p = 0.01$). In COPD and asthma, both characterized by obstructive ventilatory defects, a forced expiratory volume in one second (FEV_1) $< 30\%$ of predicted was accompanied by significantly lower GRP78 ($p = 0.0075$).

In both obstructive and restrictive pulmonary disorders, GRP78 protein concentrations were reduced with increasing disease severity. These data suggest a prevalent role of GRP78 in the presently studied pulmonary disorders.

Keywords Endoplasmic reticulum stress · Chaperone · GRP78 · Biomarker · Inflammation · Lung

Introduction

The endoplasmic reticulum (ER) plays a crucial role in protein synthesis, correct folding and posttranslational modification of proteins (Luo & Lee, 2013). ER stress, resultant from a mismatch between ER protein folding capacity and load, leads to an accumulation of misfolded proteins in the ER (Chaudhari et al., 2014). Such an impairment in ER homeostasis exerts a major impact on cellular survival and function (Dastghaib et al., 2021). This, in turn, activates the

unfolded protein response (UPR) signaling pathway in order to mitigate proteotoxic effects in stressed cells (Walter & Ron, 2011). However, in case of severe and prolonged ER stress, the UPR activates pathways that may elicit cell death through apoptosis (Wu & Kaufman, 2006).

The molecular chaperone glucose-regulated protein 78kDa (GRP78), a heat shock protein also known as binding immunoglobulin protein or heat shock protein A5, is the key mediator of the UPR (Lee, 2014). Its main function consists of restoring ER integrity via facilitating protein folding. In addition, an increasing number of recently published studies described secretion and extracellular functions of GRP78.

UPR dysregulation has been linked to numerous illnesses such as obesity, cancer and cardiovascular diseases (Dos Santos et al., 2023; Meyer & Doroudgar, 2020; Pan et al., 2022). In a study conducted by our group, we found reduced

✉ Muntadher Al Zaidi
 Muntadher.Al_Zaidi@ukbonn.de

¹ Department of Internal Medicine II, University Hospital Bonn, Venusberg-Campus 1, 53127 Bonn, Germany

serum levels of GRP78 to predict mortality in patients with aortic valve stenosis undergoing transcatheter valve replacement (Aksoy et al., 2021). In another study, we provided evidence that elevated levels of GRP78 are linked to favourable clinical and hemodynamical parameters in patients with pulmonary arterial hypertension. Moreover, using *in vitro* models, we demonstrated a protective role of extracellular GRP78 in mediating pulmonary artery smooth muscle cell remodelling (Al Zaidi et al., 2022).

In chronic and debilitating respiratory disorders, the value of ER stress-UPR axis imbalances remain less well defined. Inhaled environmental stimulants, such as cigarette smoke and allergens, are known to induce ER stress and UPR dysregulation. Due to their exposition to a large number of airborne pathogens, human lungs are notably vulnerable to conditions of unresolved ER stress. A proteomics approach to biomarker in chronic obstructive pulmonary disease (COPD) identified several proteins, including GRP78, to be increased in COPD patients (Merali et al., 2014). They may reflect lung damage and airway remodelling and may potentially serve as COPD biomarkers. To assess cigarette smoke-induced lung injury, secretion of GRP78 was assayed in bronchoalveolar lavage fluid (Aksoy et al., 2017). Chronic smokers exhibited an enhanced GRP78 secretion as compared to non-smokers, supporting the notion of a GRP78 upregulation in the setting of lung oxidant stress. In idiopathic pulmonary fibrosis, emerging evidence implicates ER stress both as a cause and consequence of pulmonary inflammation and fibrosis (Dickens et al., 2019).

Given the continuous exposure of pulmonary cells to numerous environmental triggers, the aim of the present study was to investigate the potential of GRP78 as a biomarker in a cohort of patients comprising COPD, asthma and interstitial lung disease (ILD).

Methods

Study population

Between December of 2020 and April of 2021, a total of 78 consecutive patients aged ≥ 18 years who received treatment at the Department of Pneumology, University Hospital Bonn (Bonn, Germany), for COPD, asthma or ILD were enrolled in this prospective cohort trial. Patients were approached during their outpatient consultation, all patients presented stable disease without clinical exacerbation at the time of study inclusion. COPD diagnosis was spirometrically and clinically confirmed in line with the Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) guidelines (Global Strategy for Prevention, 2023). Asthma diagnosis complied with the Global Initiative for Asthma (GINA) diagnostic criteria (*Global Initiative for Asthma: 2022 Main*

Report, 2023). ILD diagnosis relied on consensus by multidisciplinary discussion, according to current guidelines (Raghu et al., 2022). All patients underwent blood sampling and pulmonary function testing. Each subject completed demographic and medical history questionnaires. The study was conducted according to the principles of the Declaration of Helsinki and was approved by the local ethics committee at the Medical Faculty of the University of Bonn. Written informed consent was obtained from all subjects prior to entry into the study.

Blood specimens

Blood samples were collected during patients' routine outpatient visit. Samples were kept on ice and centrifugated at $1500 \times g$ for 15 min. Subsequently, serum was transferred into coded aliquots and stored at -80°C . Analysis of GRP78 levels (Enzo Life Sciences, Inc, Farmingdale, NY, USA) was conducted by commercially available enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits. 4-Parameters Logistic Regression (Graphpad Prism 9.0.0) was applied to analyse GRP concentrations.

In addition to GRP measurement, blood samples were acquired to assess full blood count and high-sensitivity C-reactive protein (hs-CRP) levels.

Pulmonary function testing and capillary blood gas analysis

Pulmonary function testing was performed in conformity with the European Respiratory Society guidelines (Graham et al., 2019) and included spirometry, bodyplethysmography and determination of diffusion capacity for carbon monoxide (Bodyplethysmograph Jaeger®, Alveo-Diffusionstest Jaeger®, Wuppertal, Germany). Static and dynamic lung volumes, such as forced expiratory volume in one second (FEV_1), Tiffeneau-index (FEV_1/VC) and diffusion capacity for carbon monoxide (DL_{CO}) as assessed by the single-breath technique were analysed. Parameters were adjusted to standard population-derived predicted values.

By capillary blood gas analysis with a sample collected from the hyperaemic earlobe, partial pressure of oxygen (pO_2) and partial pressure of carbon dioxide (pCO_2) were determined.

Statistical analysis

Continuous data are presented as mean $\pm$ standard deviation — if normally distributed — or as median and interquartile range (IQR, quartile 1/quartile 3) — if not normally distributed. Continuous variables were tested for having a normal distribution by use of the Kolmogorov–Smirnov test. Categorical data are given as absolute numbers and

percentages. In the case of continuous parameters, Student's *t*-test or Mann–Whitney *U*-test (if normality assumption was violated) was employed for comparison between two groups. Categorical variables were analysed by Fisher's exact test. Correlations between variables were examined with Pearson's correlation coefficient. Statistical significance was assumed when the null hypothesis could be rejected at $p < 0.05$. Statistical analyses were conducted with SPSS Statistics version 26.0 (IBM, Armonk, NY, USA) and GraphPad Prism 9.0.0.

Results

Table 1 summarizes the demographic and clinical characteristics of study participants, stratified by biomarker results. Overall, patients were middle-aged (59.8 ± 12.4 years), the gender ratio was largely balanced (48.7% female). 28 out of 78 patients (35.9%) suffered from COPD, asthma was present in 38/78 patients (48.7%); the remaining 12/78 patients (15.4%) offered ILD. Intercohortal comparison as a function of the underlying pulmonary disease entity evidenced no substantial differences in GRP concentrations (Figure 1). The entire study population was stratified into two groups according to the median GRP78 plasma level of 763.6 ng/ml. Comparison of clinical data in the resultant two patient groups revealed a significantly higher capillary pO_2 amongst patients with elevated GRP78 levels (75.3 ± 11.7 mmHg vs. 67.8 ± 15.9 mmHg, $p = 0.02$). In Table 2, pulmonary

function parameters are summarized. Patients with elevated GRP78 levels had a significantly higher total lung capacity (% of predicted TLC; 114.08 ± 18.9 % vs. 103.43 ± 23.4 %, $p = 0.04$) and a higher residual volume (4.11 ± 1.3 L vs. 3.40 ± 1.5 L, $p = 0.03$). However, there was no significant difference when the residual volume was analysed as a percentage of predicted volume.

Statistically significant correlations were observed between GRP78 concentrations, on the one hand, and haemoglobin, hs-CRP and eosinophil counts, on the other hand (haemoglobin: Pearson's $r = -0.25$, $p = 0.03$; hs-CRP: Pearson's $r = 0.30$, $p = 0.01$; eosinophils: Pearson's $r = 0.63$, $p < 0.0001$; Figure 2). By contrast, total leukocyte count was not related to GRP78 plasma level (Pearson's $r = 0.11$, $p = 0.36$).

Subsequently, we evaluated GRP78 measurements in function of severity stratifiers of the specific underlying pulmonary disease. In terms of diffusion capacity, a DL_{CO} below 40% of the predicted value discriminates between severe and moderate diffusion reduction and is an established definer of advanced ILD. In our ILD cohort, patients with a $DL_{CO} < 40\%$ of predicted exhibited a significant decrease in GRP78 levels (524 ng/ml (226–656) vs. 1126 ng/ml (647–1701), $p = 0.01$; Figure 3). In ILD patients, GRP78 levels positively correlated with the DL_{CO} (Pearson's $r = 0.58$, $p = 0.048$).

In COPD and asthma, both disease entities characterized by obstructive ventilatory defects, a $FEV_1 < 30\%$ of the predicted value marks severe obstructive airflow limitation (Global Strategy for Prevention, 2023; Global Initiative for

Table 1 Demographic and clinical data of study population, stratified by GRP78 measurements

	All patients (n = 78)	GRP78 < median (n = 39)	GRP78 ≥ median (n = 39)	p-value*
Demographics				
Age [years]	59.8 ± 12.4	58.23 ± 12.6	61.4 ± 12.1	0.27
Female	38 (48.7%)	18 (46.2 %)	20 (51.3 %)	0.82 ^F
Smoking habits				
Never	34 (43.6%)	15 (38.5 %)	19 (48.7 %)	0.49 ^F
Former smoker	32 (41.0%)	16 (41.0 %)	16 (41.0 %)	
Current smoker	12 (15.4%)	8 (20.5 %)	4 (10.3 %)	
Packyears	6.5 (0–40)	15 (0–40)	2 (0–40)	0.31 ^M
Capillary blood gas analysis				
Capillary pH	7.44 ± 0.35	7.44 ± 0.03	7.45 ± 0.04	0.04
Capillary pO_2 [mmHg]	71.6 ± 14.4	67.8 ± 15.9	75.3 ± 11.7	0.02
Capillary pCO_2 [mmHg]	34.8 ± 4.3	35.5 ± 4.1	34.1 ± 4.3	0.17
Frequent exacerbator	44 (56.4%)	18 (46.2 %)	26 (66.7 %)	0.11 ^F

Data are presented as n (%), mean ± standard deviation or median (interquartile range, quartile 1/quartile 3). *P-value refers to data comparison between patients, stratified by the median GRP78 plasma level of 763.6 ng/ml (GRP78 < 763.6 ng/ml vs. GRP78 ≥ 763.6 ng/ml). Unpaired *t*-test was applied, if not otherwise stated (^F = Fisher's exact test, ^M = Mann–Whitney *U*-test). Statistically significant differences are given in bold.

Abbreviations: DL_{CO} , diffusion capacity of the lung for carbon monoxide; FEV_1 , forced expiratory volume in 1 s; pCO_2 , carbon dioxide tension; pO_2 , oxygen tension

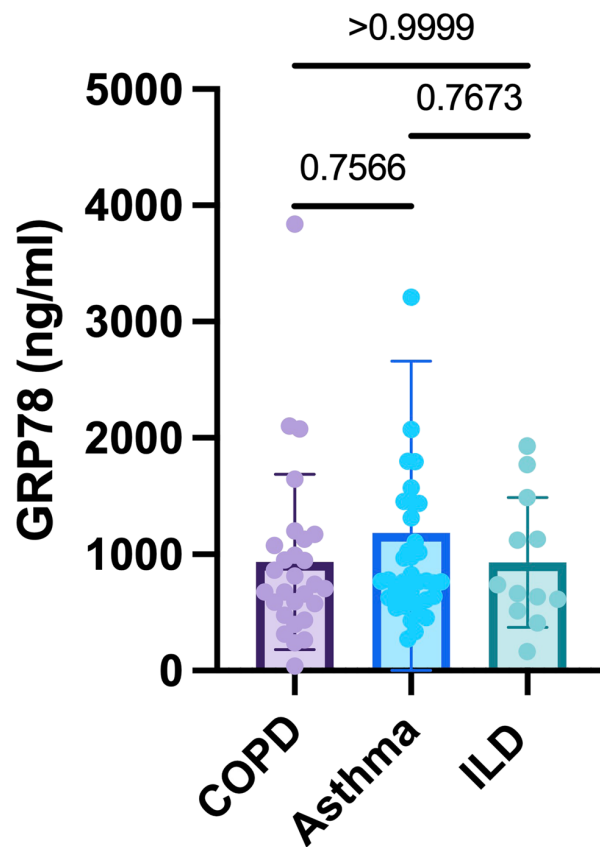


Fig. 1 GRP78 serum levels as a function of the underlying pulmonary disease entity. Abbreviations: COPD: chronic obstructive pulmonary disease; ILD: interstitial lung disease

Asthma: 2022 Main Report, 2023). When transferred to our COPD and asthma study population, significantly lower GRP78 levels were measured in patients with a $FEV_1 < 30\%$ of predicted ($p = 0.0075$, Figure 4).

With a view to symptom burden, the COPD Assessment Test (CAT) and the Asthma Control Test (ACT) were performed, both validated questionnaires to evaluate symptomatology in COPD and asthma, respectively. A CAT-score ≥ 10 and an ACT-score < 16 indicate lacking disease control. As to our asthma cohort, symptom burden showed no association with GRP78 measurements ($p = 0.35$, Figure 5). Regarding our COPD cohort, all patients included into the study stated poor disease control (CAT-score ≥ 10), irrespective of GRP78-levels.

Discussion

In the present study, we aimed to determine the potential of serum GRP78 as a biomarker in chronic pulmonary diseases encompassing COPD, asthma and ILD. The main findings of our study are as follows: (i) Increased GRP78 concentrations were accompanied by improved oxygenation status. (ii) In terms of severity of the specific underlying disease entity, decreased GRP78 levels were associated with severity of obstructive airflow limitation in COPD and asthma, on the one hand, and with severity of diffusion capacity limitation in ILD, on the other hand. In light of this association between elevated GRP78 protein expression and a favourable disease course, a protective effect of GRP78 on pulmonary disorders is presumable.

Given its vast surface area of approximately 100 m² and the high volume of inhaled air, the lung is continuously

Table 2 Pulmonary function parameters of study population, stratified by GRP78 measurements

	All patients (n = 78)	GRP78 < median (n = 39)	GRP78 $\geq$ median (n = 39)	p-value*
FEV_1 [L]	1.81 ± 0.97	1.81 ± 0.87	1.80 ± 1.0	0.97
FEV_1 [% predicted]	59.4 ± 25.4	56.46 ± 22.1	62.43 ± 28.2	0.30
DL_{CO} [% predicted]	52.6 ± 25.4	54.06 ± 23.4	51.14 ± 27.5	0.63
TLC [L]	6.82 ± 1.7	6.34 ± 1.6	7.02 ± 1.7	0.08
TLC [% predicted]	109.9 ± 21.8	103.43 ± 23.4	114.08 ± 18.9	0.04
VC [L]	2.95 ± 1.04	2.94 ± 1.1	2.91 ± 1.1	0.89
VC [% predicted]	76.73 ± 21.9	76.35 ± 24.5	76.58 ± 20.3	0.97
FVC [L]	2.80 ± 1.0	2.81 ± 1.0	2.73 ± 1.1	0.33
FVC [% predicted]	69.0 ± 20.4	68.94 ± 21.6	67.97 ± 19.9	0.84
RV [L]	3.87 ± 1.5	3.40 ± 1.5	4.11 ± 1.3	0.03
RV [% predicted]	175.1 ± 61.7	159.27 ± 68.6	184.44 ± 50.2	0.08

Data are presented as n (%), mean $\pm$ standard *P-value refers to data comparison between patients, stratified by the median GRP78 plasma level of 763.6 ng/ml (GRP78 < 763.6 ng/ml vs. GRP78 $\geq$ 763.6 ng/ml). Unpaired t-test was applied.

Abbreviations: DL_{CO} , diffusion capacity of the lung for carbon monoxide; FEV_1 , forced expiratory volume in 1 s; TLC, total lung capacity; VC, vital capacity; FVC, forced vital capacity; RV, residual volume

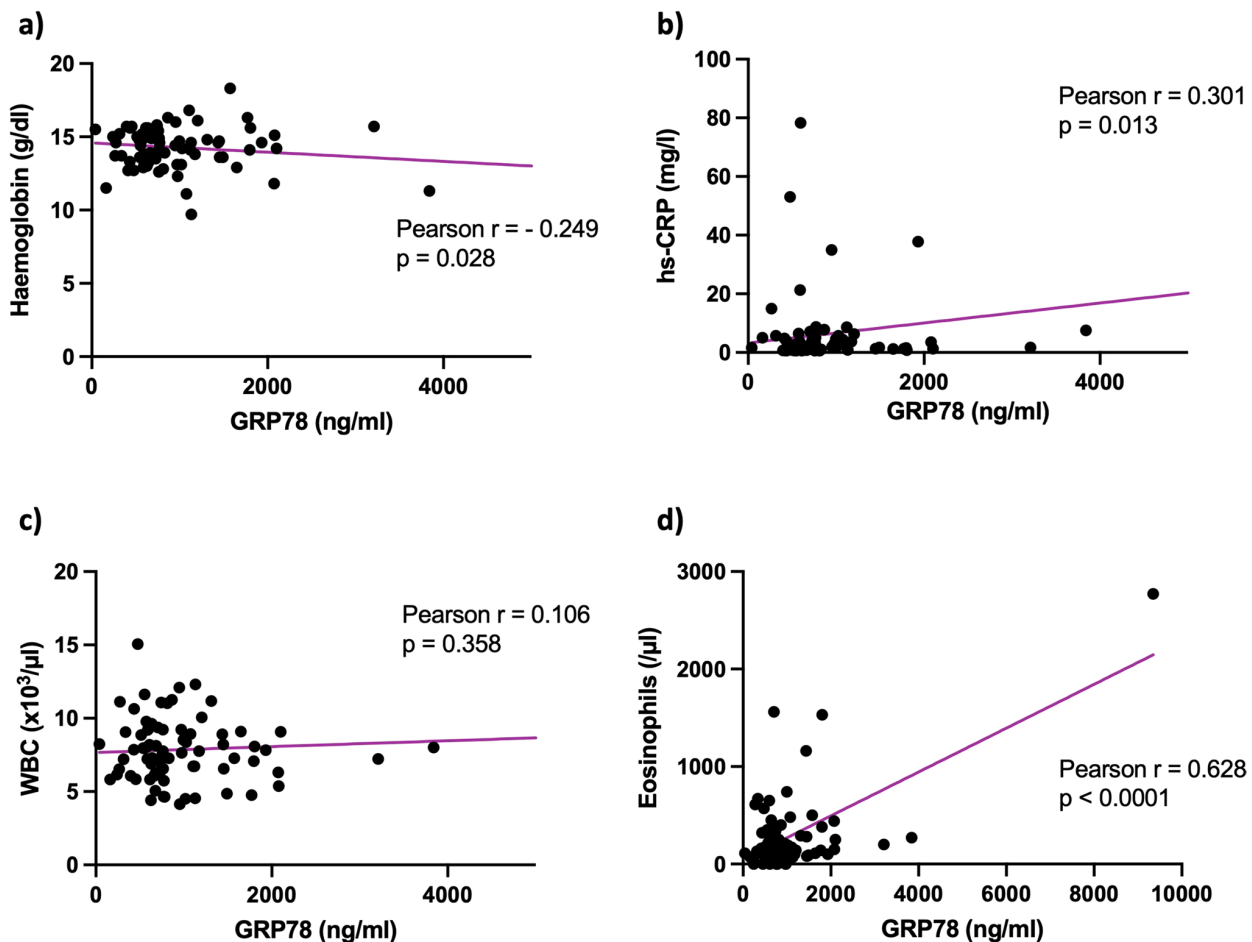


Fig. 2 Correlation analysis between GRP78 serum concentration and (a) haemoglobin, (b) high-sensitivity C-reactive protein, (c) white blood cell count and (d) eosinophils. Abbreviations: hs-CRP: high-sensitivity C-reactive protein; WBC: white blood cell count

exposed to noxae including environmental pollutants, cigarette smoke, pathogens and allergens. Accumulating evidence suggests that these constant environmental threats may elicit protein misfolding and subsequently activate the UPR signaling pathway (Osorio et al., 2013). COPD constitutes a chronic, debilitating pulmonary disorder of multicomponent nature, defined by chronic airway inflammation (Aksoy et al., 2017). This inflammatory response, resultant from exposure to noxious fumes and airborne particles, is noticeable at both a local and systemic level (Oudijk et al., 2003). Recently, considerable efforts have been made to clarify the role of the ER stress-UPR axis in COPD (Barreiro et al., 2019; Naiel et al., 2020). Airway cell damage in COPD is mainly attributable to oxidative stress, originated by inhaled environmental triggers. Oxidants (e.g., reactive oxygen species) mediate oxidative stress response, leading to activation of the UPR pathway (Aghaei et al., 2020). However, the precise downstream regulatory interactions that allow for recognition and handling of these

inhaled noxae remain undefined. Enhanced concentrations of GRP78, a major player in the UPR, has been ascertained in the bronchoalveolar lavage fluid and lung specimens of active smokers (Aksoy et al., 2017; Kelsen et al., 2008). In COPD, GRP78 has been reported as a potential biomarker, correlating with both FEV₁ and the extent of emphysema (Merali et al., 2014). Similarly, we presently observed altered GRP78 concentrations dependent on the severity of the underlying obstructive pulmonary disorder. In case of severe airflow obstruction, defined by a FEV₁ <30% of the predicted value, GRP78 was significantly reduced. This observation is in line with the assumption that increased GRP78 expression mitigates ER stress-induced lung inflammation and apoptosis and thereby exhibits protective effects in inflammatory pulmonary diseases.

Beyond COPD, asthma represents the second most frequent obstructive respiratory disorder, likewise characterized by chronic airway inflammation. As a function of the underlying disease processes that determine clinical and

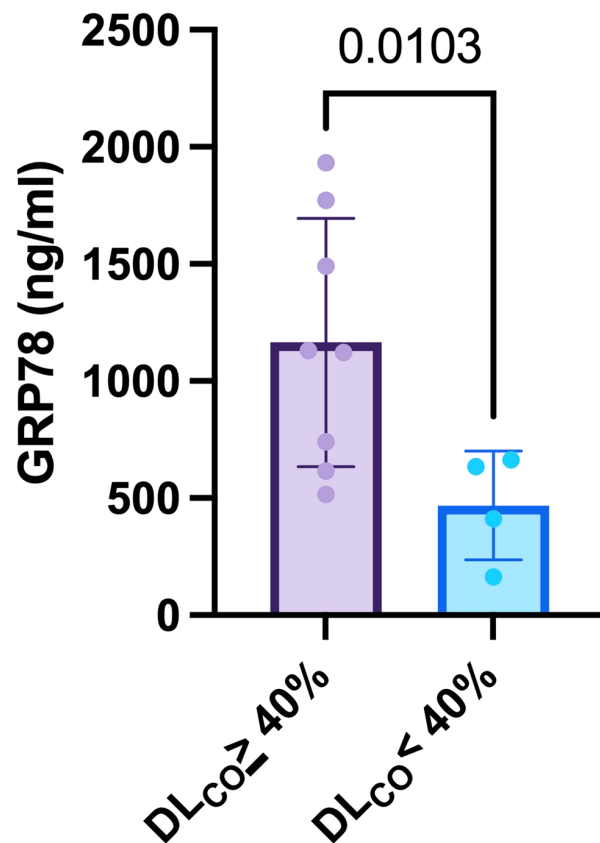


Fig. 3 GRP78 serum levels in ILD patients with severe reduction in diffusion capacity (DLCO < 40% of predicted). Abbreviations: DLCO: diffusion capacity for carbon monoxide; ILD: interstitial lung disease

pathophysiological features, a distinction is made between diverse asthma phenotypes (*Global Initiative for Asthma: 2022 Main Report*, 2023). They encompass the broad range of allergic, eosinophilic and neutrophilic asthma. Allergic asthma is defined by the induction of IgE antibodies subsequent to allergen exposition. Most elicitors of allergic asthma are capable of inducing ER stress-UPR response. Pathinayake and colleagues demonstrated evidence of ER stress/UPR in induced sputum and bronchoscopy specimens of patients with asthma (Pathinayake et al., 2022). ER stress was mainly present in those patients with active eosinophilic and neutrophilic airway inflammation. Moreover, GRP78 gene expression was associated with lung function decline. Consistently, we measured lowest GRP78 levels in patients with severe airway obstruction, as assessed by pulmonary function testing. Remarkably, the positive correlation observed between GRP78 and eosinophil counts in the entire patient population was solely driven by the asthma cohort (Pearson's $r = 0.79$, $p < 0.001$). To address the role of eosinophils in allergic inflammation, Wang et al.

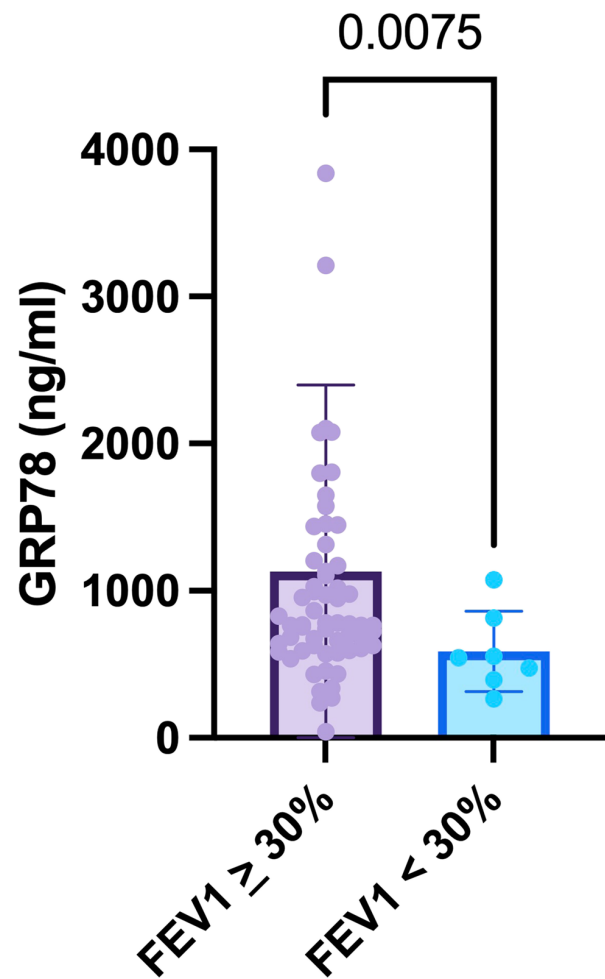


Fig. 4 GRP78 serum levels in COPD and asthma patients with severe obstructive airflow limitation (FEV1 < 30% of the predicted value). Abbreviations: COPD: chronic obstructive pulmonary diseases; FEV1 : forced expiratory volume in one second

challenged eosinophil-deficient mice with *Aspergillus fumigatus*, resulting in fungus-induced allergic lung inflammation (Wang et al., 2021). They ascertained decreased GRP78 protein levels in bronchial epithelial cells of fungus-exposed, eosinophil-deficient mice as compared to fungus-exposed, eosinophil-sufficient wild-type mice. Additionally, at a lung gene level, GRP78 was upregulated in challenged wild-type mice. Increased apoptosis was found in both challenged eosinophil-deficient and -sufficient mice, though the latter displayed a milder apoptotic cell activity. These findings support the notion that eosinophils promote an upregulation of the UPR pathway and are detrimental in allergic pulmonary response. Notwithstanding, the question whether UPR activation negatively impacts cellular survival or rather intends restoration of cellular damage control in eosinophilic allergic lung inflammation remains to be answered.

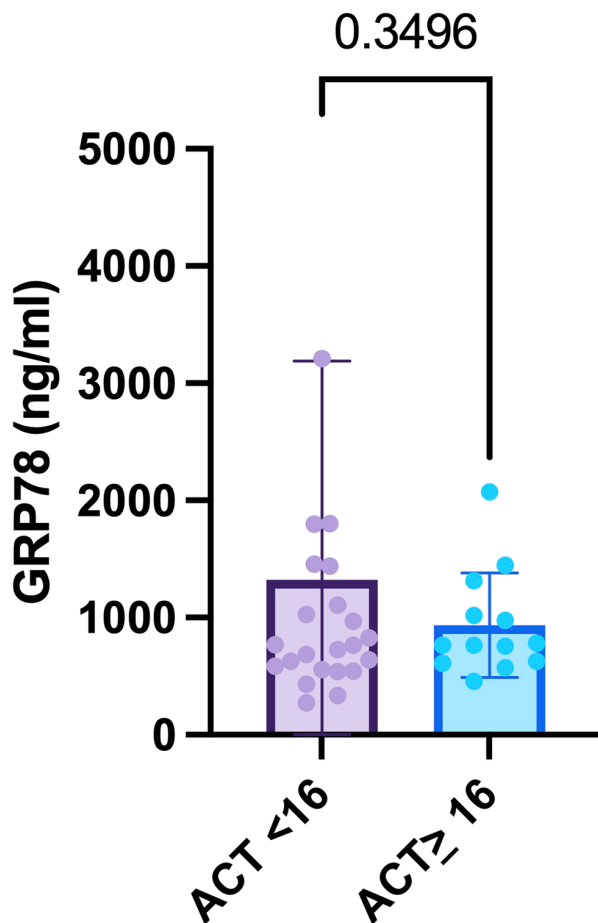


Fig. 5 GRP78 serum levels in asthma patients lacking disease control (ACT < 16).

Abbreviations: ACT: asthma control test

ILD encompasses a large group of more than 200 parenchymal lung diseases that share similar clinical, radiological and pathophysiological characteristics (Travis et al., 2013). A subset of ILD patients may develop progressive pulmonary fibrosis. Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) represents the archetypal progressive fibrotic ILD characterized by relentless lung function decline and earlier mortality (Raghu et al., 2022). In terms of ER stress and UPR activation in ILD, most evidence exists for IPF. Increased ER stress-UPR response including enhanced GRP78 expression has been found in the alveolar epithelium of IPF patients (Lawson et al., 2008). However, UPR signature is not limited to the alveolar epithelium, but also prominent in sub-adjacent fibroblast foci, supporting a correlation between ER stress and IPF pathogenesis. Exogenous stimulants known to increase the probability of developing IPF in genetically susceptible individuals, comprise cigarette smoke, viral infections, microaspiration, airborne pollutants and occupational exposures (Wolters et al., 2018). Noteworthy, many

of these risk factors are established ER stressors, indicating that ER stress and UPR appear to be critically involved in IPF onset and progression. Within our ILD study population, only two patients presented IPF. The remaining ILD study cohort was heterogeneous with regard to the underlying ILD aetiology but shared the similarity of being mostly progressive fibrosing in nature. In ILD patients, GRP78 levels positively correlated with DL_{CO} (Pearson's $r = 0.58$, $p = 0.048$). This association was particularly noticeable in those patients with severe diffusion capacity impairment, defined by a $DL_{CO} < 40\%$ of the predicted value. To the best of our knowledge, no data exist by now evaluating the relation between pulmonary function decline in ILD and chaperone levels. Diffusion capacity represents an established physiological marker of disease severity and progression in ILD. Our finding of a positive correlation between GRP78 and diffusion capacity is consistent with our aforementioned results in obstructive ventilatory defects, in which disease severity is mainly defined by the degree of obstructive airflow limitation, quantified by FEV_1 . In both obstructive and restrictive pulmonary disorders, GRP78 protein concentrations were reduced with increasing disease severity. In keeping with this, we ascertained the highest GRP78 levels in patients with best oxygenation status. While clearly, we cannot address the mechanisms underlying this suggestion, these data enhance the idea that GRP78 may exert protective effects on the course of chronic inflammatory pulmonary diseases like COPD, asthma or ILD.

Our study has several limitations including its single-centre design that impeded the inclusion of a larger number of patients. The study population was composed of patients exhibiting three distinct chronic pulmonary illnesses. Moreover, within the ILD patient cohort, heterogeneity arose from the varying ILD-underlying aetiologies. However, these aetiological variations were potentially overcome by the commonality of a progressive fibrosing conduct. Finally, we confined GRP78 association analyses to pulmonary function and biochemical parameters. Additional chest imaging might have been a valuable adjunct to determine the radiological extent of disease severity.

Our results suggest that GRP78 could be clinically utilized as an additional marker for performing risk stratification in patients with pulmonary diseases. Patients with low GRP78 levels might benefit from closer supervision to detect clinical deterioration. Additionally, we plan to conduct larger follow-up studies to examine prognostic properties of GRP78 in patients with pulmonary disorders. These results will provide further evidence to the significance of GRP78 as biomarker in patients with lung diseases.

In conclusion, the present study implicates GRP78, a hallmark effector of the response to ER stress, in the progression of chronic pulmonary diseases. Elevated GRP78 levels were associated with a more favourable disease course. Taken

together, these data support the concept of a presumably protective role of GRP78 in the presently studied pulmonary disorders. Simultaneously, they set the stage for larger studies including disease follow-up.

Availability of data and material The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

Authors' Contributions The authors Muntadher Al Zaidi, Vanessa Marggraf, Adem Aksoy and Carmen Pizarro contributed equally.

Funding Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL. Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL. This work was supported by the medical faculty of the University of Bonn (BONFOR Grant No. 2018-1A-02 and 2021-2A-04 to AA).

Declarations

Ethics approval and consent to participate All procedures were in accordance with the ethical standards of the responsible committee on human experimentation (institutional and national) and with the Helsinki Declaration of 1975, as revised in 2000. Ethical approval was granted from the Ethics Committee of the University of Bonn. Informed consent was obtained from all patients for being included in the study.

Conflict of interest The authors declare no competing interests.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

References

- Aghaei M, Dastghaib S, Aftabi S, Aghanoori MR, Alizadeh J, Mokarram P, Mehrbod P, Ashrafizadeh M, Zarrabi A, McAlinden KD, Eapen MS, Sohal SS, Sharma P, Zeki AA, Ghavami S (2020) The ER stress/UPR axis in chronic obstructive pulmonary disease and idiopathic pulmonary fibrosis. *Life* 11(1):1
- Aksoy A, Al-Kassou B, Al Zaidi M, Shamekhi J, Repges E, Sedaghat A, Becher MU, Treede H, Jansen F, Sinning JM, Zimmer S, Nickenig G, Tiyerili V (2021) Circulating chaperones in patients with aortic valve stenosis undergoing TAVR: impact of concomitant chronic kidney disease. *Transl Res* 233:117–126
- Aksoy MO, Kim V, Cornwell WD, Rogers TJ, Kosmider B, Bahmed K, Barrero C, Merali S, Shetty N, Kelsen SG (2017) Secretion of the endoplasmic reticulum stress protein, GRP78, into the BALF is increased in cigarette smokers. *Respir Res* 18(1):78
- Al Zaidi M, Pizarro C, Bley C, Repges E, Sedaghat A, Zimmer S, Jansen F, Tiyerili V, Nickenig G, Skowasch D, Aksoy A (2022) ER-stress-induced secretion of circulating glucose-regulated protein 78kDa (GRP78) ameliorates pulmonary artery smooth muscle cell remodelling. *Cell Stress Chaperones* 27:561–572
- Barreiro E, Salazar-Degracia A, Sancho-Muñoz A, Aguiló R, Rodríguez-Fuster A, Gea J (2019) Endoplasmic reticulum stress and unfolded protein response in diaphragm muscle dysfunction of patients with stable chronic obstructive pulmonary disease. *J Appl Physiol* 126(6):1572–1586
- Chaudhari N, Talwar P, Parimisetty A, Lefebvre d'Helencourt C, Ravanani P (2014) A molecular web: endoplasmic reticulum stress, inflammation, and oxidative stress. *Front Cell Neurosci* 8:213
- Dastghaib S, Kumar PS, Aftabi S, Damera G, Dalvand A, Sepanjnia A, Kiumarsi M, Aghanoori MR, Sohal SS, Ande SR, Alizadeh J, Mokarram P, Ghavami S, Sharma P, Zeki AA (2021) Mechanisms targeting the unfolded protein response in asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol* 64(1):29–38
- Dickens JA, Malzer E, Chambers JE, Marciniak SJ (2019) Pulmonary endoplasmic reticulum stress-scars, smoke, and suffocation. *FEBS J* 286(2):322–341
- Dos Santos NS, Gonçalves DR, Balbinot B, Visioli F (2023) Is GRP78 (Glucose-regulated protein 78) a prognostic biomarker in different types of cancer? A systematic review and meta-analysis. *Pathol Res Pract* 242:154301
- Global Initiative for Asthma: 2022 Main Report. 2023, <https://ginas.org/gina-reports>.
- Global Strategy for Prevention, Diagnosis and Management of COPD: 2023 Report. 2023, <https://goldcopd.org/2023-gold-report-2>.
- Graham BL, Steenbruggen I, Miller MR, Barjaktarevic IZ, Cooper BG, Hall GL, Hallstrand TS, Kaminsky DA, McCarthy K, McCormack MC, Oropeza CE (2019) Standardization of spirometry 2019 update. An Official American Thoracic Society and European Respiratory Society Technical Statement. *Am J Respir Crit Care Med* 200:e70–e88
- Kelsen SG, Duan X, Ji R, Perez O, Liu C, Merali S (2008) Cigarette smoke induces an unfolded protein response in the human lung: a proteomic approach. *Am J Respir Cell Mol Biol* 38(5):541–550
- Lawson WE, Crossno PF, Polosukhin VV, Roldan J, Cheng DS, Lane KB, Blackwell TR, Xu C, Markin C, Ware LB, Miller GG, Loyd JE, Blackwell TS (2008) Endoplasmic reticulum stress in alveolar epithelial cells is prominent in IPF: association with altered surfactant protein processing and herpesvirus infection. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 294(6):L1119–L1126
- Lee AS (2014) Glucose-regulated proteins in cancer: molecular mechanisms and therapeutic potential. *Nat Rev Cancer* 14(4):263–276
- Luo B, Lee AS (2013) The critical roles of endoplasmic reticulum chaperones and unfolded protein response in tumorigenesis and anticancer therapies. *Oncogene* 32(7):805–818
- Merali S, Barrero CA, Bowler RP, Chen DE, Criner G, Braverman A, Litwin S, Yeung A, Kelsen SG (2014) Analysis of the plasma proteome in COPD: novel low abundance proteins reflect the severity of lung remodeling. *COPD* 11(2):177–189
- Meyer BA, Doroudgar S (2020) ER stress-induced secretion of proteins and their extracellular functions in the heart. *Cells* 9(9):2066
- Nail S, Tat V, Padwal M, Vierhout M, Mekhael O, Yousof T, Ayoub A, Abed S, Dvorkin-Gheva A, Ask K (2020) Protein misfolding and endoplasmic reticulum stress in chronic lung disease: will cell-specific targeting be the key to the cure? *Chest* 157(5):1207–1220
- Osorio F, Lambrecht B, Janssens S (2013) The UPR and lung disease. *Semin Immunopathol* 35(3):293–306. <https://doi.org/10.1007/s00281-013-0368-6>
- Oudijk EJ, Lammers JW, Koenderman L (2003) Systemic inflammation in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J Suppl* 46:5s–13s
- Pan D, Yang Y, Nong A, Tang Z, Li QX (2022) GRP78 activity modulation as a therapeutic treatment against obesity. *Int J Environ Res Public Health* 19(23):15965

- Pathinayake PS, Waters DW, Nichol KS, Brown AC, Reid AT, Hsu AC, Horvat JC, Wood LG, Baines KJ, Simpson JL, Gibson PG, Hansbro PM, Wark PAB (2022) Endoplasmic reticulum-unfolded protein response signalling is altered in severe eosinophilic and neutrophilic asthma. *Thorax* 77(5):443–451
- Raghu G, Remy-Jardin M, Richeldi L, Thomson CC, Inoue Y, Johkoh T, Kreuter M, Lynch DA, Maher TM, Martinez FJ, Molina-Molina M, Myers JL, Nicholson AG, Ryerson CJ, Strek ME, Troy LK, Wijsenbeek M, Mammen MJ, Hossain T et al (2022) Idiopathic pulmonary fibrosis (an update) and progressive pulmonary fibrosis in adults: an official ATS/ERS/JRS/ALAT Clinical Practice Guideline. *Am J Respir Crit Care Med* 205(9):e18–e47
- Travis WD, Costabel U, Hansell DM, King TE Jr, Lynch DA, Nicholson AG, Ryerson CJ, Ryu JH, Selman M, Wells AU, Behr J, Bourros D, Brown KK, Colby TV, Collard HR, Cordeiro CR, Cottin V, Crestani B, Drent M et al (2013) An official American Thoracic Society/European Respiratory Society statement: update of the international multidisciplinary classification of the idiopathic interstitial pneumonias. *Am J Respir Crit Care Med* 188(6):733–748
- Walter P, Ron D (2011) The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *Science* 334(6059):1081–1086
- Wang S, Jiang Z, Li L, Zhang J, Zhang C, Shao C (2021) Ameliorative effects of eosinophil deficiency on immune response, endoplasmic reticulum stress, apoptosis, and autophagy in fungus-induced allergic lung inflammation. *Respir Res* 22(1):173
- Wolters PJ, Blackwell TS, Eickelberg O, Loyd JE, Kaminski N, Jenkins G, Maher TM, Molina-Molina M, Noble PW, Raghu G, Richeldi L, Schwarz MI, Selman M, Wuyts WA, Schwartz DA (2018) Time for a change: is idiopathic pulmonary fibrosis still idiopathic and only fibrotic? *Lancet Respir Med* 6(2):154–160
- Wu J, Kaufman RJ (2006) From acute ER stress to physiological roles of the unfolded protein response. *Cell Death Differ* 13(3):374–384
- Publisher's note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

3. Danksagung

Zunächst möchte ich Herrn Prof. Dr. Dirk Skowasch danken, unter dessen Leitung meine Forschung zu dieser, aber auch anderer Fragestellungen, an der Med. Klinik II begonnen hat. Vor allem für die langfristige, zuverlässige Betreuung und Geduld muss ich an dieser Stelle danken.

Des Weiteren möchte ich auch Frau PD Dr. Carmen Pizarro für ihre ausgesprochene Hilfe und Unterstützung bei der Realisierung dieser Arbeit meinen herzlichen Dank aussprechen.

Mein besonderer Dank gilt auch Herr Dr. Muntadher Al Zaidi für die Unterstützung im Labor sowie bei der Auswertung der Daten.

An dieser Stelle möchte ich außerdem Herrn Dr. Adem Aksoy danken für dessen zentrale Rolle bei der Initiierung des Forschungsprojektes.

Auch möchte ich Frau Dr. Sandra Tessa Hattenhauer, Frau Dr. Alexandra Funken, Frau Johanna Steinbach und Herrn Andreas Lehmacher für die Ermutigung sowie hilfreiche Kritik bei der Erstellung dieser Doktorarbeit danken.