

**Das ER-Stress-induzierte Glucose-regulated Protein
78 kDa (GRP78) im Umbau pulmonaler
Gefäßmuskelzellen in der pulmonal-arteriellen
Hypertonie**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
Bonn

Carolin Bley

aus Lübeck

2025

Angefertigt mit der Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Dirk Skowasch
2. Gutachter: Prof. Dr. Hanno E. G. Matthaei

Tag der Mündlichen Prüfung: 06. März 2025

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik II, Innere Medizin, Klinik für Kardiologie,
Angiologie, Pneumologie und internistische Intensivmedizin

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	7
1. Einleitung	9
1.1 Pulmonal-arterielle Hypertonie.....	9
1.2 Vasculäres Remodelling	10
1.3 Das endoplasmatische Retikulum.....	12
1.3.1 Funktionen des endoplasmatischen Retikulums.....	12
1.3.2 ER-Stress.....	13
1.4 Die Rolle von GRP78.....	14
1.4.1 Eigenschaften des Chaperones	14
1.4.2 GRP78 als Regulator der UPR	14
1.5 ER-Stress und GRP78 in Erkrankungen.....	17
1.6 Fragestellung	18
2. Materialien und Methoden	19
2.1 Materialien	19
2.1.1 Zelllinie	19
2.1.2 Chemikalien, Enzyme und Reaktionskits	19
2.1.3 Antikörper und Primer	21
2.1.4 Lösungen und Puffer.....	22
2.1.5 Testsubstanzen.....	25
2.1.6 Verbrauchsmaterialien	26
2.1.7 Geräte	26
2.1.8 Software	27

2.2 Methoden	27
2.2.1 Kultur der PASMC	27
2.2.2 Generierung von konditioniertem Medium	31
2.2.3 Bestimmung der Zellvitalität	33
2.2.4 Bestimmung der Zellvitalität unter Hyperproliferation	33
2.2.5 Messung Reaktiver Sauerstoffspezies	34
2.2.6 Ermittlung veränderter Genexpressionen mittels RT-PCR	34
2.2.7 Stimulation mit rekombinantem GRP78	37
2.2.8 Versuche unter hypoxischen Bedingungen	37
2.2.9 Statistische Analyse	37
3. Ergebnisse	38
3.1 Induktion und Sekretion von GRP78	38
3.2 Wirkung von konditioniertem Medium auf PASMC	39
3.2.1 Zellvitalität und Proliferation	40
3.2.2 Oxidativer Stress	42
3.2.3 Genexpression	43
3.3 Wirkungen von rekombinantem GRP78	47
4. Diskussion	50
5. Zusammenfassung	57
6. Abbildungsverzeichnis	58
7. Tabellenverzeichnis	59
8. Literaturverzeichnis	60
9. Danksagung	67

Abkürzungsverzeichnis

ANOVA	Analysis Of Variance, Varianzanalyse
ATF6	Activating Transcription Factor 6
BFA	Brefeldin A
BSA	Bovines Serumalbumin
BSS	Hepes Buffered Saline Solution
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CHOP	Homologes C/EBP-Protein
CM	Konditioniertes Medium
Cntrl	Kontroll-konditioniertes Medium
DCFDA	2',7'-Dichlorofluoriscin-Diacetat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMSO-CM	DMSO-konditioniertes Medium
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERAD	ER-assoziierter Abbau
GRP78	Glucose Regulated Protein 78 kDa
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HIF1 α	Hypoxie-induzierter Faktor 1 alpha
IL	Interleukin
IRE1 α	Inositol Requiring Kinase 1 alpha
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
NF κ B	Nuclear Factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
PAH	Pulmonal-arterielle Hypertonie
PAP _m	Mean pulmonary arterial pressure, mittlerer pulmonal-arterieller Druck
PASMC	Pulmonary artery smooth muscle cells, pulmonal-arterielle glatte Muskelzellen
PAWP	Pulmonary artery wedge pressure, pulmonal-arterieller Verschlussdruck
PBS	Phosphate Buffered Saline

PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PERK	PKR-Like ER-Kinase
PH	Pulmonale Hypertonie
PVR	Pulmonary vascular resistance, pulmonal-vaskulärer Widerstand
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reactive Oxygen Species, reaktive Sauerstoffspezies
RT-PCR	Real-time polymerase chain reaction, Real-Time Polymerase-Kettenreaktion
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SERCA	Sarco-Endoplasmatische Calcium-ATPase
TNF α	Tumor-Nekrose-Faktor alpha
TUN	Tunicamycin
TUN-CM	Tunicamycin-induziertes konditioniertes Medium
TUN-BFA-CM	Tunicamycin-Brefeldin A-induziertes konditioniertes Medium
TPG	Thapsigargin
TPG-CM	Thapsigargin-induziertes konditioniertes Medium
TPG-BFA-CM	Thapsigargin-Brefeldin A-induziertes konditioniertes Medium
UPR	Unfolded Protein Response
XBP1	X-Box-Bindungsprotein 1

1. Einleitung

1.1 Pulmonal-arterielle Hypertonie

Die pulmonal-arterielle Hypertonie (PAH) ist eine schwere, progressiv verlaufende Erkrankung des Lungengefäßsystems. Ein vaskuläres Remodelling führt zum Anstieg der Wandspannung und des Drucks in den Pulmonalarterien, der eine erhebliche chronische Belastung für den rechten Ventrikel darstellt und Rechtsherzinsuffizienz bis hin zu Rechtsherzversagen verursacht (Thenappan et al., 2018). Die PAH ist eine wichtige Differentialdiagnose des Symptoms Dyspnoe.

Die PAH ist eine primäre Erkrankung und kann von weiteren Formen der pulmonalen Hypertonie (PH) unterschieden werden, die bei Linksherz-, Lungen- oder thromboembolischen Erkrankungen entstehen. Die PAH ist definiert durch einen Anstieg des mittleren pulmonal-arteriellen Drucks (mean pulmonary arterial pressure, PAP_m) von > 20 mmHg in Ruhe bei einem pulmonal-arteriellem Verschlussdruck (pulmonary arterial wedge pressure, PAWP) von ≤ 15 mmHg und einem pulmonal-vaskulären Widerstand (pulmonary vascular resistance, PVR) von > 2 Wood Einheiten (vgl. Tab. 1). Damit handelt es sich bei der PAH um eine präkapilläre PH, deren Diagnose unter Ausschluss anderer Ursachen im Rechtsherzkatheter gesichert wird (Humbert et al., 2022).

Zu den Symptomen einer PAH zählen Dyspnoe, körperliche Leistungsminderung, Flüssigkeitsretention und Synkopen, die in erster Linie unter Belastung auftreten (Humbert et al., 2022). Der Krankheitsverlauf ist von der fortschreitenden Rechtsherzinsuffizienz geprägt und Rechtsherzversagen stellt die häufigste Todesursache bei PAH dar (Thenappan et al., 2018). Die medikamentöse Therapie, die im Wesentlichen auf der Senkung des pulmonal-arteriellen Drucks durch Vasodilatation basiert, verbessert häufig den Verlauf, dennoch ist die PAH weiterhin eine Erkrankung mit einer hohen Mortalität (Xiao et al., 2020).

Tab. 1: Hämodynamische Definitionen der pulmonalen Hypertonie. *PAH: pulmonal-arterielle Hypertonie, PAP_m: mittlerer pulmonal-arterieller Druck, PAWP: pulmonal-arterieller Wedge-Druck, PH: pulmonale Hypertonie, PVR: pulmonal-vaskulärer Widerstand, WE: Wood-Einheiten (modifiziert nach Galiè et al., 2016, S. 72 und Humbert et al., 2022, S. 3637)*

Definition	Hämodynamische Merkmale	Klinische Klassifikation
PH	PAP _m > 20 mmHg	- Alle Untergruppen
Präkapilläre PH	PAP _m > 20 mmHg PAWP ≤ 15 mmHg PVR > 2 WE	- PAH - PH assoziiert mit Lungenerkrankungen - PH assoziiert mit Obstruktion der Lungenarterien - PH mit unklaren und/oder multifaktoriellen Mechanismen
Isolierte postkapilläre PH	PAP _m > 20 mmHg PAWP > 15 mmHg PVR ≤ 2 WE	- PH assoziiert mit Linksherzerkrankungen - PH assoziiert mit Obstruktion der Lungenarterien
Kombinierte post- und präkapilläre PH	PAP _m > 20 mmHg PAWP > 15 mmHg PVR > 2 WE	- PH mit unklaren und/oder multifaktoriellen Mechanismen

1.2 Vasculäres Remodelling

Die PAH ist durch Veränderungen der Pulmonalarterien gekennzeichnet, die Hypertrophie der Wandschichten, zelluläre Dysfunktion und perivaskuläre Entzündung umfassen. Vor allem kleine Lungenarteriolen unterliegen diesem sogenannten vaskulären Remodelling und verursachen den Anstieg des Gefäßwiderstands und des pulmonal-arteriellen Drucks (Thenappan et al., 2018).

In der PAH weisen die Zellen der Gefäßwand strukturelle und funktionelle Veränderungen auf. Sowohl Endothel- als auch glatte Muskelzellen zeichnen sich durch Hyperproliferation, Apoptoseresistenz und Produktion pro-inflammatorischer Faktoren aus. Die glatten Muskelzellen der Pulmonalarterien (pulmonary artery smooth muscle cells, PASMC) sind von zentraler Bedeutung, denn ihre Proliferation verstärkt die Gefäßmuskelschicht um ein Vielfaches und führt zur Tonus- und Widerstandserhöhung der Pulmonalarterien (Xiao et al., 2020). Die Fehlfunktion der PASMC wird durch eine Dysregulation endothelial

vermittelter Signalwege begünstigt. Ein Ungleichgewicht der vasoaktiven Mediatoren Stickstoff, Prostazyklin und Endothelin-1 fördert die Vasokonstriktion und ist ein Angriffspunkt der derzeitigen medikamentösen Therapie (Lan et al., 2018).

Die perivaskuläre Entzündung wird als Ursache wie auch als Folge der PAH diskutiert und die anhaltende Inflammation fördert die Progression der Erkrankung. Innerhalb der Gefäßwände herrschen hohe Zytokinkonzentrationen, die von residenten Immunzellen und den Gefäßzellen sezerniert werden. Zu diesen Zytokinen gehören Interleukine (IL) wie IL-1 β , IL-6, der Tumor-Nekrose-Faktor alpha (TNF α), aber auch der Wachstumsfaktor Platelet Derived Growth Factor (PDGF) (Hu et al., 2020; Huertas et al., 2020).

Nuclear Factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells (NF κ B) ist ein Transkriptionsfaktor, der die Expression wichtiger Entzündungsmediatoren induziert und Gene für Zellwachstum und Apoptose reguliert (Hosokawa et al., 2013). NF κ B wird durch oxidativen Stress aktiviert und fördert das vaskuläre Remodelling und die Hypertrophie in der PAH (Chandel et al., 2000; Hosokawa et al., 2013). In Lungenarterien von PAH-Patienten*innen wurde neben einer hohen Konzentration von Makrophagen mit verstärkter NF κ B-Aktivierung auch eine erhöhte NF κ B-Expression in den gewebständigen pulmonalen Endothelzellen und PASMC festgestellt (Price et al., 2013).

Die pro-inflammatorischen Interleukine IL-1 β und IL-6 spielen ebenfalls eine wichtige Rolle in der Progression der PAH (Hu et al., 2020). Diese wachstums- und kontraktionsfördernden Zytokine wurden bei PAH-Patienten*innen in erhöhter Konzentration gemessen und darüber hinaus standen erhöhte IL-6-Spiegel mit dem Überleben der PAH-Patienten*innen in Verbindung (Simpson et al., 2020; Soon et al., 2010). In Lungenarterien von PAH-Patienten*innen wiesen insbesondere PASMC eine hohe Dichte des IL-6-Rezeptors auf, die mit einer anti-apoptischen und wachstumsfördernden Wirkung einherging (Tamura et al., 2018).

Neben den inflammatorischen Prozessen ist auch oxidativer Stress in der Entwicklung der PAH von Bedeutung. Reaktive Sauerstoffspezies (Reactive Oxygen Species, ROS) führen zu veränderten Signalwegen und verstärken unter anderem durch vermehrte Expression von Wachstumsfaktoren die Proliferation von PASMC. Dadurch fördert oxidativer Stress das vaskulären Remodelling in der PAH und wird überdies auch mit rechtsventrikulärer Hypertrophie in Verbindung gebracht (Xu et al., 2022).

Die hämodynamische Belastung in der PAH wird wesentlich durch die Fehlfunktion der PASMC und zunehmende Muskularisierung der Pulmonalarterien bestimmt. Chronische Entzündung und oxidativer Stress fördern die irreversiblen Prozesse und tragen zur Progression der PAH bei (Huertas et al., 2020; Xu et al., 2022).

1.3 Das endoplasmatische Retikulum

1.3.1 Funktionen des endoplasmatischen Retikulums

Das endoplasmatische Retikulum (ER) ist ein Zellorganell, das sich als Netzwerk vom Zellkern bis in die Zellperipherie erstreckt und im Wesentlichen der Synthese von Proteinen, Lipiden und Steroidhormonen sowie als Kalziumspeicher dient (Schwarz & Blower, 2016). Die Proteine, die vom ER synthetisiert werden, sind für die Sekretion oder als integrale Membranproteine bestimmt. Zahlreiche Enzyme gewährleisten die Funktionalität des ER, indem sie Reaktionen katalysieren und das Gleichgewicht des Milieus halten, das besonders vom Redoxsystem und der Kalziumkonzentration bestimmt wird (Malhotra & Kaufman, 2007).

Einer der häufigsten Prozesse im ER ist die Proteinfaltung und post-translationale Modifikation zur Stabilisierung der räumlichen Struktur eines Proteins (Zhang et al., 2019). Gefaltete Proteine werden entsprechend ihrer Funktion modifiziert und schließlich über den Golgi-Apparat an ihren Bestimmungsort transportiert. Proteine, die fehlgefaltet sind und daher keine funktionsfähige Struktur erreichen, werden im Zytosol im sogenannten ER-assoziierten Abbau (ERAD) durch 26S-Proteasomen abgebaut (Malhotra & Kaufman, 2007).

Molekulare Chaperone stellen die Proteinqualität und den Abbau funktionsunfähiger Proteine sicher. Ungefaltete Polypeptidketten exponieren hydrophobe Abschnitte und reaktionsfreudige Seitenketten, die durch fehlerhaftes Anlagern zum Funktionsverlust des Proteins und Aggregatbildung führen können. Um dies zu verhindern, binden ER-Chaperone die Proteinvorstufen und ermöglichen die korrekte Faltung oder führen fehlgefaltete Proteine zum Abbau ins Zytosol (Malhotra & Kaufman, 2007).

Im Gegensatz zum Zytosol herrscht im Inneren des ER ein oxidatives Milieu, da Reaktionen mit Sauerstoff für die hier ablaufenden Prozesse förderlich sind. Der oxidative

Charakter wird vorrangig durch Wasserstoffperoxid (H_2O_2) bestimmt und durch verschiedene Oxidoreduktasen aufrechterhalten, die entsprechend ihrer Funktion H_2O_2 generieren oder wieder abbauen. ROS wie H_2O_2 fungieren unter anderem als Signalmoleküle, führen in hoher Konzentration jedoch zu oxidativem Stress und folglich zu Zellschäden. Antioxidantien nehmen eine wichtige Position ein, indem sie durch Elimination der ROS eine übermäßige Oxidation des ER verhindern und die ER-Funktionalität erhalten (Zhang et al., 2019).

1.3.2 ER-Stress

Wenn die Homöostase des ER gestört wird, ist die korrekte Synthese, Faltung und Modifikation der Proteine eingeschränkt. In der Folge akkumulieren fehlgefaltete Proteine, es entsteht ER-Stress. Zu den Ursachen von ER-Stress gehören unter anderem Glucose- und Energiemangel, oxidativer Stress und Kalziumfreisetzung. Die Unfolded Protein Response (UPR) ist die adaptive Reaktion auf ER-Stress, die durch verschiedene Mechanismen die Homöostase wiederherstellt, um die Funktionalität des ER zu sichern (Malhotra & Kaufman, 2007).

Auch ROS sind wirksame Auslöser für ER-Stress. Wenn die antioxidative Kapazität des ER ausgeschöpft ist, wie es unter Hypoxie oder Energiemangel vorkommen kann, hat ein verschobener Redoxstatus Störungen des ER-Milieus und der Proteinfaltung zufolge. Begleitet von Kalziumfreisetzungen werden Zellschäden verursacht und der Apoptose-Signalweg aktiviert (Zhang et al., 2019; Zhuan et al., 2020). Diese Effekte werden durch das homologe C/EBP-Protein (CHOP) verstärkt, dessen Expression unter ER-Stress ansteigt. Dieser Transkriptionsfaktor vermittelt die Apoptose, indem er die Expression effektiver pro-apoptotischer Gene stimuliert und anti-apoptotische Gene reduziert. CHOP intensiviert wiederum oxidativen Stress im ER, sodass die Lebensfähigkeit der Zelle eingeschränkt und der Zelltod gefördert wird (Zhang et al., 2019).

1.4 Die Rolle von GRP78

1.4.1 Eigenschaften des Chaperones

GRP78, Glucose-regulated protein 78 kDa, ist ein ER-Chaperon und übt durch die Kontrolle der Proteinqualität eine wichtige Rolle für die regelrechte Funktion des ER aus. Es verhindert die Akkumulation ungefalteter und fehlgefalteter Proteine, reguliert die UPR und kann anti-apoptotisch wirken. Aufgrund seiner zentralen Position in der UPR gilt eine erhöhte GRP78-Expression als Indikator für ER-Stress (Lee, 2005, 2014).

GRP78 wird ubiquitär in Zellen exprimiert und weist eine hohe Ähnlichkeit zur Familie der Hitzeschockproteine HSP70 auf (Ibrahim et al., 2019; Quinones et al., 2008). GRP78 wird auf Transkriptionsebene reguliert und konstitutiv auf einem basalen Level exprimiert, das bei ER-Stress deutlich ansteigt. Der Promotor des für GRP78 kodierenden Gens ist in zwei wesentliche Teile unterteilt. Während das basale Expressionsniveau durch die distale Komponente sichergestellt wird, enthält der proximale Teil drei ER-Stress-Response-Elemente, über deren Bindung die Expression unter ER-Stress stimuliert wird (Ibrahim et al., 2019; Lee, 2005).

GRP78 unterstützt im ER die regelrechte Faltung und Modifikation nativer Proteine. Da diese durch ihre freien hydrophoben Seitenketten zu Fehlfaltungen neigen, bindet GRP78 diese hydrophoben Seitenketten, erleichtert die regelrechte Faltung und sorgt für die Ausschleusung der fehlgefalteten Proteine, die für den Abbau ins Zytosol gelangen sollen. Des Weiteren trägt GRP78 durch die Bindung freien Kalziums zu einer balancierten Kalziumkonzentration bei (Ibrahim et al., 2019; Quinones et al., 2008).

1.4.2 GRP78 als Regulator der UPR

GRP78 besitzt über seine Funktionen als Chaperon hinaus auch die Fähigkeit, die UPR zu vermitteln. ER-Stress wird durch drei UPR-Effektorproteine signalisiert, die sich als Transmembranproteine in der ER-Membran befinden. Physiologisch wird ihre sensorische Domäne im ER-Lumen durch GRP78 gebunden, sodass ihre effektorische Domäne im Zytosol inaktiviert ist. Wenn akkumulierende Proteine ER-Stress verursachen, löst sich GRP78 von ihnen, um Faltungs- und Abbauprozesse zu unterstützen, und die UPR-Effektorproteine sind in der Lage, die UPR zu initiieren (vgl. Abb. 1) (Shen et al., 2002).

Die UPR beruht darauf, die Proteinfaltungskapazität des ER erhöhen und dem gegenwärtigen Bedarf anzupassen. Es kommt zu einer vorübergehenden Abschwächung der Proteintranslation, um die Menge neu zu synthetisierender Proteine zu minimieren, die in das ER gelangen. Zusätzlich wird die Expression von UPR-Zielgenen wie ER-Chaperonen sowie Faltungs- und Abbauenzymen induziert, um die ER-Homöostase wieder herzustellen. Neben diesen protektiven Prinzipien bestehen auch pro-apoptotische Signalwege der UPR, die bei starkem oder anhaltendem ER-Stress überwiegen und den Zelltod verursachen können (Hetz et al., 2020; Shen et al., 2002).

Ein UPR-Effektorprotein ist die PKR-like ER-Kinase (PERK), die die Proteinbelastung des ER durch Hemmung der allgemeinen Translationsinitiierung reduziert. PERK ist eine membranständige Serin/Threonin-Kinase und wird aktiviert, wenn GRP78 sich von PERK löst (Bertolotti et al., 2000). Über weitere Signalwege fördert PERK die Transkription antioxidativer Gene, aber bei langanhaltender Aktivierung wird auch die Expression des pro-apoptotischen CHOP induziert (Bertolotti et al., 2000; Malhotra & Kaufman, 2007).

Inositol Requiring Kinase 1 (IRE1 α) ist ein zweites UPR-Effektorprotein, das zahlreiche UPR-Zielgene induziert. Während die luminale Domäne von IRE1 α die Bindung von GRP78 ermöglicht, enthält die zytosolische Domäne eine signalisierende Aktivität. Durch die Dissoziation von GRP78 geht IRE1 α in seinen aktivierten Zustand über und spleißt die mRNA des Transkriptionsfaktors X-Box-Bindungsproteins (XBP1), sodass XBP1 die Transkription verschiedener Gene der Chaperone und weiterer Faktoren stimuliert. Daneben weist IRE1 α pro-apoptotische Wirkungen auf, die über verschiedene Signalwege vermittelt werden können (Malhotra & Kaufman, 2007).

Als weiteres UPR-Effektorprotein ist der Activating Transcription Factor 6 (ATF6) verantwortlich für die Expression von GRP78 und anderer UPR-Zielgenen. Die konstitutive Transkription von ER-Chaperonen wird aufgrund der Inaktivierung von ATF6 durch GRP78 in ungestressten Zellen niedrig gehalten. Löst sich GRP78, gelangt ATF6 in den Golgi-Apparat und wird in zwei Untereinheiten gespalten. Die DNA-bindende Domäne wird in den Zellkern transportiert, wo sie die Transkription der ER-Chaperone intensiviert. Aufgrund dessen, dass GRP78 ATF6 freigibt, induziert GRP78 in Form einer Autoregulation die eigene Expression sowie die weiterer ER-Chaperone, um der erhöhten Anforderung unter ER-Stress gerecht zu werden (Shen et al., 2002).

Die adaptiven Prinzipien der UPR ermöglichen die Optimierung der zugrunde liegenden Bedingungen, um die ER-Homöostase wiederherzustellen und die Zelle vor der Apoptose zu schützen. Je mehr GRP78 sich von den UPR-Effektorproteinen löst, desto höher ist deren Aktivität, die UPR-Wege zu initiieren und diese Aktivität bleibt aufrechterhalten, solange der ER-Stress anhält. Wenn die Menge akkumulierter und fehlgefalteter Proteine abnimmt, bindet GRP78 wieder an die UPR-Effektorproteine, sodass die UPR-Aktivität sistiert (Bertolotti et al., 2000). Die Transkription der UPR-Zielgene und die allgemeine Proteinsynthese gelangen auf ihr ursprüngliches Niveau, sodass das ER seiner eigentlichen Aufgabe wieder gerecht werden kann (Pan et al., 2020; Shen et al., 2002). Die Freigabe der UPR-Effektorproteine macht GRP78 zu einem entscheidenden Regulator zur Bewältigung des ER-Stresses, um die ER-Funktionalität und Zellvitalität zu erhalten (Lee, 2005, 2014).

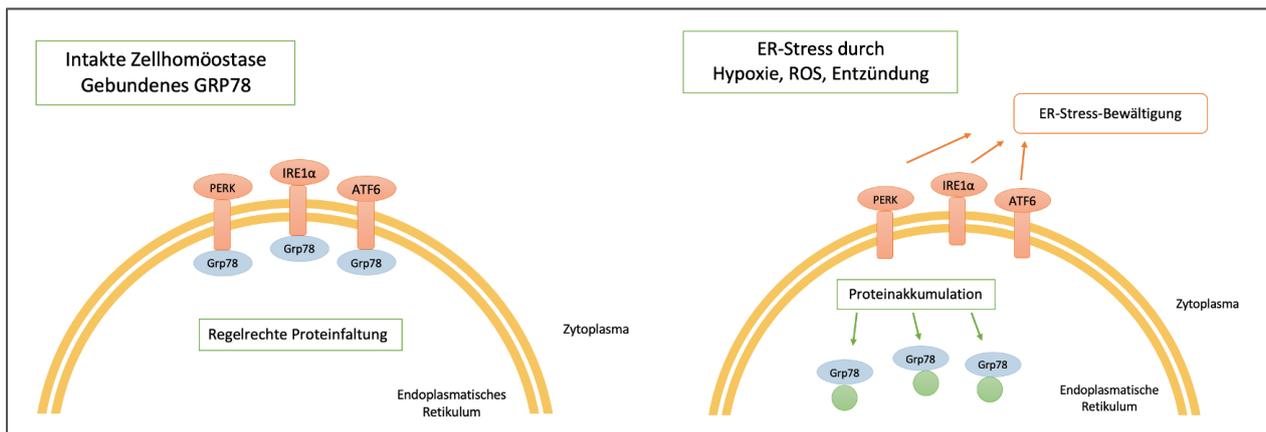


Abb. 1: UPR-Aktivierung mithilfe von GRP78. Bei intakter Zellhomöostase inaktiviert GRP78 die UPR-Effektorproteine, die sich als Transmembranproteine in der ER-Membran befinden. Unter ER-Stress sammeln sich fehlgefaltete Proteine im Inneren des ER, sodass sich GRP78 von den Effektorproteinen löst, um die Faltung oder den Abbau dieser Proteine zu unterstützen. Durch die Freigabe der UPR-Effektorproteine werden diese aktiviert und initiieren die UPR zur Bewältigung des ER-Stresses. *ATF6: Activating Transcription Factor 6, ER: Endoplasmatisches Retikulum, GRP78: Glucose-Regulated Protein 78 kDa, IRE1α: Inositol Requiring Kinase 1 α, PERK: PKR-like ER-Kinase, ROS: Reaktive Sauerstoffspezies, UPR: Unfolded Protein Response (Eigene Darstellung in Anlehnung an Pan et al., 2020, S. 1483)*

1.5 ER-Stress und GRP78 in Erkrankungen

In zahlreichen Erkrankungen wie Atherosklerose, Diabetes mellitus, neurodegenerativen Erkrankungen und Malignomen ist ER-Stress wesentlicher Teil von Krankheitsentstehung und Progress. Jüngste Erkenntnisse deuten zunehmend darauf hin, dass ER-Stress auch in der PAH von zentraler Bedeutung für die Dysfunktion der Gefäßzellen ist (Pan et al., 2020). In Tierversuchen der PAH wurde die Rolle der Supplementation chemischer Chaperone untersucht, die die Proteinfaltung verbessern und so ER-Stress hemmen. Durch die Gabe der chemischen Chaperone wurde die Proliferation und Apoptoseresistenz der PASMC reduziert und ein positiver Effekt auf die PAH erzielt (Dromparis et al., 2013; Koyama et al., 2014).

Als zentrales Chaperon in der Bewältigung des ER-Stresses erwies sich GRP78 in verschiedenen Studien von Bedeutung. Delpino & Castelli (2002) wiesen nach, dass Zellen unter ER-Stress aktiv GRP78 sezernieren, sodass es auch im Blut zirkuliert. Ferner wurden bei Patienten*innen mit Adipositas, Diabetes mellitus oder dem metabolischen Syndrom erhöhte Spiegel von GRP78 festgestellt (Girona et al., 2019). Weitere präklinische Studien untersuchten den Einfluss von GRP78 in der rheumatoiden Arthritis, eine Erkrankung mit einer hohen Entzündungsaktivität. Dabei zeigte sich, dass GRP78 Entzündung und Knochenverlust im Tiermodell reduziert (Zaiss et al., 2019) und Mäuse durch eine vorherige Verabreichung von GRP78 vor der Entstehung einer kollagen-induzierten rheumatoiden Arthritis geschützt waren (Corrigall et al., 2001). Überdies legen die Ergebnisse einer Phase I/IIA-Studie mit Patienten*innen mit rheumatoider Arthritis nahe, dass die systemische Verabreichung von GRP78 einen langhaltenden entzündungshemmenden Effekt hat (Kirkham et al., 2016).

Insgesamt sprechen diese Erkenntnisse dafür, dass extrazelluläres GRP78 einen wesentlichen Einfluss auf ER-Stress und einhergehende Entzündungsreaktionen nimmt und sich protektiv auf andere Zellen auswirkt.

1.6 Fragestellung

Das Ziel dieser Arbeit ist, die Bedeutung von GRP78 bei der PAH im *in vitro*-Modell zu ermitteln. Es wurde untersucht, ob PASMC unter ER-Stress GRP78 sezernieren und welchen Effekt extrazelluläres GRP78 auf PASMC hat. Dazu wurde die Zellvitalität und Proliferation, das Ausmaß oxidativen Stresses sowie die Genexpression von pro-inflammatorischen Mediatoren und ER-Stress-Markern in PASMC unter Einfluss von sezerniertem GRP78 untersucht. Da Hyperproliferation und Hypoxie eine wichtige Rolle in der PAH spielen, wurde der Einfluss auch unter derartigen Versuchsbedingungen analysiert. Diese Studie kann zur Aufklärung beitragen, ob GRP78 eine protektive Bedeutung in der PAH zukommt und es einen potenziellen Biomarker in der PAH-Diagnostik darstellt.

2. Materialien und Methoden

2.1 Materialien

Es wurde mit sterilisierten oder autoklavierten Materialien unter einer sterilen Werkbank gearbeitet. Die Medien, Lösungen und Puffer, mit denen die Zellen behandelt wurden, wurden auf Raumtemperatur angewärmt, sofern nicht anders beschrieben.

2.1.1 Zelllinie

Humane Pulmonal-Arterielle Muskelzellen,

PASMC Katalog-Nr. C-12521

PromoCell, Heidelberg

2.1.2 Chemikalien, Enzyme und Reaktionskits

Aceton

Roth, Karlsruhe

alamarblue™ HS Cell Viability Reagent

Invitrogen, Karlsruhe

Bovines Serumalbumin (BSA)

Bio&SELL, Feucht

Brefeldin A (BFA)

Santa Cruz Biotechnology,
Dallas, USA

Bromphenolblau Indikator

Merck Millipore, Darmstadt

Cell Lysis Buffer

Invitrogen, Karlsruhe

Chloroform

Sigma-Aldrich, München

2',7'-Dichlorofluorescein-Diacetat (DCFDA)

Sigma-Aldrich, München

Dimethylsulfoxid (DMSO)

AppliChem, Darmstadt

ECL Prime Western Blotting Detection Reagent

Sigma-Aldrich, München

Essigsäure

AppliChem, Darmstadt

Ethanol, absolut

Roth, Karlsruhe

Glycerin

AppliChem, Darmstadt

Glycin

AppliChem, Darmstadt

Hepes Buffered Saline Solution (BSS)

PromoCell, Heidelberg

HSPA5, Human Recombinant (GRP78)

Prospec, Ness Ziona, Israel

Isopropanol

Roth, Karlsruhe

2-Mercaptoethanol

Sigma-Aldrich, München

Methanol

Roth, Karlsruhe

Natriumchlorid

AppliChem, Darmstadt

Omniscript Reverse Transcription Kit	Qiagen, Hilden
Pageruler Prestained Proteinladder	Thermo Scientific, Waltham, USA
Phosphate-Buffered Saline (1 x) (PBS)	Gibco, Waltham, USA
Phosphate-Buffered Saline (10 x) (PBS)	Gibco, Waltham, USA
Platelet Derived Growth Factor BB (PDGF)	Gibco, Waltham, USA
Protease Inhibitor Cocktail	Roche, Mannheim
Qubit Protein Assay Kit	Invitrogen, Karlsruhe
Ripa-Puffer	Sigma-Aldrich, München
RNasin Plus RNase-Inhibitor	Promega, Madison, USA
Rotiphorese SDS-Page	Roth, Karlsruhe
Smooth Muscle Cell Growth Medium 2	PromoCell, Heidelberg
Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)	Molekula, München
Supplement Mix SMCGM2	PromoCell, Heidelberg
TaqMan Gene Expression Master Mix	Applied Biosystems, Darmstadt
Thapsigargin (TPG)	Sigma-Aldrich, München
Trichloressigsäure	Roth, Karlsruhe
Tris (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan)	Sigma-Aldrich, München
Trizol Reagent	Invitrogen, Karlsruhe
Tween 20	Sigma-Aldrich, München
Trypsin EDTA	PromoCell, Heidelberg
Trypsin Neutralization Solution	PromoCell, Heidelberg
Tunicamycin (TUN)	Sigma-Aldrich, München
Ultrapure Destilliertes Wasser	Invitrogen, Karlsruhe
Wasserstoffperoxid, 30 %	Sigma-Aldrich, München

2.1.3 Antikörper und Primer

Antikörper

Anti-GRP78, Antikörper, Ratte	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA
Anti-Kaninchen-IgG-Peroxidase	Sigma-Aldrich, München
β-Actin, monoklonaler Antikörper, Kaninchen	Cell Signaling Technology
GRP78, monoklonaler Antikörper, Kaninchen	Cell Signaling Technology
Nativ IgG-Antikörper, Ratte	Sigma-Aldrich, München

Primer

Alle Primer wurden von Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA bezogen.

CHOP	Hs00358796_g1
GRP78	Hs00607129_gH
HIF1α	Hs00153153_m1
IL-1β	Hs01555410_m1
IL-6	Hs00174131_m1
NFκB1	Hs00765730_m1
18S	Hs99999901_s1

2.1.4 Lösungen und Puffer

Lösungen für die Zellkultur

Kulturmedium für PASMCM, serumfrei	pH 7,2 – 7,4
Smooth Muscle Cell Growth Medium 2	

Kulturmedium für PASMCM mit 5 % Serumsupplement	pH 7,2 – 7,4
Smooth Muscle Cell Growth Medium 2	
Supplement Mix/SMCGM 2	5 % (v/v)
Finale Konzentration:	
Fetales Kälberserum	0,05 ml/ml
Epidermal Growth Faktor (rekombinant, human)	0,5 ng/ml
Basic Fibroblast Growth Factor (rekombinant, human)	2 ng/ml
Insulin (rekombinant, human)	5 µg/ml

Lösungen für den Western Blot

Lysis-Puffer	
Proteaseinhibitor, 1:25 in RIPA-Puffer	25 % (v/v)

2 x-Lämmli-Puffer	pH 6,8
Tris	0,125 M
Bromphenolblau	0,004 % (v/v)
Glycerin	20 % (w/v)
β-Mercaptoethanol	10 % (v/v)
SDS	4 % (w/v)

1 x-Elektrophoresepuffer	
Rotiphorese 10x-SDS-Page, 1:10 verdünnt mit dest. Wasser	1 x

5 x-Transferpuffer	
Tris	0,24 M
Glycin	1,93 M
SDS	17,34 mM
dest. Wasser	

1 x-Transferpuffer	
5 x-Transferpuffer	200 ml
Methanol	200 ml
dest. Wasser	600 ml

10 x-TBS-Lösung	
Tris	1 M
NaCl	1,5 M
dest. Wasser	

1 x-TBS-Lösung	
10 x-TBS-Lösung, 1:10 verdünnt mit dest. Wasser	1 x

TBS-T-Lösung	
Tween20	0,1 % (v/v)
1 x-TBS-Lösung	

Blocking-Lösung	
BSA	5 mg/ml
0,1 % TBS-T-Lösung	

ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (ECL-Lösung)	
Reagenz A	50 % (v/v)
Reagenz B	50 % (v/v)

Lösung für die Messung Reaktiver Sauerstoffspezies

2',7'-Dichlorofluoriscin-Diacetat-Lösung (DCFDA)	
Stammlösung 5 mM in Kulturmedium (5 % Serumsupplement)	5 mM

Lösungen für RNA-Isolation und RT-PCR

75 % Ethanol	
Ethanol > 99,8 %	75 % (v/v)
dest. Wasser	

Reverse Transkriptase-Mix

Die nachfolgenden Mengenangaben beziehen sich auf eine Probe (8 µl), der Mix wurde entsprechend für (n+1) Proben angesetzt.

10 x RT-Puffer	2 µl
dNTP-Mix (5 mM pro dNTP)	2 µl
10 µM Oligo dT-Primer	2 µl
Omniscript Reverse Transkriptase	1 µl
10 U/µl RNase Inhibitor RNasin Plus	0,2 µl
Wasser, RNase-frei	0,8 µl

PCR-Primer-Mix

Die nachfolgenden Mengenangaben beziehen sich auf eine Probe (5 µl), der Mix wurde entsprechend für (n+1) Proben angesetzt.

Primer	1 µl
Gene Expression Master Mix	10 µl
dest. Wasser	4 µl

2.1.5 Testsubstanzen

Brefeldin A (BFA)	
Stammlösung: 20 µg/µl in DMSO	
Verdünnung: 1:4 in Kulturmedium (5 % Serumsupplement)	5 µg/µl

Platelet Derived Growth Factor (PDGF)	
Stammlösung: 100 ng/ml, gelöst in 100 mM Essigsäure mit 0,1 % BSA	
Verdünnung: 1:10 in Kulturmedium (5 % Serumsupplement)	10 ng/ml

Rekombinantes GRP78	
Stammlösung: 1 µg/ml in Kulturmedium (serumfrei)	1 µg/ml

Thapsigargin (TPG)	
Stammlösung: 3,07 mM in DMSO	
Verdünnung: 0,1 mM in Kulturmedium (5 % Serumsupplement)	0,1 mM

Tunicamycin (TUN) aus <i>Streptomyces</i> sp.	
Stammlösung: 5 µg/µl in DMSO	5 µg/µl

Wasserstoffperoxid-Lösung (H₂O₂) (30%-ig)	
Stammlösung: 75 mM in dest. Wasser	75 mM

2.1.6 Verbrauchsmaterialien

Cryopure Tubes, 2 ml	Sarstedt, Nürnbergrecht
Falcon, 15 ml	Greiner Bio-One, Solingen
Falcon, 50 ml	Greiner Bio-One, Solingen
Microamp Optical Adhesive Film	Applied Biosystems, Darmstadt
Mini-Protean TGX Gel, 4-15 %	BioRad, Feldkirchen
Mini Trans-Blot Filter Papier	BioRad, Feldkirchen
Parafilm M	Sigma-Aldrich, München
PCR Microcentrifuge Tube 0,2 ml	Nerbe Plus, Winsen/Luhe
PCR 96 Well TW-MT-Platte	Biozym-Scientific, Hessisch-Oldendorf
Pipetten, verschiedene Größen	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen, verschiedene Größen	Nerbe Plus, Winsen/Luhe
Safe-Lock Tubes, verschiedene Größen	Eppendorf, Hamburg
Serologische Pipetten, verschiedene Größen	Greiner Bio-One, Solingen
Spezialvernichtungsbeutel	Nerbe Plus, Winsen/Luhe
Transfermembran	Roth, Karlsruhe
Zellkulturflasche T75	TPP, Trasadingen, Schweiz
Zellkulturtestplatten, verschiedene Größen	TPP, Trasadingen, Schweiz
Zellkulturplatte, 96F, Black	Thermo Scientific, Waltham, USA
Zellscraper	Sarstedt, Nürnbergrecht

2.1.7 Geräte

ChemiDoc MP Imaging System	BioRad, Feldkirchen
CO ₂ Incubator MCO-18AIC	Sanyo, München
Mini Trans-Blot Cell	BioRad, Feldkirchen
Infinite M200 Microplate Reader	Tecan, Männedorf, Schweiz
Mastercycler Pro Thermal Cyclers	Eppendorf, Hamburg
Mikroskop Axiovert 40 CFL	Carl Zeiss, Oberkochen
Nanodrop 2000c Spektralphotometer	Thermo Scientific, Waltham, USA

Qubit 4 Fluorometer	Invitrogen, Karlsruhe
QuantStudio 3 Real-Time-PCR-System	Applied Biosystems, Darmstadt
Thermomixer Comfort	Eppendorf, Hamburg
Vortex Genius 3	IKA, Staufen
Whitley H35 HEPA Hypoxiestation	Meintrup DWS Laborgeräte, Herzlake
Zentrifugen: Centrifuge 5430 R	Eppendorf, Hamburg
Laborfuge 400 R	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA

2.1.8 Software

GraphPad Prism Version 9.0.0	Graphpad Software Inc., La Jolla, USA
Magellan Pro v7.3	Tecan, Männedorf, Schweiz
Nanodrop Software	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA
QuantStudio Design & Analysis Software V 1.5.1	Applied Biosystems, Darmstadt
SPSS Version 25	IBM Corporation, Somers, NY

2.2 Methoden

2.2.1 Kultur der PASC

Die humanen PASC der Firma PromoCell, Heidelberg, wurden in Passage vier bis sechs in flüssigem Stickstoff kryokonserviert, sodass sie nach Bedarf verwendet werden konnten. Für eine neue Versuchsreihe tauten die Zellen eines Kryoröhrchens im Wasserbad bei 37 °C auf. Unter sterilen Bedingungen wurden die Zellen in eine 75 cm²-Zellkulturflasche überführt, in der vorgewärmtes Kulturmedium (5 % Serumsupplement) vorgelegt worden war. Fortan lagerten die adhärent wachsenden Zellen im Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂ in befeuchteter Luft unter regelmäßiger mikroskopischer Begutachtung und Wechsel des Mediums. Um zytotoxische Bestandteile des Einfriermediums zu entfernen, erfolgte der Mediumwechsel erstmals nach 24 h, danach alle zwei Tage. Für die Zellkultur der PASC wurde bis zu Versuchsbeginn grundsätzlich Kulturmedium mit 5 % Serumsupplement verwendet.

Bei einer Konfluenz von etwa 80 % konnten die PASMCM zur weiteren Vermehrung auf drei Zellkulturflaschen passagiert werden. Dazu wurde das alte Medium abgenommen und die Zellen mit 3 ml BSS gewaschen. Damit sich die Zellen lösen, inkubierten sie mit 3 ml Trypsin für 5 Minuten unter 37 °C und 5 % CO₂ und zeigten sich anschließend unter dem Mikroskop im Medium schwimmend. Nun konnten 3 ml Trypsinneutralisator suspendiert werden, um Zellschäden durch das Trypsin vorzubeugen, und der gesamte Inhalt der Zellkulturflasche wurde in ein Falcon überführt. Nach der Zentrifugierung für 8 Minuten bei 800 rcf wurde der Überstand verworfen, das Zellpellet in Medium re-suspendiert und gleichmäßig auf drei neue 75 cm²-Zellkulturflaschen aufgeteilt, die bereits Medium enthielten.

Unter regelmäßiger Begutachtung und Wechsel des Mediums wuchsen die Zellen, bis sie erneut eine Konfluenz von 80 % erreichten und für die Versuche genutzt werden konnten. Dazu wurde das soeben beschriebene Prozedere der Zelllösung wiederholt, die zentrifugierten Zellen in 10 ml Medium re-suspendiert und 10 µl dessen in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Die Bestimmung der Zellzahl ermöglichte die Berechnung des nötigen Volumens, damit vergleichbare Versuchsbedingungen erreicht wurden. Entsprechend der Well-Größe wurde stets die gleiche Zellzahl ausgesät: in Wells der 96-Well-Platte wurden 3 500 Zellen in 100 µl Medium ausgesät, in Wells der 12-Well-Platte 35 000 Zellen in 1 ml Medium, in Wells der 6-Well-Platte 80 000 Zellen in 1 ml Medium sowie in die 60-mm-Schale 180 000 Zellen in 2,3 ml Medium. Um adhärent zu werden, lagerten die Zellen 24 h im Inkubator (37 °C, 5 % CO₂), ehe sie für die Versuche stimuliert wurden.

Versuchsschema - Nachweis von GRP78 nach ER-Stress

In einer Zeitreihe über insgesamt 48 h wurde in den PASMCM ER-Stress erzeugt, um sowohl die dadurch induzierte intrazelluläre Expression von GRP78 als auch seine Sekretion nach extrazellulär im Western Blot nachzuweisen. Die PASMCM wurden in 6-Well-Platten ausgesät und für 24 h im Inkubator gelagert. Zur Auslösung von ER-Stress wurden Tunicamycin und Thapsigargin genutzt. Um nachzuweisen, ob GRP78 aktiv oder rein passiv sezerniert wird, wurde Brefeldin A (BFA) zur Hemmung der aktiven Ausschüttung von Proteinen verwendet und in Kombination mit Tunicamycin bzw. Thapsigargin zu den Zellen gegeben.

Zu Beginn der Zeitreihe wurde in allen Wells das alte Medium abgenommen und durch je 1 ml serumfreies Medium ersetzt. Entsprechend des Zeitplans erfolgten die Stimulationen mit den Testsubstanzen (vgl. Abb. 2). Die Wells erhielten Tunicamycin (5 µg/ml), Thapsigargin (0,1 µM) sowie Tunicamycin (5 µg/ml) mit BFA (5 µg/ml) bzw. Thapsigargin (0,1 µM) mit BFA (5 µg/ml). Außerdem wurden Wells zur Kontrolle ohne weitere Stimulation sowie mit 1 µl Dimethylsulfoxid (DMSO) (1 µM) behandelt. Letzteres diente als Lösemittel-Kontrolle. Über den Zeitraum des Versuchs lagerten die Zellen bei 37 °C und 5 % CO₂ im Inkubator.

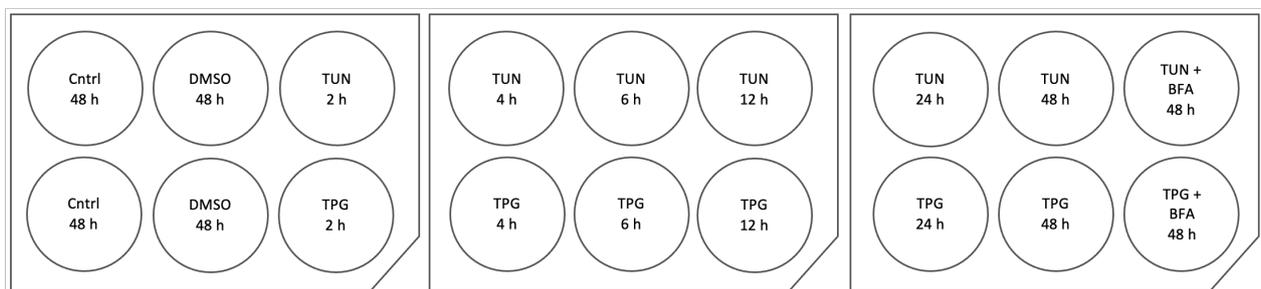


Abb. 2: Versuchsplan zur Auslösung von ER-Stress in pulmonal-arteriellen glatten Muskelzellen in einer Zeitreihe. In 6-Well-Platten wurden die PASMIC entsprechend des Schemas mit DMSO, Tunicamycin sowie Thapsigargin stimuliert, des Weiteren mit Tunicamycin mit BFA bzw. Thapsigargin mit BFA in Kombination. Eine Kontrollpopulation erhielt keine weitere Stimulation. Die Stundenangabe bezieht sich auf den Zeitpunkt der Stimulation vor geplantem Versuchsende. *Cntrl*: Kontrolle, *BFA*: Brefeldin A, *DMSO*: Dimethylsulfoxid, *PASMC*: Pulmonal-arterielle glatte Muskelzellen, *TUN*: Tunicamycin, *TPG*: Thapsigargin. (Eigene Darstellung, 2025)

Proteinbestimmungen mittels Western Blot

Nach Abschluss der Zeitreihe wurden Medium und Zellen gewonnen und von nun an getrennt voneinander für die Gelelektrophorese aufbereitet. Die Gelelektrophorese dient der Auftrennung einer Proteinmischung in ihre einzelnen Bestandteile. Dabei werden die Proteine in einem netzhaltigen Gel, das als Trägermaterial dient, mithilfe elektrischer Spannung entsprechend ihrer Größe separiert.

Um extrazelluläres GRP78 im Medium nachzuweisen, wurde das Medium abgenommen und für 8 Minuten bei 800 rcf zentrifugiert. Der Überstand wurde in neue Tubes gefüllt, in denen sich für die Ausfällung der Proteine bereits je 250 µl Trichloressigsäure befanden. Diese Tubes wurden mehrfach invertiert und nach einer Inkubationszeit von 10 Minuten bei 20 000 rcf und 4 °C für 15 Minuten zentrifugiert. Es folgte die zweifache Waschung

der Proteinpellets, indem der Überstand abgenommen und nach Hinzugabe von 200 μ l gekühltem Aceton für 5 Minuten bei 20 000 rcf und 4 °C zentrifugiert wurde. Um anschließend das Aceton verdampfen zu lassen, wurden die Tubes 10 Minuten mit offenem Deckel auf dem Thermomix bei 95 °C geschüttelt, sodass nur die Proteinpellets am Boden der Tubes verblieben.

Zum Nachweis des intrazellulären GRP78 wurden die Zellen gewonnen und lysiert. Zunächst wurden sie mit 1 ml 1x-PBS gewaschen, danach wurden pro Well 100 μ l Lysis-Puffer auf die Zellen gegeben, sodass sie sich mit dem Zellscraper lösen ließen. Der Inhalt der Well wurde in die vorgesehenen Tubes überführt und für 30 Minuten bei 300 rpm und 4 °C auf dem Thermomix geschüttelt. Nach einer Zentrifugierung bei 20 000 rcf und 4 °C über 20 Minuten wurde der Überstand für die sich anschließende Quantifizierung abgenommen.

Um später in der Gelelektrophorese die Geltaschen mit der gleichen Proteinmenge zu befüllen, wurden diese in den intrazellulären Proben bestimmt. Die Quantifizierung erfolgte mithilfe des Qubit Protein Assay Kits gemäß der Anleitung mit dem Qubit 4 Fluorometer. Für jede Probe wurde das benötigte Volumen unter Berücksichtigung der jeweiligen Verdünnung berechnet, sodass von jeder intrazellulären Probe je 25 μ g Protein für die folgende Gelelektrophorese verwendet wurden.

Zur Vorbereitung der Gelelektrophorese wurden 2x-Lämmli-puffer und destilliertes Wasser im Verhältnis 1:3 zu den Proben gegeben. Intrazelluläre Proben erhielten dies entsprechend der Proteinmenge für ein Gesamtvolumen von 12 μ l. Die Proteinpellets der extrazellulären Proben wurden in einem einheitlichen Volumen gelöst, von dem 12 μ l verwendet wurden. Alle Tubes wurden nun für 10 Minuten bei 300 rpm und 95 °C auf dem Thermomixer geschüttelt. Die Gele wurden in die Elektrophorese-Kammern gespannt, die mit 1x-Elektrophoresepuffer befüllt war. Die Taschen der Gele wurden mit einer Pipette gespült, um sie von Luftblasen zu befreien, und anschließend mit je 10 μ l der vorbereiteten Proben beladen. Eine weitere Tasche erhielt 5 μ l der Proteinladder als spätere Referenz für die Proteingrößen. Die elektrische Spannung wurde an die Elektrophorese-Kammern anfänglich mit 80 V, danach mit 120 V angelegt und nach etwa einer Stunde war das Gel durchlaufen.

Das anschließende Blotten diente der Übertragung der Proteine im Gel auf eine Nitrocellulose-Membran. In einer Kassette kam die Membran auf der proteinhaltigen Seite des Gels zu liegen. Die Kassetten wurden in ein mit 1x-Transferpuffer befülltes Elektromodul gehängt, an das für 1 Stunde und 15 Minuten 350 mA angelegt wurde, sodass die Proteine durch die Spannung auf die Membran transferiert wurden.

Anschließend wurden die Membranen unter regelmäßiger Befeuchtung vom Gel befreit. Um vor der Markierung der Proteine mit Antikörpern die noch freien Bindestellen auf der Membran zu blockieren, inkubierten die Membranen auf dem Rotator für eine Stunde bei Raumtemperatur in je 15 ml Blocking-Lösung.

Da β -Aktin als Housekeeping-Gene mit einer Größe von ca. 42 kDa die Kontrollbande darstellte, wurde die Membran unterhalb der 70 kDa-Marke der Proteinladder in zwei Hälften geteilt und die Membranen von nun an getrennt mit den jeweiligen primären Antikörpern inkubiert. Zur Markierung der Proteine wurden 15 μ l des GRP78-Antikörpers (1:1000) sowie 7,5 μ l des β -Aktin-Antikörpers (1:2000) zur Blocking-Lösung der entsprechenden Membran hinzugegeben. Die Schalen, in denen sich die Membranen befanden, wurden luftdurchlässig mit Parafilm bespannt und inkubierten über Nacht bei 4 °C auf dem Rotator. Am nächsten Tag wurden die Membranen dreimalig mit 1x-TBS-T über je zehn Minuten gewaschen, um nicht spezifisch gebundene Primär-Antikörper zu entfernen. Im Anschluss inkubierten die Membranen in je 20 ml Blocking-Lösung, die 2 μ l des Sekundär-Antikörpers enthielt, um die Primär-Antikörper zu binden. Nach der einstündigen Inkubationszeit bei Raumtemperatur auf dem Rotator wurden die Membranen wie zuvor dreimal mit 1x-TBS-T und einmal mit 1x-PBS gewaschen. Die gewaschenen Membranen wurden mit 2 ml ECL-Lösung benetzt und inkubierten über eine Minute von einer Folie luftblasenfrei bedeckt. Schließlich konnte die Fluoreszenzreaktion mit dem ChemiDoc MP Imaging entwickelt werden.

2.2.2 Generierung von konditioniertem Medium

Das Ziel der nachfolgenden Versuche war zu untersuchen, wie sich das GRP78, das zuvor von PASMIC unter ER-Stress sezerniert wurde, auf andere Zellen auswirkt. Um konditioniertes Medium (CM) zu gewinnen, wurden PASMIC unter ER-Stress versetzt, indem sie 48 h mit DMSO (Kontrolle), Tunicamycin bzw. Thapsigargin behandelt wurden, um die Ausschüttung von GRP78 unter ER-Stress zu stimulieren (TUN-CM bzw. TPG-CM).

Zudem wurden in weiteren PASMCM die Proteinausschüttung blockiert, indem zum Tunicamycin bzw. Thapsigargin BFA zugegeben wurde (TUN-BFA-CM bzw. TPG-BFA-CM). Diese CM konnten für weiter Versuche mit naiven PASMCM verwendet werden (vgl. Abb. 3).

Für die Herstellung des CM wurden PASMCM in 60 mm-Schalen ausgesät. Nach 24 h Inkubation wurde in allen Schalen das Medium gegen 2,3 ml serumfreies Medium ausgetauscht, für die Kontrollschale (Cntrl-CM) erfolgte keine weitere Stimulation. Die weiteren Zellen wurden mit DMSO (1 μ M) (DMSO-CM), Tunicamycin (5 μ g/ml) (TUN-CM) sowie Thapsigargin (0,1 μ M) (TPG-CM) stimuliert, außerdem mit Tunicamycin (5 μ g/ml) mit BFA (5 μ g/ml) (TUN-BFA-CM) sowie mit Thapsigargin (0,1 μ M) mit BFA (5 μ g/ml) (TGP-BFA-CM). Die stimulierten Zellen lagerten 48 h im Inkubator. Zur Gewinnung der CM wurde das Medium einer Schale abgenommen und in ein Tube überführt. Es folgten die Zentrifugierung für 8 Minuten bei 800 rcf sowie die Überführung des Überstands in neue Tubes. Das CM wurde bei -80 °C bis zum nächsten Versuchsschritt eingefroren.

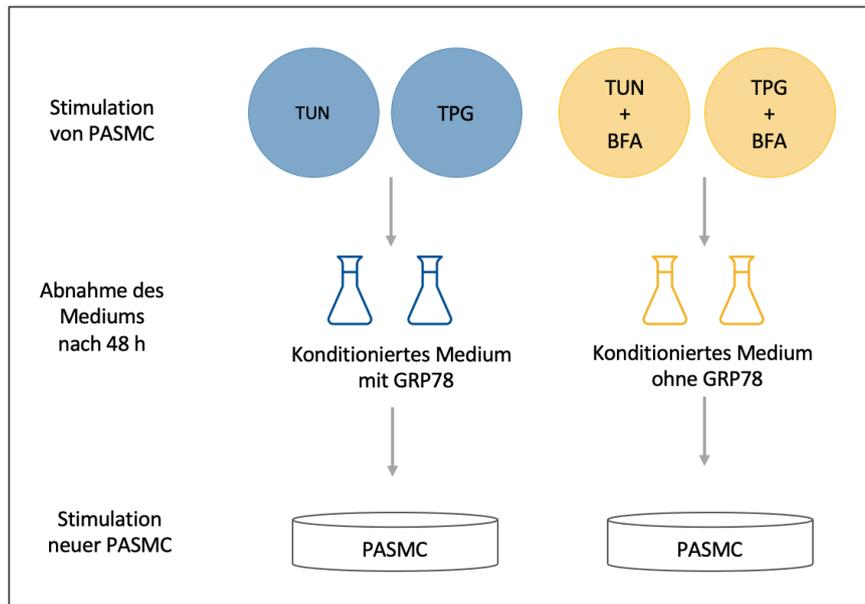


Abb. 3. Konzept des konditioniertes Mediums. PASMCM wurden mit Tunicamycin bzw. Thapsigargin unter ER-Stress versetzt, um die Ausschüttung des GRP78 zu stimulieren. Zudem wurden in weiteren PASMCM die Proteinausschüttung blockiert, indem zum Tunicamycin bzw. Thapsigargin BFA zugegeben wurde. Diese CM konnten für weiter Versuche mit naiven PASMCM verwendet werden. *BFA: Brefeldin A, CM: Konditioniertes Medium, GRP78: Glucose-Regulated Protein 78 kDa, PASMCM: Pulmonal-arterielle Muskelzellen, TUN: Tunicamycin, TPG: Thapsigargin (Eigene Darstellung, 2025)*

2.2.3 Bestimmung der Zellvitalität

In diesem Versuch sollte die Vitalität der PASC unter Inkubation mit den verschiedenen CM bestimmt werden. Die Messung erfolgt mittels alamarblue™, ein Reagenz, das auf Resazurin-Basis eine quantitative Bestimmung der Zellvitalität ermöglicht. Resazurin wird von lebenden Zellen aufgenommen und kontinuierlich zu Resofurin reduziert, dessen starke Fluoreszenz die Gesamtfluoreszenz des Mediums erhöht. Änderungen der Plasmamembranintegrität, DNA-Synthese, ATP-Menge und des reduzierenden Milieus der Zellen können durch Absorptions- oder Fluoreszenzmessung festgestellt werden und als Indikatoren für die Zellvitalität dienen (Invitrogen, 2019).

Die PASC wurden in Wells einer transparenten 96-Well-Platte ausgesät und nach 24 h stimuliert. Eine Zellpopulation erhielt zur Kontrolle 100 µl reines Kulturmedium. Die weiteren Zellen wurden mit Cntrl-CM, DMSO-CM, TUN-CM, TUN-BFA-CM, TPG-CM sowie TPG-BFA-CM und Kulturmedium (5 % Serumsupplement) im Verhältnis 40:60 behandelt. Nach 48 h Inkubation (37 °C, 5 % CO₂) wurde jedes Well mit 11 µl alamarblue™ versetzt. Aufgrund der Lichtempfindlichkeit von alamarblue™ lagerte die Platte für die folgende Inkubation über 4 h bei 37 °C und 5 % CO₂ lichtgeschützt. Die Absorptionsmessung im Microplate-Reader erfolgte bei 570 nm mit einer Referenzwellenlänge von 600 nm.

2.2.4 Bestimmung der Zellvitalität unter Hyperproliferation

In der PAH stehen die PASC unter hyperproliferativen Bedingungen, die ihre Funktionsfähigkeit und das Wachstumsverhalten beeinflussen (Pan et al., 2020). Im folgenden Versuch wurde der Einfluss von CM auf die Zellvitalität unter solchen Voraussetzungen gemessen. Um eine Hyperproliferation zu erreichen, wurde das Wachstum der PASC zunächst mit dem Wachstumsfaktor PDGF stimuliert, bevor sie mit CM behandelt wurden.

Zu Beginn des Versuchs wurden die PASC in einer transparenten 96-Well-Platte ausgesät und inkubierten mit der PDGF-Lösung (30 ng/ml) in frischem Kulturmedium (5 % Serumsupplement) für 48 h (37 °C, 5 % CO₂). Nach dieser Zeit wurde sämtliches Medium der Wells ausgetauscht und der Versuch gestaltete sich von nun an wie in Abschnitt 2.2.3 beschrieben.

2.2.5 Messung Reaktiver Sauerstoffspezies

Die PASMC wurden mit CM stimuliert und zusätzlich H_2O_2 ausgesetzt, ehe die Messung der ROS mit 2',7'-Dichlorofluorescein (DCFDA) erfolgte. Dies wird von Zellen aufgenommen und fluoresziert, wenn es oxidiert wird. Der ROS-Gehalt einer Zelle bestimmt, wie stark oxidierend ihr Milieu ist, daher ist die Stärke der DCFDA-Fluoreszenz kongruent zur ROS-Produktion (Oparka et al., 2016).

Die Zellen wurden in Wells einer schwarzen 96-Well-Platte ausgesät und nach der 24-stündigen Inkubation mit CM und Kulturmedium (5 % Serumsupplement) im Verhältnis 40:60 stimuliert. Nach 48 h Inkubation (37 °C, 5 % CO_2) erhielt je eine Hälfte der Wells, die zu einer Stimulation gehörten, zusätzlich H_2O_2 (75 μM) für eine Stunde. Von der Hinzugabe von H_2O_2 an waren die Zellen stets lichtgeschützt. Nach der Inkubationszeit wurde in jedes Well DCFDA (50 μM) gegeben und die Platte weitere 45 Minuten im Inkubator gelagert. Nun erfolgte ein Waschen mit BSS und anschließend die Messung der Fluoreszenz nach Hinzugabe von 100 μl sterilem 1x-PBS. Es wurde bei einer Exzitation von 492 nm und einer Emission von 537 nm gemessen.

2.2.6 Ermittlung veränderter Genexpressionen mittels RT-PCR

Im Folgenden wurde durch eine Real-Time Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) die Expressionsrate verschiedener Gene in PASMC ermittelt, nachdem die Zellen mit CM behandelt worden waren. Im Interesse stand die Expression von GRP78 selbst sowie dem pro-apoptotischen CHOP, außerdem von den Entzündungsmarkern NF κ B, IL-1 β , IL-6 und sowie vom Hypoxie-induzierten Faktor 1 alpha (HIF1 α). Als Referenz diente die 18S-ribosomale RNA.

Die PASMC wurden in Wells einer 12-Well-Platte ausgesät und zur Adhärenz 24 h inkubiert. Zur Stimulation wurden die verschiedenen CM und Kulturmedium (5 % Serumsupplement) im Verhältnis 40:60 verwendet. Nach 48 h der Inkubation (37 °C, 5 % CO_2) folgte die Gewinnung der Zellen. Dazu wurde die Platte auf Eis gestellt, das alte Medium abgenommen, und die Zellen mit 1 ml 1x-PBS gewaschen. Jegliche PBS-Reste wurden entfernt und jedes Well erhielt 500 μl Trizol, um die Zellen zu lysieren. Das Lysat wurde in Tubes überführt und bei -80 °C eingefroren.

RNA-Isolierung

Zur RNA-Isolierung wurden die Proben für ein schonendes Auftauen auf Eis gestellt und anschließend mit je 100 µl Chloroform versetzt. Sie wurden mindestens 15 Sekunden auf dem Vortexer durchmischt und bei 18 000 rcf und 4 °C für 15 Minuten zentrifugiert. Nun zeigte sich eine Schichtung der Probe in drei Phasen, von denen obere klare Phase die RNA enthielt. Diese obere klare Phase wurde in ein neues Tube überführt, ohne dabei die Phasenübergänge zu stören. Im Verhältnis 1:1 wurde 100 %-iges Isopropanol in das neue Tube dazugegeben und nach Invertierung bei Raumtemperatur eine Stunde lang inkubiert, damit die RNA gefällt wurde. Anschließend wurden die Proben bei 18 000 rcf und 4 °C für 15 Minuten zentrifugiert, wonach der Überstand abgenommen wurde, ohne das Pellet am Boden des Tubes zu entfernen. Es folgte eine zweifache Waschung mit je 1 ml 75 %-igem Ethanol und die Zentrifugierung der Proben bei 18 000 rcf und 4 °C für 5 Minuten. Nachdem das letzte Mal der Überstand sorgfältig abgenommen wurde, trocknete das Pellet 30 Minuten bei Raumtemperatur und offenem Deckel und wurde anschließend in 15 µl destilliertem Wasser pro Probe gelöst. Nach einer zehnmütigen Inkubation auf dem Thermomixer bei 56 °C konnte die isolierte RNA-Menge der Proben am Nanodrop gemessen werden. Diese Quantifizierung diente dazu, dass in der sich anschließenden Reversen Transkription und RT-PCR eine definierte Menge an Nukleinsäure umgesetzt wurde.

Umschreibung in komplementäre DNA

Um eine RT-PCR zu ermöglichen, muss die Nukleinsäure als DNA vorliegen, daher wird vorher eine zur RNA komplementäre DNA (cDNA) erstellt. Dies gelingt mittels einer Reversen Transkriptase, die RNA-abhängig DNA-Sequenzen erstellt. In den weiteren Schritten wird die RNA abgebaut und die DNA um einen weiteren Strang ergänzt, sodass die doppelsträngige DNA entsteht, die für eine RT-PCR geeignet ist.

Für die reverse Transkription wurden die Proben je mit so viel destilliertem Wasser verdünnt, dass ein Volumen von 12 µl einen definierten RNA-Gehalt enthielt. Jeder Probe wurden 8 µl des vorbereiteten RT-Mixes hinzugefügt und nach einer kurzen Zentrifugierung der Proben konnte die Umschreibung im Cyclyer beginnen. Die fertigen cDNA wurden bei -20 °C eingefroren.

Quantitative RT-PCR

Die quantitative RT-PCR ist ein Verfahren zur Vervielfältigung von DNA-Sequenzen sowie ihrer Quantifizierung. Da die Menge der ermittelten DNA-Sequenzen der RNA entspricht, die aus den PASMIC isoliert wurde, können Rückschlüsse gezogen werden, wie stark ein Gen für die Bildung von mRNA und somit Proteinen abgelesen wurde. Dazu werden in einem ersten Schritt die beiden Stränge der cDNA unter Denaturierung bei 95 °C voneinander getrennt. In der folgenden Hybridisierungs-Phase bei 60 °C zur Verlängerung lagert sich ein Primer, der auf eine Gensequenz spezialisiert ist, an die Stränge. Während des dritten Schritts, der Elongation, vervollständigt die Taq-Polymerase bei 72 °C den Strang komplementär, dessen Anfang der Primer durch die Bindung an den cDNA-Strang gemacht hat. Während der RT-PCR werden die Schritte vielfach wiederholt, wobei sich in jedem Zyklus die Menge der cDNA aus dem vorherigen Zyklus verdoppelt. Die Quantifizierung der erstellten DNA ist möglich, da die Taq-Primer, die verwendet werden, einen Reporterfarbstoff enthalten. Dieser fluoresziert, wenn der Quencher am anderen Ende des Primers durch die Polymerase abgebaut ist und die Fluoreszenz nicht weiter absorbiert. Die mit jedem Zyklus zunehmende Intensität der Fluoreszenz ist proportional zur Amplikonmenge.

Zur Vorbereitung der RT-PCR wurden die cDNA-Proben entsprechend der cDNA-Menge verdünnt, sodass sie eine Konzentration von 1 ng cDNA pro µl Probe erreichten. Die PCR-Platte wurde auf einen bei -20 °C gekühlten Aufsatz gesteckt, entsprechend des Pipettierschemas mit 5 µl der verdünnten Probe und 15 µl des PCR-Mixes gefüllt und mit einer Folie zugeklebt. Nach kurzer Zentrifugierung startete die RT-PCR in folgendem Ablauf:

Denaturierung	95 °C	10 Min einmalig
40 RT-PCR- Zyklen:		
Denaturierung	95 °C	15 Sek
Hybridisierung	60 °C	60 Sek
Elongation	72 °C	1 Min, abschließend 7 Min

2.2.7 Stimulation mit rekombinantem GRP78

Zur Differenzierung, inwiefern GRP78 im CM für die gemessenen Effekte verantwortlich ist, wurden die Versuche unter Stimulation mit rekombinantem GRP78 wiederholt. Die Versuchsabläufe erfolgten für die Messung der Zellvitalität, ROS und Veränderung der Genexpression wie in den Abschnitten 2.2.3 – 2.2.6 beschrieben. Dabei erhielt je eine Zellpopulationen zur Kontrolle reines serumfreies Medium, die Stimulation mit rekombinantem GRP78 erfolgte in ansteigenden Konzentrationen zu 10 ng/ml, 100 ng/ml sowie 1000 ng/ml in serumfreiem Medium. Alle Versuche mit rekombinantem GRP78 erfolgten über 24 h Inkubationszeit (37 °C, 5 % CO₂) bei ansonsten identischen Versuchsabläufen unter basalen sowie hypoxischen Bedingungen (s.u.).

2.2.8 Versuche unter hypoxischen Bedingungen

Zellen der Pulmonalarterien sind in der PAH chronischer Hypoxie ausgesetzt. Um diese Umstände nachzustellen, wurden die Versuche mit CM sowie dem rekombinanten GRP78 zur Zellvitalität, ROS-Produktion und Genexpression in einer Hypoxiekammer wiederholt. Ab Beginn der Stimulation bis zum Zeitpunkt der Zellgewinnung bzw. Messung am Microplate-Reader befanden sich die Zellen mit CM für 48 h, die Zellen mit rekombinanten GRP78 für 24 h unter den Bedingungen von 1 % O₂, 5 % CO₂, 94 % NH₂, 100 % Luftfeuchtigkeit sowie einer Temperatur von 37 °C. Diese Bedingungen mussten auch während der weiteren Prozesse der Versuche nicht unterbrochen werden, da innerhalb der Hypoxiekammer an den Zellen gearbeitet werden konnte. Die Versuchsabläufe entsprachen den jeweils beschriebenen Prinzipien der Abschnitte 2.2.3, 2.2.5, 2.2.6 sowie 2.2.7.

2.2.9 Statistische Analyse

Für die statistische Auswertung wurden die Programme SPSS Version 25 und GraphPad Prism (9.0.0) genutzt. Dazu wurden die Daten mit einem Student's t-Test oder einem Mann-Whitney-U-Test analysiert bzw. mit einem einfachen linearen Modell (ANOVA) oder der Kruskal-Wallis-Test im Falle multipler Varianzberechnungen. Die Daten wurden als Mittelwert ± Standardabweichung angegeben. Statistische Signifikanz galt für $p \leq 0,05$ als gegeben.

3. Ergebnisse

3.1 Induktion und Sekretion von GRP78

Es wurde untersucht, wie sich die Induktion von ER-Stress in PASMC auf die Expression und Sekretion von GRP78 auswirkt. PASMC wurden in einer Zeitreihe über 2, 4, 6, 12, 24 und 48 h mit Tunicamycin bzw. Thapsigargin stimuliert, sodass in den Zellen ER-Stress erzeugt wurde.

Im Western Blot gelang der Nachweis, dass ER-Stress, verursacht durch Tunicamycin und Thapsigargin, die Expression von GRP78 zeitabhängig steigert. Intrazelluläres GRP78 wurde kontinuierlich exprimiert und nahm nach 24 h deutlich in seiner Signalstärke zu (vgl. Abb. 4 A und B). Auch im Kulturmedium war nach 48 h ein eindeutiges Signal des extrazellulären GRP78 nachweisbar (vgl. Abb. 4 C und D). Da in keinem Kulturmedium β -Aktin, ein streng intrazelluläres Protein, nachweisbar war (vgl. Abb. 4 C und D), kann das extrazelluläre GRP78 auf eine Freisetzung aus lebenden Zellen und nicht auf den Zerfall abgestorbener Zellen zurückgeführt werden.

Interessanterweise war unter einer zusätzlichen Behandlung mit BFA zum Tunicamycin über 48 h kein extrazelluläres GRP78 nachweisbar, während die intrazelluläre Expression dadurch nicht wesentlich verändert wurde (vgl. Abb. 4 A und C). Dies legt nahe, dass die GRP78-Sekretion der PASMC unter Tunicamycin-Behandlung einem aktiven Mechanismus unterliegt, denn BFA blockiert den Proteintransport über den Golgi-Apparat. Unter Thapsigargin und BFA wurde die Ausschüttung von GRP78 nicht vollständig verhindert (vgl. Abb. 4 D).

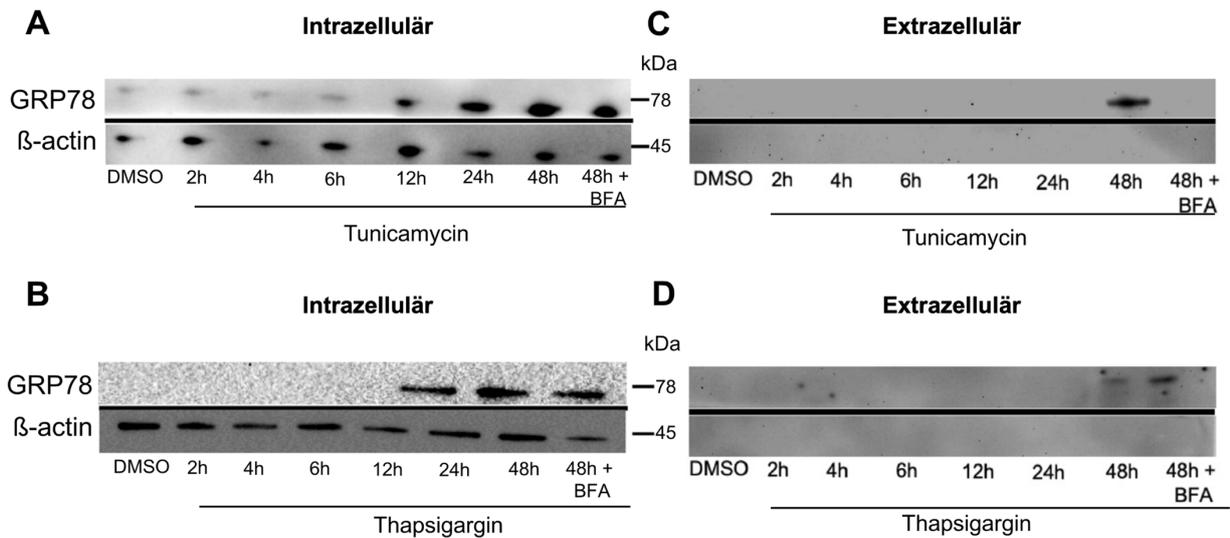


Abb. 4: Pulmonal-arterielle glatte Muskelzellen sezernieren GRP78 unter ER-Stress. Der repräsentative Western Blot einer Zeitreihe zeigt **A:** intrazelluläre Proteine in PASMC nach Behandlung mit DMSO, Tunicamycin (über 2, 4, 6, 12, 24, 48 h, 5 µg/ml) sowie Tunicamycin und BFA (48 h, je 5 µg/ml) bzw. **B:** mit DMSO, Thapsigargin (über 2, 4, 6, 12, 24, 48 h, 0,1 µM) sowie Thapsigargin und BFA (48 h, 0,1 µM und 5 µg/ml) und **C:** extrazelluläre Proteine unter Behandlung Tunicamycin sowie Tunicamycin und BFA (über 48 h, je 5 µg/ml) bzw. **D:** Thapsigargin sowie Thapsigargin und BFA (über 48 h, 0,1 µM und 5 µg/ml). Inkubation mit Antikörpern gegen GRP78 oder β-Aktin (intrazelluläres Housekeeping-Protein) (n = 3). *BFA: Brefeldin A, DMSO: Dimethylsulfoxid, GRP78: Glucose-Regulated Protein 78 kDa, PASMC: Pulmonal-arterielle Muskelzellen (modifiziert nach Al Zaidi et al., 2022, S. 564)*

3.2 Wirkung von konditioniertem Medium auf PASMC

Durch den Western Blot erfolgte der Nachweis, dass GRP78 bei ER-Stress intra- und extrazellulär erhöht ist und dass die Ausschüttung durch BFA teilweise gehemmt werden kann. Diese Voraussetzung ermöglichte die Generierung von CM. GRP78-haltiges CM wurde etabliert, indem PASMC 48 h DMSO (Kontrolle), Tunicamycin bzw. Thapsigargin ausgesetzt worden waren und das Medium, in das die Zellen Proteine inkl. GRP78 sezerniert hatten, abgenommen wurde (TUN-CM bzw. TPG-CM). Weitere PASMC wurden über 48 h zur Hemmung der Proteinsekretion zusätzlich zu Tunicamycin bzw. Thapsigargin mit BFA behandelt (TUN-BFA-CM bzw. TPG-BFA-CM). In darauffolgenden Versuchen wurden Zellen mit diesen verschiedenen CM stimuliert, um die Effekte der sezernierten Proteine, darunter GRP78, auf Zellvitalität, Produktion von ROS sowie die Expression verschiedener Gene aufzuzeigen (vgl. Abb. 3).

3.2.1 Zellvitalität und Proliferation

In der PAH kommt der übermäßigen Proliferation der glatten Muskelzellen eine wichtige Bedeutung zu (Thenappan et al., 2018). Mithilfe von alamarblue™ war die Messung der Zellvitalität der PASMC möglich, die mit CM behandelt worden waren.

Unter basalen Bedingungen führte die CM-Behandlung naiver PASMC zu keinem wesentlichen Unterschied in ihrer Zellvitalität (vgl. Abb. 5). Durch den Wachstumsfaktor PDGF (30 ng/ml) wurde das Wachstum naiver PASMC über 48 h stimuliert, ehe die 48-stündige Behandlung mit CM folgte. Interessant ist, dass die Hyperproliferation unter TUN-CM signifikant geringer ausfiel als unter der Behandlung mit TUN-BFA-CM (Cntrl 1-fach vs. TUN 1,10-fach, TUN+BFA 1,262-fach, ANOVA $p = 0,0008$) (vgl. Abb. 6 A). Diese Auswirkung zeigte sich auch unter TPG-CM und TPG-BFA-CM deutlich (Cntrl 1-fach vs. TPG 1,03-fach vs. TPG+BFA 1,21-fach, ANOVA $p = 0,0001$) (vgl. Abb. 6 B).

Da chronische Hypoxie ein wichtiger Faktor in der PAH ist, wurden die Behandlung der PASMC mit CM unter hypoxischen Bedingungen wiederholt (1 % O₂, 5 % CO₂), unter denen kein signifikanter Unterschied zu verzeichnen war (Abb. 7 A und B).

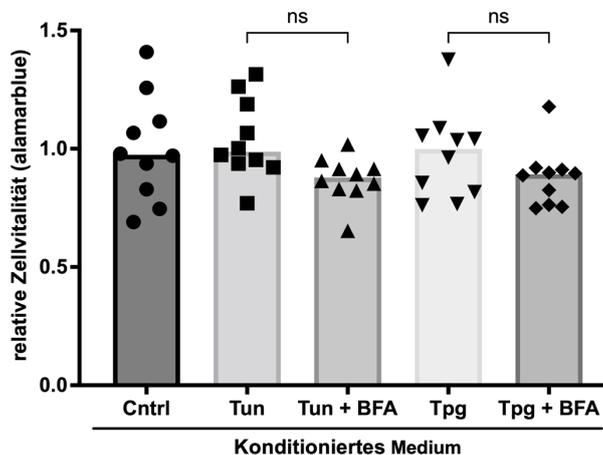


Abb. 5: Zellvitalität der pulmonal-arteriellen glatten Muskelzellen unter konditioniertem Medium. Nach einer Behandlung naiver PASMC mit CM über 48 h wurde die Zellvitalität mit alamarblue™ gemessen ($n = 10$). BFA: Brefeldin A, CM: Konditioniertes Medium, Cntrl: Kontroll-CM, PASMC: Pulmonal-arterielle glatte Muskelzellen, TUN: Tunicamycin-CM, TUN+BFA: Tunicamycin-Brefeldin A-CM, TPG: Thapsigargin-CM, TPG+BFA: Thapsigargin-Brefeldin-A-CM. Einfaches lineares Modell (ANOVA). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ (modifiziert nach Al Zaidi et al., 2022, S. 564)

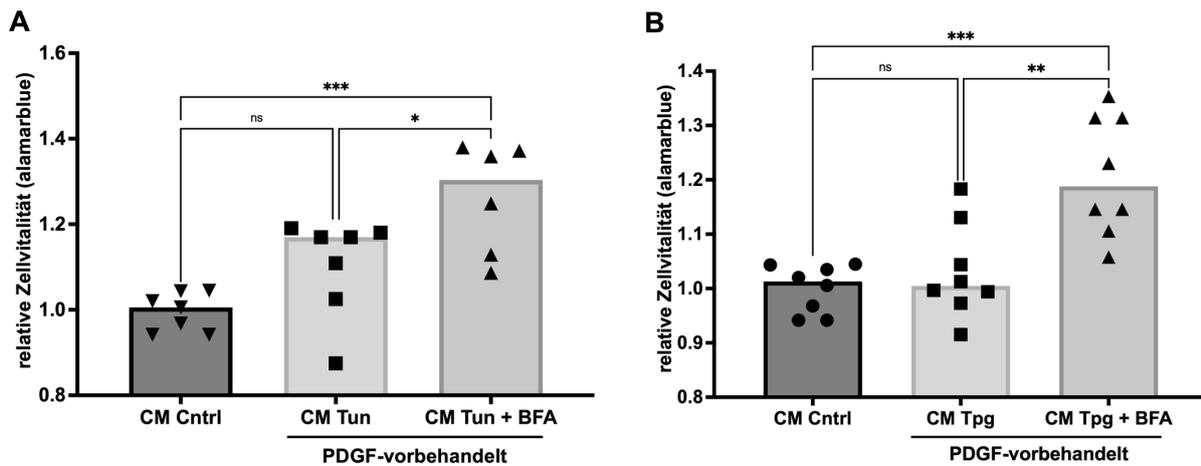


Abb. 6: Das konditionierte Medium moduliert die Zellvitalität unter Hyperproliferation. Mithilfe von alamarblue™ erfolgte die Messung der Zellvitalität der PASC, die zuerst 48 h mit dem Wachstumsfaktor PDGF (30 ng/ml) zur Hyperproliferation stimuliert und anschließend 48 h mit CM behandelt wurden. **A:** Behandlung mit TUN-CM bzw. TUN-BFA-CM (n = 7). **B:** Behandlung mit TPG-CM bzw. TPG-BFA-CM (n = 8). *BFA: Brefeldin A, CM: Konditioniertes Medium, Cntrl: Kontroll-CM, PASC: Pulmonal-arterielle glatte Muskelzellen, PDGF: Platelet Derived Growth Factor, TUN: Tunicamycin-CM, TUN+BFA: Tunicamycin-Brefeldin A-CM, TPG: Thapsigargin-CM, TPG+BFA: Thapsigargin-Brefeldin-A-CM.* Einfaches lineares Modell (ANOVA). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ (modifiziert nach Al Zaidi et al., 2022, S. 565)

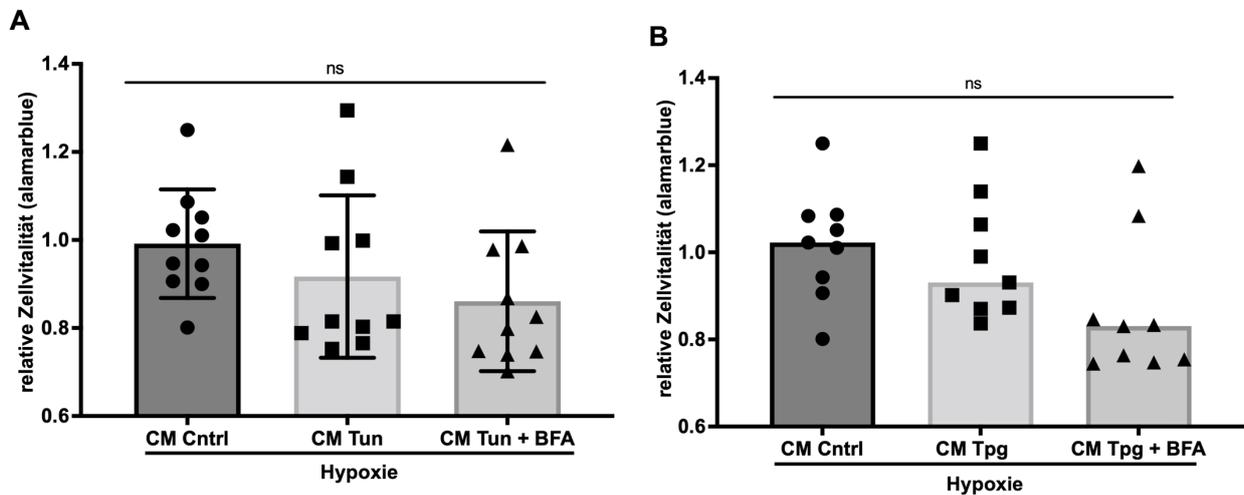


Abb. 7: Die Zellvitalität der PASC unter konditioniertem Medium und Hypoxie. Die Ermittlung der Zellvitalität erfolgte mittels alamarblue™, nachdem naive PASC mit CM für 48 h unter hypoxischen Bedingungen (1 % O₂, 5 % CO₂) behandelt worden waren **A:** Behandlung mit TUN-CM bzw. TUN-BFA-CM, **B:** Behandlung mit TPG-CM bzw. TPG-BFA-CM (je n = 10). *BFA: Brefeldin A, CM: Konditioniertes Medium, Cntrl: Kontroll-CM, PASC: Pulmonal-arterielle glatte Muskelzellen, TUN: Tunicamycin-CM, TUN+BFA: Tunicamycin-Brefeldin A-CM, TPG: Thapsigargin-CM, TPG+BFA: Thapsigargin-Brefeldin-A-CM.* Einfaches lineares Modell (ANOVA). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ (modifiziert nach Al Zaidi et al., 2022, Supplementary Figures)

3.2.2 Oxidativer Stress

Unter zellulärem Stress ist die Bildung von ROS wie H_2O_2 begünstigt, wie es auch in der PAH geschieht (Xu et al., 2022). Mittels DCFDA konnte das Ausmaß des oxidativen Milieus in CM-behandelten PASMCM gemessen werden.

TUN-CM verringerte das Ausmaß oxidativen Stresses unter basalen Bedingungen signifikant gegenüber der Kontrollgruppe (Cntrl 1,0-fach, TUN 0,61-fach, TUN+BFA 0,78-fach, ANOVA $p = 0,029$) (vgl. Abb. 8). Dieser Effekt zeigte sich ebenso unter zusätzlichem oxidativem Stress, der durch die Exposition mit H_2O_2 über die letzte Stunde der Inkubation erzeugt wurde (Cntrl 1,0-fach, TUN 0,71-fach, TUN+BFA 0,76-fach, ANOVA $p = 0,039$) (vgl. Abb. 9 A). Die Bildung von ROS wurde durch TPG-CM und TPG-BFA-CM nicht wesentlich verändert (vgl. Abb. 8, Abb. 9 B).

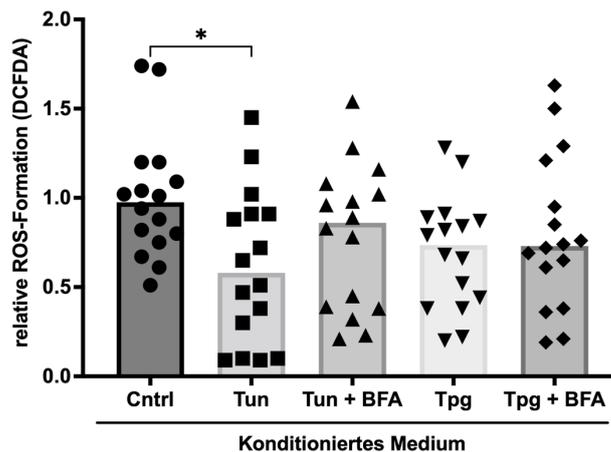


Abb. 8: Die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies wird durch konditioniertes Medium beeinflusst. Mithilfe eines DCFDA-Assays wurde der relative Gehalt der ROS in PASMCM gemessen, die zuvor 48 h unter CM inkubiert hatten ($n = 16$). *BFA*: Brefeldin A, *CM*: Konditioniertes Medium, *Cntrl*: Kontroll-CM, *DCFDA*: 2',7'-Dichlorofluorescein, *PASMCM*: Pulmonal-arterielle glatte Muskelzellen, *ROS*: Reaktive Sauerstoffspezies, *TUN*: Tunicamycin-CM, *TUN+BFA*: Tunicamycin-Brefeldin A-CM, *TPG*: Thapsigargin-CM, *TPG+BFA*: Thapsigargin-Brefeldin A-CM. Einfaches lineares Modell (ANOVA). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ (modifiziert nach Al Zaidi et al., 2022, S. 566)

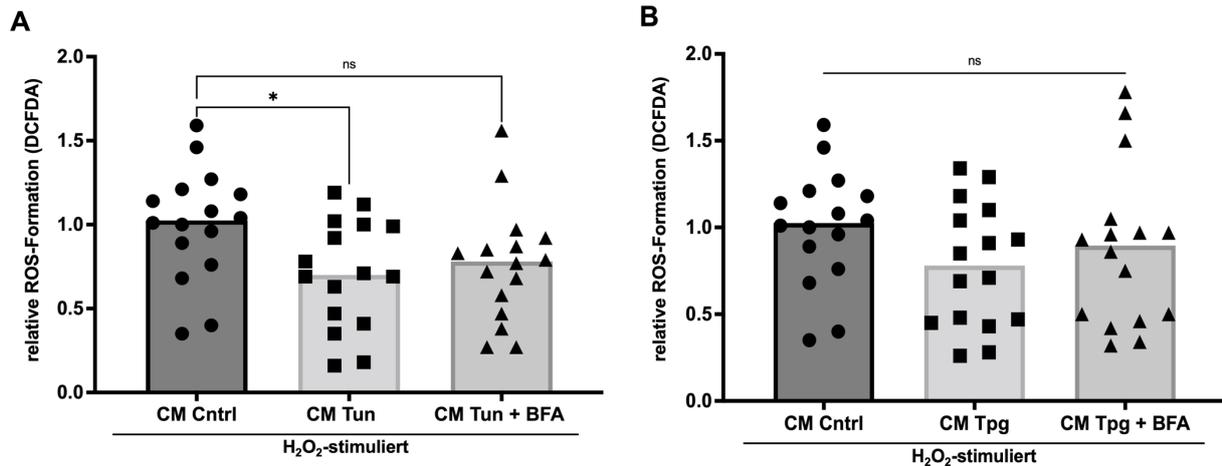


Abb. 9: Der Einfluss konditionierten Mediums auf oxidativen Stress unter H_2O_2 -Stimulation. Der relative ROS-Gehalt wurde mit einem DCFDA-Assay nach Behandlung naiver PASMCM mit CM über 48 h sowie $75 \mu M H_2O_2$ über eine weitere 1 h gemessen. **A:** Unter der Erzeugung oxidativen Stresses ist das Ausmaß der ROS signifikant geringer, wenn die PASMCM mit TUN-CM behandelt wurden, im Vergleich zur Kontrollpopulation ($n = 16$). **B:** Es konnte bei TPG-CM gegenüber TPG+BFA-CM kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden ($n = 16$). *BFA: Brefeldin A, CM: Konditioniertes Medium, Cntrl: Kontroll-CM, DCFDA: 2',7'-Dichlorofluorescein, H_2O_2 : Wasserstoffperoxid, PASMCM: Pulmonal-arterielle glatte Muskelzellen, ROS: Reaktive Sauerstoffspezies, TUN: Tunicamycin-CM, TUN+BFA: Tunicamycin-Brefeldin A-CM, TPG: Thapsigargin-CM, TPG+BFA: Thapsigargin-Brefeldin A-CM. Einfaches lineares Modell (ANOVA). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ (modifiziert nach Al Zaidi et al., 2022, S. 566)*

3.2.3 Genexpression

Im folgenden Versuch wurde analysiert, wie die Behandlung mit CM über 48 h die Expression verschiedener Entzündungsmediatoren und ER-Stress-Marker in den PASMCM beeinflusst. In einer PCR wurde die mRNA-Expression der Zielelemente mittels einer $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode quantifiziert.

Das Expressionsniveau von GRP78 wurde unter der Behandlung mit TUN-BFA-CM erheblich mehr gesteigert als in Zellen der TUN-CM- und Kontrollgruppe (Cntrl 1,0-fach, TUN 6,5-fach, TUN+BFA 26-fach, $p = 0,007$) (vgl. Abb. 10 A). Dies spiegelte sich in den Zellen unter TPG-CM- und TPG-BFA-CM-Inkubation wider (Cntrl 1,0-fach, TPG 17,1-fach, TPG+BFA 27,7-fach, $p < 0,0001$) (vgl. Abb. 10 B). Im Expressionsniveau der mRNA von CHOP war kein signifikanter Unterschied festzustellen (vgl. Abb. 10 C und D).

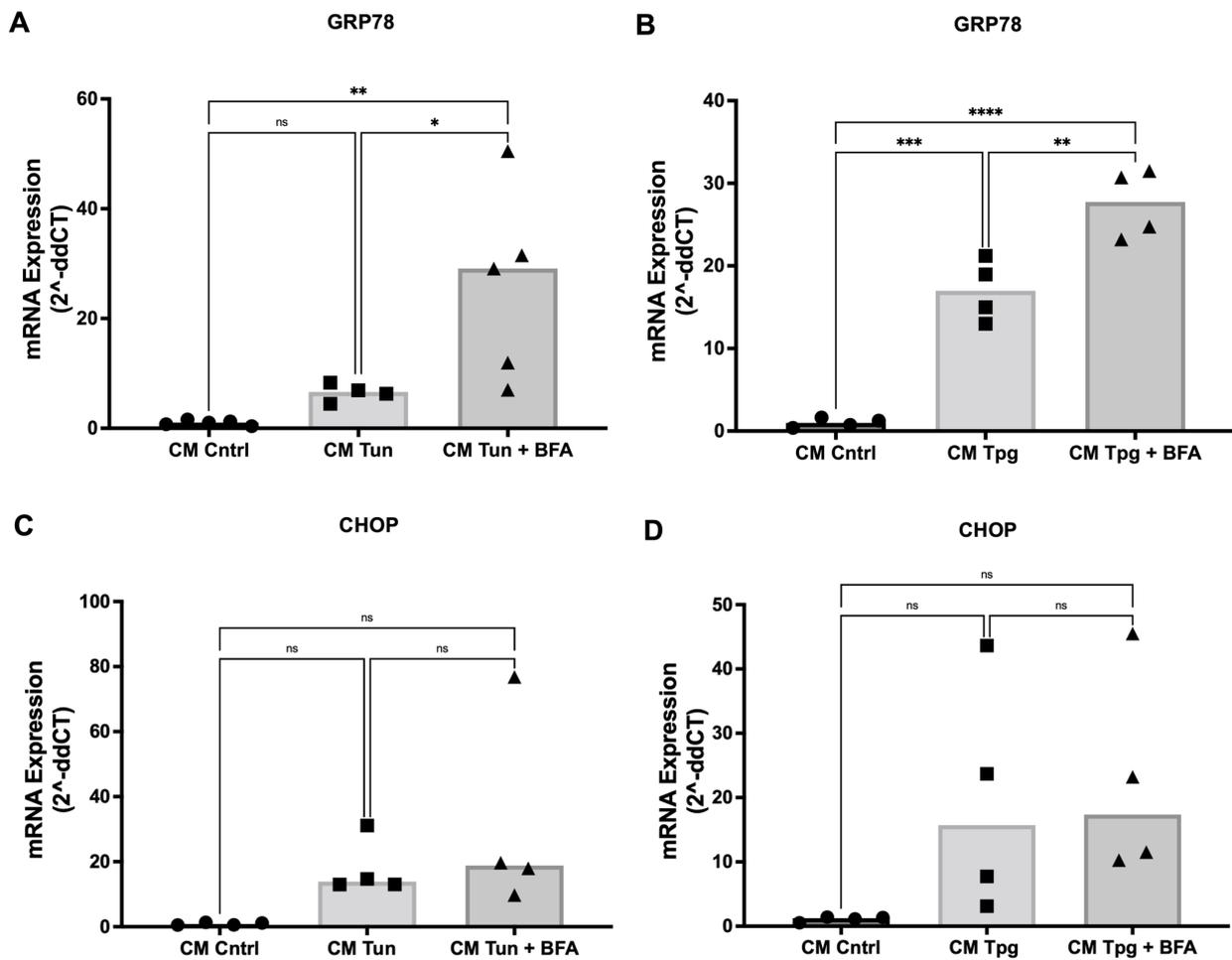


Abb. 10: Konditioniertes Medium, das von Zellen unter ER-Stress stammt, reguliert die Genexpression in Zielzellen unterschiedlich. **A:** Die GRP78-Expression wurde unter der 48 h-Behandlung mit TUN-CM bzw. TUN-BFA-CM ($n = 5$) und **B:** TPG-CM bzw. TPG-BFA-CM ($n = 3$) signifikant beeinflusst. **C-D:** Der Unterschied der Expressionsniveaus der CHOP-mRNA fiel nach Behandlung der PSMC mit CM über 48 h nicht signifikant aus ($n = 5$). Die Messungen erfolgten in einer RT-PCR mit Quantifizierung durch die $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode. *BFA: Brefeldin A, CHOP: Homologes C/EBP-Protein, CM: Konditioniertes Medium, Cntrl: Kontroll-CM, GRP78: Glucose-Regulierte Proteine 74kDa, mRNA: Messenger RNA, PSMC: Pulmonal-arterielle glatte Muskelzellen, RT-PCR: Real-Time Polymerase Kettenreaktion, TUN: Tunicamycin-CM, TUN+BFA: Tunicamycin-Brefeldin A-CM, TPG: Thapsigargin-CM, TPG+BFA: Thapsigargin-Brefeldin A-CM.* Einfaches lineares Modell (ANOVA). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ (modifiziert nach Al Zaidi et al., 2022, S. 567 und Supplementary Figures)

Bei PAH- Patienten*innen werden zahlreiche Entzündungsmediatoren wie NFκB und IL-6 verstärkt aktiviert und produziert und stehen mit dem klinischen Erscheinungsbild der Patienten*innen in Verbindung (Hu et al., 2020). Die Expressionsrate von NFκB-mRNA stieg nur in Zellen unter TUN-BFA-CM signifikant (Cntrl 1,0-fach, TUN 0,49-fach, TUN+BFA 4,55-fach ANOVA $p = 0,016$), wohingegen die Behandlung mit TUN-CM die Rate verringerte, wenn auch nicht signifikant (vgl. Abb. 11 A). Interessanterweise verhielt sich die Expression des Interleukins IL-6 gegenläufig. Unter TUN-CM fiel die Expression signifikant höher aus als in der Kontrollgruppe, während die Behandlung mit TUN-BFA-CM die mRNA-Expression von IL-6 nur gering steigerte (Cntrl 1,0-fach, TUN 3,5-fach, TUN+BFA 1,2-fach, ANOVA $p = 0,005$) (vgl. Abb. 11 C). Die Behandlung mit TPG-CM und TPG-BFA-CM erbrachte keinen signifikanten Unterschied auf die NFκB- und IL-6-Expression (vgl. Abb. 11 B und D).

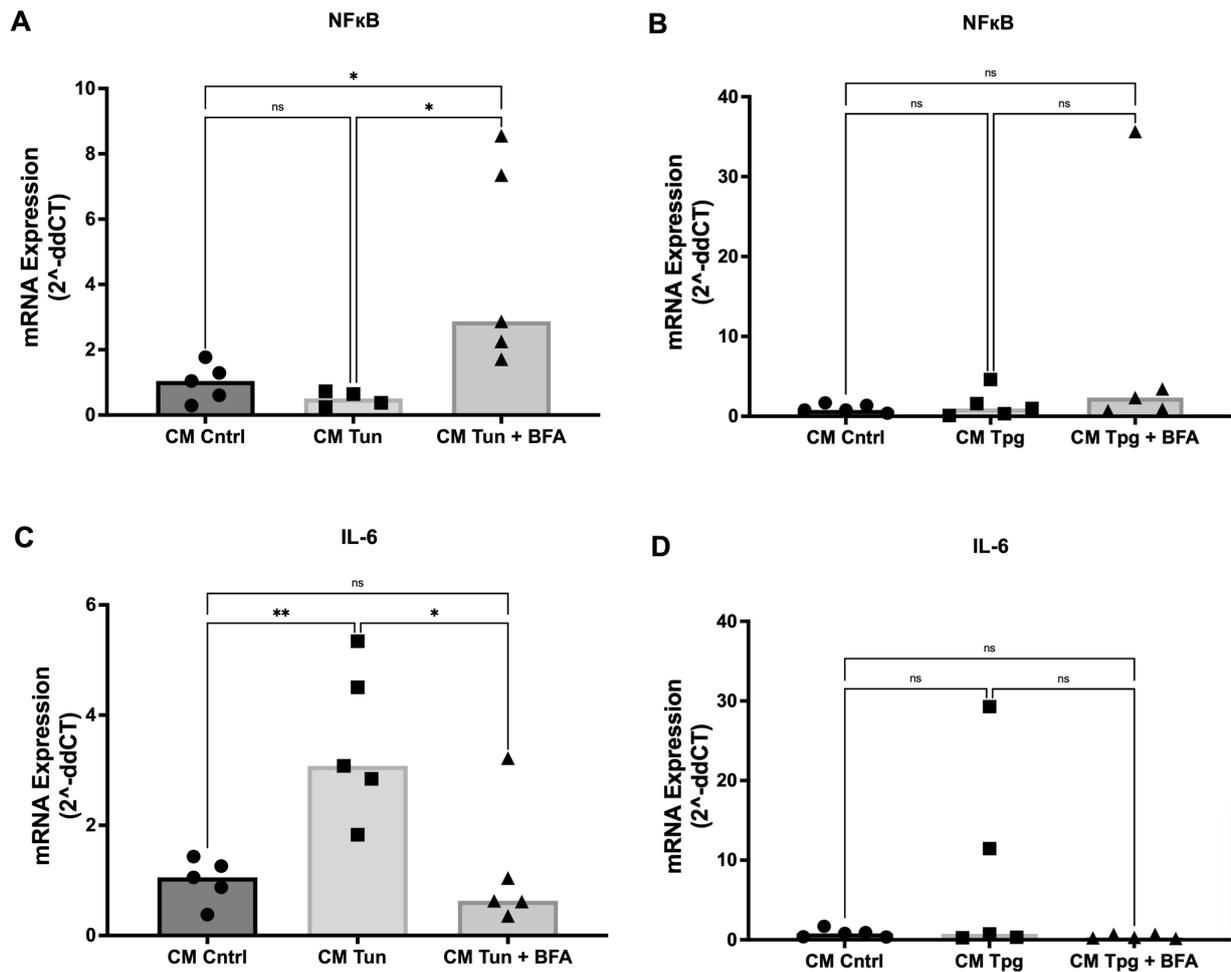


Abb. 11: Modulation der Genexpression unter Behandlung mit konditioniertem Medium. Während die NFκB-Expression unter Behandlung über 48 h mit **A:** TUN-CM bzw. TUN-BFA-CM signifikant moduliert wurde, war dies unter **B:** TPG-CM und TPG-BFA-CM nicht zu beobachten (je n = 5). Der Unterschied der IL-6-Expression fiel unter 48 h-Behandlung mit **C:** TUN-CM und TUN-BFA-CM signifikant aus, demgegenüber beeinflusste die Behandlung mit **D:** TPG-CM und TPG-BFA-CM die IL-6-Expression nicht signifikant (je n = 5). Die Messungen erfolgten in einer RT-PCR mit Quantifizierung durch die 2^{-ΔΔCT}-Methode. *BFA: Brefeldin A, CHOP: Homologes C/EBP-Protein, CM: Konditioniertes Medium, Cntrl: Kontroll-CM, IL-6: Interleukin 6, mRNA: Messenger RNA, NFκB: Nuclear Factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells, PASMC: Pulmonal-arterielle glatte Muskelzellen, RT-PCR: Real-Time Polymerase Kettenreaktion, TUN: Tunicamycin-CM, TUN+BFA: Tunicamycin-Brefeldin A-CM, TPG: Thapsigargin-CM, TPG+BFA: Thapsigargin-Brefeldin A-CM. Einfaches lineares Modell (ANOVA). *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.0001(modifiziert nach Al Zaidi et al., 2022, S 567 und Supplementary Figures)*

3.3 Wirkungen von rekombinatem GRP78

Um zu spezifizieren, ob die Ergebnisse, die unter CM gemessen wurden, auf GRP78 zurückführbar sind, wurden Zellen für 24 h mit rekombinatem GRP78 in steigenden Konzentrationen inkubiert und im Anschluss auf die gleichen Aspekte wie zuvor untersucht.

Die Stimulation mit rekombinatem GRP78 führte zu keiner signifikanten Änderung der Zellvitalität, weder unter Standardbedingungen noch unter Hyperproliferation oder Hypoxie (Cntrl 1,0-fach, 10 ng/ml rekombinantes GRP78 1,06-fach, 100 ng/ml rekombinantes GRP78 1,04-fach, 1000 ng/ml rekombinantes GRP78 1,02-fach, ANOVA $p = 0,36$) (vgl. Abb. 12).

Allerdings bewirkte rekombinantes GRP78 konzentrationsabhängig eine Veränderung der mRNA-Expression verschiedener Zielgene. So stieg unter niedriger Dosierung des rekombinanten GRP78 (10 ng/ml) sowohl das Expressionsniveau von GRP78 selbst (Cntrl 1,0-fach, 10 ng/ml rekombinantes GRP78 1,52-fach, 100 ng/ml rekombinantes GRP78 1,25-fach, 1000 ng/ml rekombinantes GRP78 0,39-fach, ANOVA $p = 0,048$) als auch das von NF κ B (Cntrl 1,0-fach, 10 ng/ml rekombinantes GRP78 3,37-fach, 100 ng/ml rekombinantes GRP78 1,50-fach, 1000 ng/ml rekombinantes GRP78 0,96-fach, ANOVA $p = 0,064$) und HIF α (Cntrl 1,0-fach, 10 ng/ml rekombinantes GRP78 1,61-fach, 100 ng/ml rekombinantes GRP78 1,58-fach, 1000 ng/ml rekombinantes GRP78 0,88-fach, ANOVA $p = 0,058$) deutlich an. Wurde die Konzentration des rekombinanten GRP78 erhöht, sank die Expressionsrate obengenannter Gene erneut und lag sogar unter dem Expressionsniveau der Kontrollbedingung (vgl. Abb. 13 A-C).

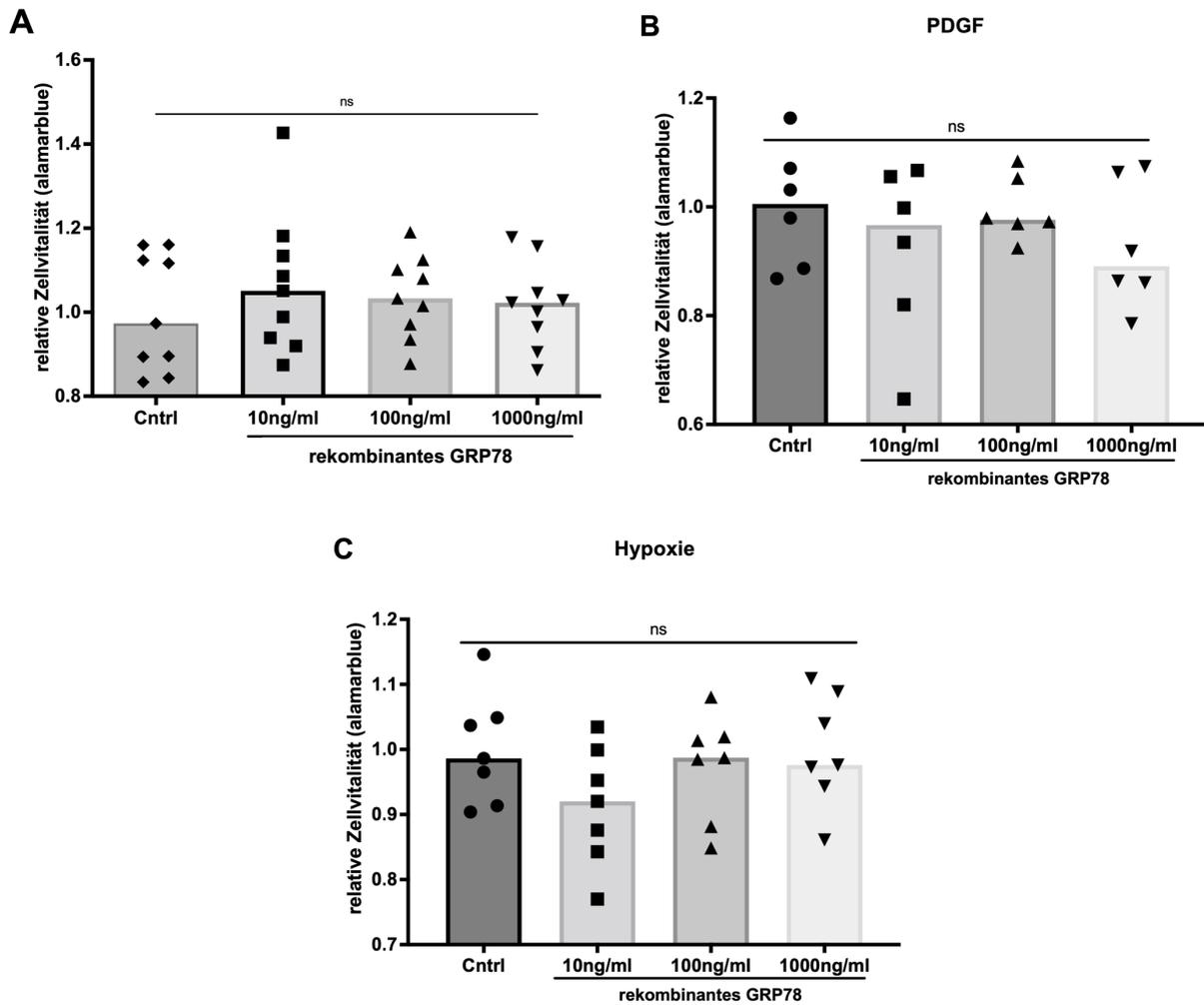


Abb. 12: Der Einfluss von rekombinatem GRP78 auf die Zellvitalität. Die Behandlung von PASCs mit rekombinatem GRP78 über 24h hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Zellvitalität, gemessen mit alamarblue™ unter **A:** basalen Bedingungen (n = 9). **B:** nach vorheriger Stimulation mit PDGF über 48 h (n = 6). **C:** bzw. unter hypoxischen Bedingungen (1 % O₂, 5 % CO₂) (n = 7). Cntrl: Kontrolle, GRP78: Glucose-regulated protein 74 kDa, PDGF: Platelet Derived Growth Factor. Einfaches lineares Modell (ANOVA). *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.0001(modifiziert nach Al Zaidi et al., 2022, S 568 und Supplementary Figures)

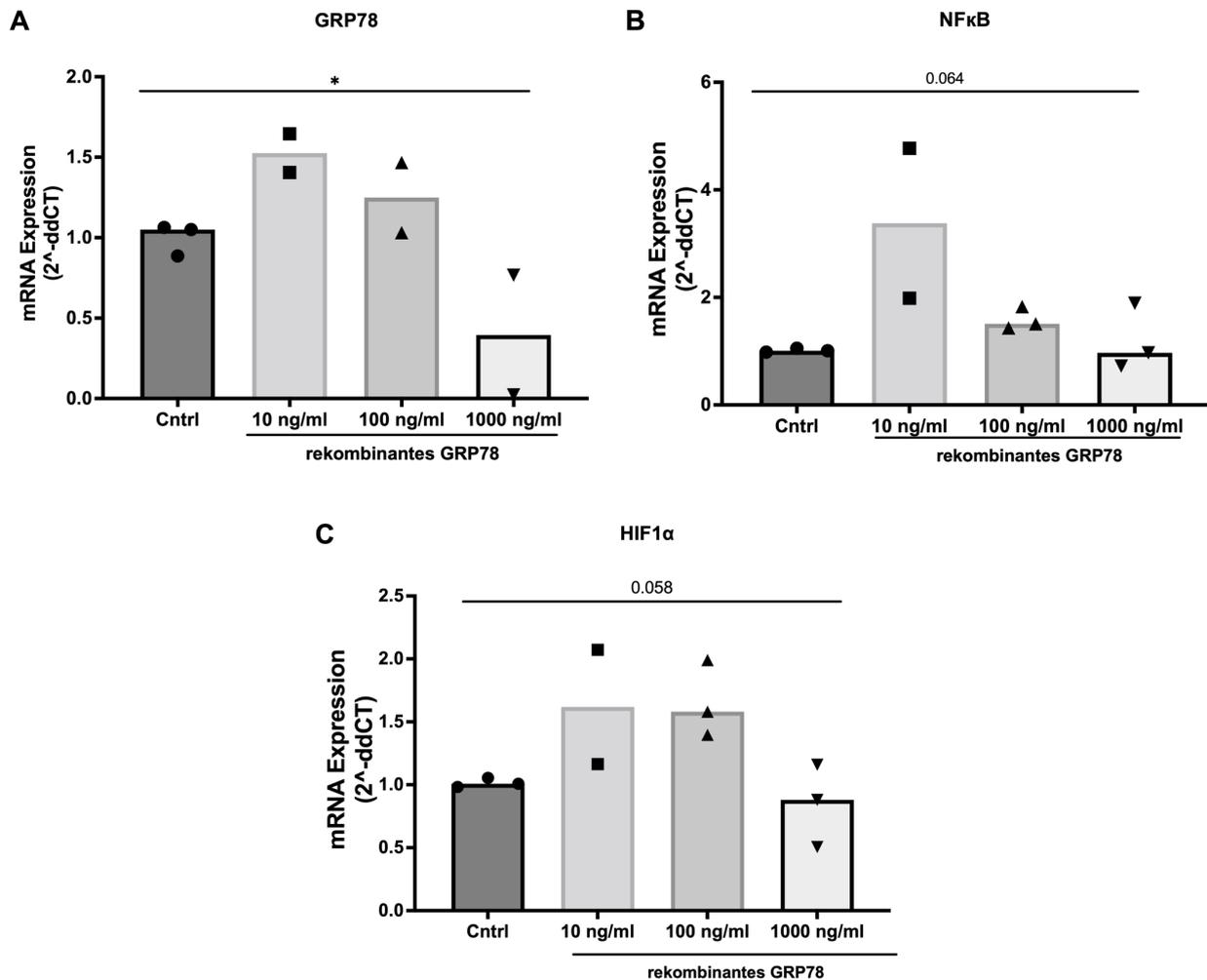


Abb. 13: Rekombinantes GRP78 verringert die Expression von ER-Stress-, Entzündungs- und Hypoxiemarkern dosisabhängig. Unter Behandlung der PSMC mit rekombinantem GRP78 über 24 h verringerte signifikant die Expression der **A:** GRP78-mRNA, **B:** NFκB-mRNA sowie **C:** HIFα-mRNA (je n = 3). Die Messungen erfolgten in einer RT-PCR mit Quantifizierung durch die $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode. Cntrl: Kontrolle, GRP78: Glucose-regulated protein 74 kDa, HIFα: Hypoxie-Induzierter Faktor alpha, NFκB: Nuclear Factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells, RT-PCR: Real-Time Polymerase Kettenreaktion. Einfaches lineares Modell (ANOVA). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ (modifiziert nach Al Zaidi et al., 2022, S. 568)

4. Diskussion

Die PAH ist eine folgenschwere Erkrankung mit begrenzten therapeutischen Möglichkeiten, sodass die Identifikation und Charakterisierung neuartiger Zielstrukturen vonnöten sind. Die vorliegende Arbeit konnte darlegen, dass GRP78 von pulmonalen Gefäßmuskeln unter ER-Stress ausgeschüttet wird. Extrazelluläres GRP78 verringerte Hyperproliferation und oxidativen Stress der Zellen und modulierte die Expression bedeutender Inflammations- und ER-Stress-Marker.

Diese Studie legt dar, dass GRP78 von PASMC unter ER-Stress aktiv sezerniert wird, der mittels Tunicamycin und Thapsigargin ausgelöst wurde. In anderen Studien wurde dies in ähnlicher Weise beobachtet. Blackwood et al. (2020) wiesen an Kardiomyozyten eine Thapsigargin-induzierte Sekretion von GRP78 nach, die sich positiv auf das Überleben der Zellen auswirkte. Dabei konnten sie die Sekretion von GRP78 durch Thapsigargin auf einen ER-abhängigen Mechanismus zurückführen. In einer anderen Studie wurde festgestellt, dass humane Gefäßmuskeln extrazelluläre Vesikel nutzen, um GRP78 unter ER-Stress auszuschütten. Dabei erzeugten Zellen atherosklerotischer Gefäßabschnitte erhöhte Mengen GRP78-haltiger extrazellulärer Vesikel (Furmanik et al., 2021).

Obwohl sowohl Tunicamycin als auch Thapsigargin ER-Stress verursachen, wirkten sie sich in unserer Studie unterschiedlich auf die Sekretion von GRP78 aus. Unter Tunicamycin konnte die Ausschüttung vollständig durch BFA unterdrückt werden, während sich die GRP78-Sekretion unter Inkubation mit Thapsigargin und BFA nicht vollständig hemmen ließ. Die beiden Substanzen lösen ER-Stress auf verschiedene Weisen aus. Tunicamycin hemmt die N-Glykosylierung bei der Proteinsynthese im ER, Thapsigargin hingegen greift über Inhibition der Sarco-Endoplasmatischen Calcium-ATPase (SERCA) in die Kalziumhomöostase ein (Doan et al., 2015; Lee, 2005). Bei Blackwood et al. (2020) kam es unter Tunicamycin nicht zur GRP78-Sekretion und die Autoren zeigten, dass in den kardialen Zellen die Thapsigargin-induzierte Sekretion von GRP78 kalziumabhängig geschah. Dagegen verursachten bei Furmanik et al. (2021) Tunicamycin und Thapsigargin vergleichbare GRP78-Ausschüttungen aus den Gefäßmuskeln. In Verbindung mit unseren Ergebnissen deutet dies darauf hin, dass die Sekretionsmechanismen von GRP78 unter ER-Stress zelltyp- und substanzspezifisch sind.

Die Funktionsstörung der pulmonalen Gefäßzellen ist ein wichtiges Element in der Pathogenese der Erkrankung. Sie zeichnen sich in der PAH durch Hyperproliferation und Apoptoseresistenz aus. Diese Prozesse werden von oxidativem Stress und perivaskulärer Entzündung aufrechterhalten und vorangetrieben (Xiao et al., 2020). Die Ergebnisse dieser Studie legen dar, dass GRP78 diese Komponenten der PAH-Pathogenese beeinflusst.

Die Zellvitalität der PASMC wurde unter basalen Bedingungen durch die Inkubation mit CM nicht wesentlich verändert, jedoch beschränkte GRP78-haltiges CM eine durch den Wachstumsfaktor PDGF induzierte Hyperproliferation. Es ist bekannt, dass PDGF in der PAH Muskularisierung und Kontraktion der pulmonalen Gefäße begünstigt (Rieg et al., 2019). In früheren Untersuchungen von Lungen transplantierte PAH- Patienten*innen wurde eine erhöhte PDGF-Konzentration in den Gefäßen gemessen und die entsprechenden PDGF-Rezeptoren waren mehrheitlich auf PASMC lokalisiert. Die erhöhten Werte des Wachstumsfaktors und seines Rezeptors gingen mit einer gesteigerten Proliferation und Migration der Muskelzellen einher (Perros et al., 2008). Eine weitere Studie wies nach, dass Imatinib, ein Tyrosin-Kinase-Inhibitor, humane Pulmonalgefäße relaxiert. Imatinib hemmt den PDGF-Rezeptor und wirkte zum einen direkt relaxierend auf kontraktile Gefäße und konnte zum anderen durch eine Reduktion von PDGF die Kontraktion vermindern (Rieg et al., 2019). Noch ist unklar, ob GRP78 über eine Interaktion mit dem PDGF-Rezeptor dämpfend auf die Hyperproliferation der PASMC wirkt. Zudem bleibt interessant, ob GRP78 *in vivo* ebenso die Kontraktion, die PDGF verursachen kann, mindert und so sowohl anti-proliferativ als auch relaxierend auf pulmonale Muskelzellen wirken kann. Die Ergebnisse dieser Arbeit sprechen dafür, dass es die krankheitsfördernden Umstände benötigt, damit GRP78 anti-proliferativ wirkt. Dies ist wichtig, um eine Toxizität für andere Zellen, z.B. glatte Muskelzellen anderer Gefäße, auszuschließen.

Hypoxie und Entzündung sind begünstigend für die Entstehung und Aufrechterhaltung von oxidativem Stress, der die Zellhomöostase stört und ER-Stress fördert (Siques et al., 2021; Zhang et al., 2023). GRP78-haltiges Medium verringerte das Ausmaß des oxidativen Stresses, sogar unter Hinzugabe zusätzlicher ROS in Form von H₂O₂. Die Autoren Bi et al. (2018) befürworten, dass GRP78 die Zellfunktion durch Verringerung von oxidativem Stress erhält und Zellschäden vorbeugt. In ihrer Studie senkte GRP78 die Apoptoserate

und die ROS-Toxizität in Kardiomyozyten, die von Ischämie betroffen waren, und verminderte bei Mäusen Ischämie-Schäden am Herzen (Bi et al., 2018). Aufgrund der kardialen Belastung in der PAH ist die kardioprotektive Wirkung von GRP78 auch für diese Erkrankung relevant.

Die perivaskuläre Entzündung fördert die Entstehung und Progression der PAH und erhöhte pro-inflammatorische Zytokinspiegel stehen mit der Mortalität der Patienten*innen in Verbindung (Cracowski et al., 2014; Huertas et al., 2020). Die hier vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass GRP78 die Expression einiger Entzündungs- und ER-Stress-Marker signifikant moduliert.

Die Ergebnisse dieser Arbeit belegen, dass GRP78 die Expression von NFκB zu reduzieren vermag. Unter Inkubation mit GRP78-freiem CM war die Expression von NFκB signifikant stärker als unter Einfluss von GRP78. Ebenso sank die Konzentration von NFκB-mRNA zunehmend mit steigender Dosierung von rekombinantem GRP78. NFκB initiiert als Entzündungsmediator die Bildung vieler pro-inflammatorischer Zytokine und stößt Entzündungskaskaden an, bekanntermaßen auch in der PAH (Hosokawa et al., 2013). In Untersuchungen konnte die Progression einer PAH bei Ratten durch einen NFκB-Inhibitor aufgehalten werden. Die Studie zeigte, dass NFκB in entscheidende Wege involviert ist, die die Proliferation der PASMC und Muskularisierung der Lungenarteriolen fördern. Darüber hinaus wirkte sich die NFκB-Inhibition hämodynamisch positiv aus, denn der Anstieg des rechtsventrikulären Drucks konnte verhindert werden (Hosokawa et al., 2013). Zaiss et al. (2019) beobachteten unter der Gabe von exogenem GRP78 in einem Tiermodell zur rheumatoiden Arthritis einen Rückgang der Entzündung sowie eine reduzierte Ausprägung der Erkrankung. Sie konnten die entzündungshemmende Wirkung von GRP78 unter anderem auf die Verminderung von NFκB und seiner Aktivität zurückführen (Zaiss et al., 2019). Daher ist die Suppression von NFκB durch GRP78 vielversprechend für therapeutische Ansätze.

Interessanterweise verhielt sich die Expressionsrate von IL-6 unter GRP78-Einfluss gegenteilig. GRP78-haltiges CM steigerte die mRNA-Expression von IL-6 ebenso wie die Behandlung mit rekombinantem GRP78. In der Literatur besteht keine Einigkeit über die Rolle von IL-6 in der PAH. Eine Studie weist darauf hin, dass PASMC erheblich zur IL-6-Sekretion beitragen, denn die Gen- und Proteinexpression von IL-6 war in

Untersuchungen in PASMIC signifikant höher als in den pulmonal-arteriellen Endothelzellen, die Patienten*innen mit idiopathischer PAH entnommen worden waren (Simpson et al., 2020). Darüber hinaus sahen die Autoren gesteigerte IL-6-Spiegel mit einer erhöhten Mortalität der Patienten*innen assoziiert und stimmen damit mit Erkenntnissen früherer Studien überein (Simpson et al., 2020; Soon et al., 2010). In einer anderen Studie dagegen konnte keine signifikante Assoziation zwischen erhöhtem IL-6 und der Mortalität verzeichnet werden (Cracowski et al., 2014). Daher bleibt die prognostische Aussagekraft der GRP78-induzierten IL-6-Erhöhung weiter zu untersuchen.

Die Expression von GRP78 selbst sank unter Inkubation mit GRP78-haltigem CM wie auch unter rekombinantem GRP78, dabei korrelierte die Abnahme des GRP78-mRNA-Gehalts mit der steigenden Konzentration des rekombinanten GRP78. Möglicherweise ist dies Ausdruck einer intrazellulären Verminderung der UPR-Aktivität, die für eine protektive Wirkung des exogenen GRP78 auf die Zelle spricht. Über welche Mechanismen exogenes GRP78 diese Expression beeinflusst, ist derzeit jedoch noch unklar. Die Expression des ER-Stress-Markers CHOP wurde unter GRP78-Behandlung nicht supprimiert, was auf die vielfältigen Mechanismen der UPR zurückführbar ist. Untersuchungen zeigten, dass chemische Chaperone die Proliferation von PASMIC vermindern, indem sie die Expression von UPR-Markern unterdrücken (Pan et al., 2020). In einem Tiermodell von Dromparis et al. (2013) schützte der Einsatz chemischer Chaperone unter hypoxischen Bedingungen vor einer PAH. Die Autoren führten dies auf eine Normalisierung der PASMIC-Proliferation zurück, die mit einer ATF6-Inaktivierung und dem Rückgang der GRP78-Expression einherging. In Zusammenschau legen die Ergebnisse unserer Studie nahe, dass die ER-Funktionalität eine maßgebliche Rolle in der PAH spielt. Da GRP78 als Chaperon die Bewältigung von ER-Stress fördert, könnte es über eine Normalisierung der Zellfunktion zur Minderung der PAH beitragen.

Nicht alle Ergebnisse, die durch CM erzielt wurden, konnten durch rekombinantes GRP78 reproduziert werden. Die Behandlung nativer Zellen mit GRP78-haltigem CM verbesserte die Zellvitalität und verminderte oxidativen Stress, was von rekombinantem GRP78 größtenteils unbeeinflusst blieb, während die mRNA-Expressionen in gleichem Sinne moduliert wurden. Es ist möglich, dass sezerniertes GRP78 im CM in Zusammenspiel mit anderen Faktoren steht, die seine Wirkung beeinflussen. Es ist bekannt, dass

Gefäßmuskelzellen unter ER-Stress GRP78 über extrazelluläre Vesikel in Kombination mit weiteren ER-residenten Proteinen ausschütten (Furmanik et al., 2021). Auch Blackwood et al. (2020) ziehen in Betracht, dass sezerniertes GRP78 als Multiproteinkomplex oder durch post-translatorische Modifikationen vitalitätsfördernd wirkt, was den Unterschied zum rekombinanten GRP78 erklären kann. Zudem kann der Unterschied in verschiedenen Wirkebenen begründet sein. GRP78-haltiges CM wirkte erst nach vorheriger Stimulation zur Hyperproliferation wachstumshemmend. Es scheint den Einfluss von Faktoren wie PDGF und seines Rezeptors für die Wirkung von extrazellulärem GRP78 zu benötigen. Dagegen ist die mRNA-Expression ein Prozess, der intrazellulär lokalisiert ist und unter ER-Stress durch die UPR reguliert wird. Dabei spielt auch GRP78 eine entscheidende Rolle in dieser Regulation, indem es die UPR-Effektorproteine unter ER-Stress freigibt (Zhang et al., 2019). Möglicherweise moduliert exogenes GRP78 die Genexpression ohne unmittelbaren Einfluss anderer Faktoren und daher unabhängig davon, ob es aus CM stammte oder als rekombinantes GRP78 hinzugegeben wurde.

Darüber hinaus hatten die unterschiedlichen Behandlungen der Zellen Einfluss darauf, wie ihre CM auf native Zielzellen wirken. In der Zellvitalität unterschieden sich die Effekte von Tunicamycin-induziertem und Thapsigargin-induziertem CM kaum, wohingegen sie sich bezüglich des oxidativen Stresses und der mRNA-Expression deutliche Unterschiede zeigten. Untersuchungen zeigten, dass beide Substanzen die Transkription unterschiedlicher Zielgene induzieren (Schmitz et al., 2018). Es ist bekannt, dass Thapsigargin unter anderem pro-inflammatorische Zielgene wie NFκB, IL-6 sowie pro-apoptotische Transkriptionsfaktoren reguliert. Zwar beeinflusst Tunicamycin diese Faktoren ebenfalls, doch darüber hinaus steigert es auch die Genexpression von Faktoren zur ER-Stress-Bewältigung und reduziert proliferationsfördernde Enzyme. Dies geschieht über die einzelnen UPR-Effektorproteine unabhängig voneinander (Schmitz et al., 2018). Die Gesamtheit der induzierten Faktoren, die sich unter Tunicamycin und Thapsigargin unterschiedlich zusammensetzen, ist eine mögliche Erklärung für die Wirkdifferenzen der CM auf die Zielzellen.

In einer kürzlichen Veröffentlichung wurde eine Korrelation zwischen zirkulierendem GRP78 im Blut von PAH-Patienten*innen mit ihrer Prognose festgestellt. Patienten*innen mit hohen zirkulierenden GRP78-Konzentrationen wiesen eine niedrigere

Risikokonstellation auf (Al Zaidi et al., 2022). Gleiches zeigte sich bei Patienten*innen mit Lungenerkrankungen, bei denen ein erhöhter GRP78-Spiegel ebenfalls mit einer niedrigeren Risikokonstellation einherging (Al Zaidi et al., 2023). Anhand der Ergebnisse einer weiteren Studie konnten für Patienten*innen, die einen Katheter-gestützten Aortenklappenersatz erhielten, hohe GRP78-Spiegel mit einem besseren Outcome in Verbindung gebracht werden (Aksoy et al., 2021). Zusammen mit unserem Nachweis der aktiven Sekretion aus PSMC stellt GRP78 einen potenziellen Marker in der PAH-Diagnostik dar. GRP78 wird auch von anderen Autoren zur Abschätzung des kardiovaskulären Risikos vorgeschlagen, da bei metabolischen Erkrankungen, die mit chronischer Inflammation einhergehen, ebenfalls erhöhte GRP78-Spiegel bestimmt wurden (Girona et al., 2019).

Darüber hinaus bietet GRP78 eine Möglichkeit, therapeutisch in die dysfunktionalen Geschehen einzugreifen, die die PAH kennzeichnen. Verschiedene Studien liefern Erkenntnisse, wie sich die Beeinflussung der Komponenten der Pathogenese auswirkt. In Tiermodellen zur PAH wurden chemische Chaperone eingesetzt, die wie GRP78 die Proteinfaltung verbessern und ER-Stress bewältigen. Durch Normalisierung der Zellfunktion wurde die Proliferation von PSMCs vermindert und ihre Apoptose induziert (Dromparis et al., 2013; Wu et al., 2019), sodass in der Folge die pulmonal-vaskuläre Muskularisierung, der PAP_m sowie der PVR abnahmen. Des Weiteren zeigte sich eine kardio-protective Wirkung durch die chemischen Chaperone, denn die rechtsventrikuläre Hypertrophie wurde aufgehalten, ohne die Hämodynamik der Tiere wesentlich zu beeinträchtigen (Dromparis et al., 2013). Die kardio-protective Wirkung von GRP78 spiegelt sich in weiteren Ergebnissen wider, da es im Tiermodell über eine antioxidative Wirkung Schäden einer Ischämie milderte (Bi et al., 2018). Zusammen mit dieser Studie legen die bisherigen Erkenntnisse nahe, dass GRP78 die wesentlichen Komponenten der PAH-Pathogenese, das vaskuläre Remodelling, das Entzündungsgeschehen und die Rechtsherzinsuffizienz, positiv beeinflussen könnte.

Für den Einsatz von GRP78 als Therapeutikum ist eine effektive Wirkung ebenso wichtig wie eine geringe Toxizität für andere Zellen. In einer Phase I/IIA-Studie von Kirkham et al. (2016) bei Patienten*innen mit rheumatoider Arthritis erwies sich GRP78 als verträglich und sicher. Die Gabe blieb ohne schwerwiegende Arzneimittelreaktion oder systemische Nebenwirkungen, zudem konnte unter der Therapie dosisabhängig bei einigen

Patienten*innen eine vorübergehende Remission der rheumatoiden Arthritis erreicht werden (Kirkham et al., 2016).

Zu den Limitationen der vorliegenden Arbeit gehört, dass lediglich ein Zelltyp untersucht wurde und darüber hinaus keine Daten aus Tiermodellen vorliegen, die eine bessere Übertragbarkeit auf den Menschen gewährleisten würden. Außerdem bleibt nach dieser Studie weiter ungeklärt, welche Sekretionsmechanismen der GRP78-Ausschüttung unter ER-Stress genau zugrunde liegen. Es stellt sich weiterhin die Frage, inwiefern die GRP78-Spiegel bei PAH- Patienten*innen mit den Zytokinspiegeln sowie ihrer Risikokonstellation in Zusammenhang stehen.

Diese Arbeit verdeutlicht einen protektiven Einfluss von sezerniertem GRP78 auf die wesentlichen Merkmale der PAH, indem es Hyperproliferation, oxidativen Stress wie auch die Expression von Entzündungsmarkern moduliert. In Zukunft werden weitere Studien benötigt, um die Wirkmechanismen von GRP78 präziser zu identifizieren und einen möglichen Einsatz von GRP78 als Biomarker in der PAH zu ermitteln.

5. Zusammenfassung

Die pulmonal-arterielle Hypertonie (PAH) ist eine schwere Lungengefäßerkrankung, die durch einen erhöhten Druck in den Pulmonalarterien gekennzeichnet ist. Die PAH manifestiert sich durch Dyspnoe, Leistungsminderung und kann bis hin zu Rechtsherzversagen führen. Ein wesentliches Merkmal ist das vaskuläre Remodelling, das zelluläre Dysfunktion und perivaskuläre Entzündung umfasst und proliferative Veränderungen der Pulmonalarterien verursacht. In den Gefäßzellen führen Störungen im endoplasmatischen Retikulum (ER) zu ER-Stress, der diese Prozesse begünstigt. Als ER-Chaperon spielt das Glucose-regulated protein 78 kDa (GRP78) eine zentrale Rolle in der Bewältigung von ER-Stress und hat sich in entzündlichen Erkrankungen von Bedeutung erwiesen.

Ziel dieser Arbeit war es, im *in vitro*-Modell die Bedeutung von GRP78 in der PAH zu ermitteln. Dazu wurde in pulmonal-arteriellen glatten Muskelzellen (PASMC) ER-Stress verursacht, sodass die zeitabhängige Sekretion von GRP78 ins Zellmedium durch einen Western Blot nachgewiesen werden konnte. Darauf aufbauend wurde konditioniertes Medium (CM) von ER-gestressten Zellen zur Inkubation naiver PASMC genutzt und im Anschluss die Zellvitalität, oxidativer Stress und Genexpression ausgewählter Entzündungs- und ER-Stress-Marker in den Zielzellen analysiert.

CM von PASMC unter ER-Stress reduzierte hyperproliferatives Wachstum und oxidativen Stress der Zielzellen signifikant. Weiterhin modulierte es die Genexpression wichtiger Entzündungs- und ER-Stress-Marker. Wenn die GRP78-Sekretion in das CM zuvor gehemmt worden war, waren diese Effekte nicht zu beobachten. Zusätzlich wurde die direkte Wirkung von rekombinantem GRP78 auf die PASMC bestimmt und ein konzentrationsabhängiger Effekt auf die Genexpression von Entzündungsmarkern festgestellt.

Diese Erkenntnisse stehen im Einklang mit anderen Studien, die eine protektive Wirkung von exogenem GRP78 auf die mit den Erkrankungen einhergehenden Entzündungsreaktionen gezeigt haben. Zudem korrelierte in kardiopulmonalen Erkrankungen ein erhöhter GRP78-Plasmaspiegel mit einer günstigeren Risikokonstellation der Patient*innen.

Zukünftig werden weitere Studien benötigt, um die Wirkmechanismen von GRP78 präziser zu identifizieren und einen möglichen Einsatz von GRP78 als Biomarker in der PAH zu ermitteln.

6. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: UPR-Aktivierung mithilfe von GRP78.	16
Abbildung 2: Versuchsplan zur Auslösung von ER-Stress in pulmonal-arteriellen glatten Muskelzellen in einer Zeitreihe	29
Abbildung 3. Konzept des konditioniertes Mediums	32
Abbildung 4: Pulmonal-arterielle glatte Muskelzellen sezernieren GRP78 unter ER-Stress	39
Abbildung 5: Zellvitalität der pulmonal-arteriellen glatten Muskelzellen unter konditioniertem Medium.....	40
Abbildung 6: Das konditionierte Medium moduliert die Zellvitalität unter Hyperproliferation	41
Abbildung 7: Die Zellvitalität der PASMC unter konditioniertem Medium und Hypoxie ..	41
Abbildung 8: Die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies wird durch konditioniertes Medium beeinflusst.....	42
Abbildung 9: Der Einfluss konditionierten Mediums auf oxidativen Stress unter H ₂ O ₂ -Stimulation	43
Abbildung 10: Konditioniertes Medium, das von Zellen unter ER-Stress stammt, reguliert die Genexpression in Zielzellen unterschiedlich.....	44
Abbildung 11: Modulation der Genexpression unter Behandlung mit konditioniertem Medium	46
Abbildung 12: Der Einfluss von rekombinantem GRP78 auf die Zellvitalität	48
Abbildung 13: Rekombinantes GRP78 verringert die Expression von ER-Stress-, Entzündungs- und Hypoxiemarkern dosisabhängig	49

7. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Hämodynamische Definitionen der pulmonalen Hypertonie.	10
--	----

8. Literaturverzeichnis

- Aksoy, A., Al Zaidi, M., Reppes, E., Becher, M. U., Müller, C., Oldenburg, J., Zimmer, S., Nickenig, G., & Tiyerili, V. (2021). Vitamin K Epoxide Reductase Complex Subunit 1-Like 1 (VKORC1L1) Inhibition Induces a Proliferative and Pro-inflammatory Vascular Smooth Muscle Cell Phenotype. *Front in Cardiovasc Med*, 8. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2021.708946>
- Al Zaidi, M., Marggraf, V., Reppes, E., Nickenig, G., Skowasch, D., Aksoy, A., & Pizarro, C. (2023). Relevance of serum levels of the endoplasmic reticulum stress protein GRP78 (glucose-regulated protein 78 kDa) as biomarker in pulmonary diseases. *Cell Stress Chaperones*, 28(3), 333–341. <https://doi.org/10.1007/s12192-023-01341-0>
- Al Zaidi, M., Pizarro, C., Bley, C., Reppes, 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(5), 561–572. <https://doi.org/10.1007/s12192-022-01292-y>
- Bertolotti, A., Zhang, Y., Hendershot, L. M., Harding, H. P., & Ron, D. (2000). Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nat Cell Bio*, 2(6), 326–332. <https://doi.org/10.1038/35014014>
- Bi, X., Zhang, G., Wang, X., Nguyen, C., May, H. I., Li, X., Al-Hashimi, A. A., Austin, R. C., Gillette, T. G., Fu, G., Wang, Z. V., & Hill, J. A. (2018). Endoplasmic Reticulum Chaperone GRP78 Protects Heart From Ischemia/Reperfusion Injury Through Akt Activation. *Circ Res*, 122(11), 1545–1554. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.312641>
- Blackwood, E. A., Thuerauf, D. J., Stastna, M., Stephens, H., Sand, Z., Pentoney, A., Azizi, K., Jakobi, T., Van Eyk, J. E., Katus, H. A., Glembotski, C. C., & Doroudgar, S. (2020). Proteomic analysis of the cardiac myocyte secretome reveals extracellular protective functions for the ER stress response. *J Mol Cell Cardiol*, 143, 132–144. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2020.04.012>
- Chandel, N. S., Trzyna, W. C., McClintock, D. S., & Schumacker, P. T. (2000). Role of Oxidants in NF- κ B Activation and TNF- α Gene Transcription Induced by Hypoxia and

- Endotoxin. *J Immunol*, 165(2), 1013–1021. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.165.2.1013>
- Corrigall, V. M., Bodman-Smith, M. D., Fife, M. S., Canas, B., Myers, L. K., Wooley, P. H., Soh, C., Staines, N. A., Pappin, D. J. C., Berlo, S. E., Van Eden, W., Van Der Zee, R., Lanchbury, J. S., & Panayi, G. S. (2001). The Human Endoplasmic Reticulum Molecular Chaperone BiP Is an Autoantigen for Rheumatoid Arthritis and Prevents the Induction of Experimental Arthritis 1. *J Immunol*, 166, 1492–1498. <http://journals.aai.org/jimmunol/article-pdf/166/3/1492/1139939/1492.pdf>
- Cracowski, J. L., Chabot, F., Labarère, J., Faure, P., Degano, B., Schwebel, C., Chaouat, A., Reynaud-Gaubert, M., Cracowski, C., Sitbon, O., Yaici, A., Simonneau, G., & Humbert, M. (2014). Proinflammatory cytokine levels are linked to death in pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J*, 43(3), 915–917. <https://doi.org/10.1183/09031936.00151313>
- Delpino, A., & Castelli, M. (2002). The 78 kDa glucose-regulated protein (GRP78/BIP) is expressed on the cell membrane, is released into cell culture medium and is also present in human peripheral circulation. *Biosci Rep*, 22. <https://doi.org/10.1023/A:1020966008615>
- Doan, N. T. Q., Paulsen, E. S., Sehgal, P., Møller, J. V., Nissen, P., Denmeade, S. R., Isaacs, J. T., Dionne, C. A., & Christensen SB. (2015). Targeting thapsigargin towards tumors. *Steroids*, 97, 2–7. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2014.07.009>. Targeting
- Dromparis, P., Paulin, R., Stenson, T. H., Haromy, A., Sutendra, G., & Michelakis, E. D. (2013). Attenuating endoplasmic reticulum stress as a novel therapeutic strategy in pulmonary hypertension. *Circulation*, 127(1), 115–125. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.112.133413>
- Furmanik, M., Van Gorp, R., Whitehead, M., Ahmad, S., Bordoloi, J., Kapustin, A., Schurgers, L. J., & Shanahan, C. M. (2021). Endoplasmic Reticulum Stress Mediates Vascular Smooth Muscle Cell Calcification via Increased Release of Grp78 (Glucose-Regulated Protein, 78 kDa)-Loaded Extracellular Vesicles. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 41(2), 898–914. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.120.315506>

- Girona, J., Rodríguez-Borjabad, C., Ibarretxe, D., Vallvé, J. C., Ferré, R., Heras, M., Rodríguez-Calvo, R., Guaita-Esteruelas, S., Martínez-Micaelo, N., Plana, N., & Masana, L. (2019). The circulating GRP78/BIP is a marker of metabolic diseases and atherosclerosis: Bringing endoplasmic reticulum stress into the clinical scenario. *J Clin Med*, 8(11). <https://doi.org/10.3390/jcm8111793>
- Hetz, C., Zhang, K., & Kaufman, R. J. (2020). Mechanisms, regulation and functions of the unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 21(8), 421–438. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-0250-z>
- Hosokawa, S., Haraguchi, G., Sasaki, A., Arai, H., Muto, S., Itai, A., Doi, S., Mizutani, S., & Isobe, M. (2013). Pathophysiological roles of nuclear factor kappaB (NF-κB) in pulmonary arterial hypertension: Effects of synthetic selective NF-κB inhibitor IMD-0354. *Cardiovasc Res*, 99(1), 35–43. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvt105>
- Hu, Y., Chi, L., Kuebler, W. M., & Goldenberg, N. M. (2020). Perivascular Inflammation in Pulmonary Arterial Hypertension. *Cells*, 9(11), 1–25. <https://doi.org/10.3390/cells9112338>
- Huertas, A., Tu, L., Humbert, M., & Guignabert, C. (2020). Chronic inflammation within the vascular wall in pulmonary arterial hypertension: More than a spectator. *Cardiovasc Res*, 116(5), 885–893. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvz308>
- Humbert, M., Kovacs, G., Hoeper, M. M., Badagliacca, R., Berger, R. M. F., Brida, M., Carlsen, J., Coats, A. J. S., Escribano-Subias, P., Ferrari, P., Ferreira, D. S., Ghofrani, H. A., Giannakoulas, G., Kiely, D. G., Mayer, E., Meszaros, G., Nagavci, B., Olsson, K. M., Pepke-Zaba, J., ... Sivakumaran, K. (2022). 2022 ESC/ERS Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension. *Eur Heart J*, 43(38), 3618–3731. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehac237>
- Ibrahim, I. M., Abdelmalek, D. H., & Elfiky, A. A. (2019). GRP78: A cell's response to stress. *Life Sci*, 226, 156–163. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.04.022>
- Invitrogen. (2019). *alamarBlue™ Cell Viability Reagent*. 1–2. [papers2://publication/uuid/EAA1BF6A-EDBC-4225-BBFB-D86697D87A30](https://pubs2://publication/uuid/EAA1BF6A-EDBC-4225-BBFB-D86697D87A30)
- Kirkham, B., Chaabo, K., Hall, C., Garrood, T., Mant, T., Allen, E., Vincent, A., Vasconcelos, J. C., Prevost, A. T., Panayi, G. S., & Corrigan, V. M. (2016). Safety and patient

- response as indicated by biomarker changes to binding immunoglobulin protein in the phase I/IIA RAGULA clinical trial in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*, 55(11), 1993–2000. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/kew287>
- Koyama, M., Furuhashi, M., Ishimura, S., Mita, T., Fuseya, T., Okazaki, Y., Yoshida, H., Tsuchihashi, K., & Miura, T. (2014). Reduction of endoplasmic reticulum stress by 4-phenylbutyric acid prevents the development of hypoxia-induced pulmonary arterial hypertension. *J Physiol Heart Circ Physiol*, 306, 1314–1323. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00869.2013.-Pulmonary>
- Lan, N., Massam, B., Kulkarni, S., & Lang, C. (2018). Pulmonary Arterial Hypertension: Pathophysiology and Treatment. *Diseases*, 6(2), 38. <https://doi.org/10.3390/diseases6020038>
- Lee, A. S. (2005). The ER chaperone and signaling regulator GRP78/BiP as a monitor of endoplasmic reticulum stress. *Methods*, 35(4), 373–381. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2004.10.010>
- Lee, A. S. (2014). Glucose-regulated proteins in cancer: Molecular mechanisms and therapeutic potential. *Nat Rev Cancer*, 14(4), 263–276. <https://doi.org/10.1038/nrc3701>
- Malhotra, J. D., & Kaufman, R. J. (2007). The endoplasmic reticulum and the unfolded protein response. *Semin Cell Dev Biol*, 18(6), 716–731. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2007.09.003>
- Oparka, M., Walczak, J., Malinska, D., van Oppen, L. M. P. E., Szczepanowska, J., Koopman, W. J. H., & Wieckowski, M. R. (2016). Quantifying ROS levels using CM-H2DCFDA and HyPer. *Methods*, 109, 3–11. Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2016.06.008>
- Pan, T., Zhang, L., Miao, K., & Wang, Y. (2020). A crucial role of endoplasmic reticulum stress in cellular responses during pulmonary arterial hypertension. *Am J Transl Res*, 12(5), 1481–1490. www.ajtr.org
- Perros, F., Montani, D., Dorfmüller, P., Durand-Gasselín, I., Tcherakian, C., Le Pavec, J., Mazmanian, M., Fadel, E., Mussot, S., Mercier, O., Hervé, P., Emilié, D., Eddahibi, S., Simonneau, G., Souza, R., & Humbert, M. (2008). Platelet-derived growth factor

expression and function in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*, 178(1), 81–88. <https://doi.org/10.1164/rccm.200707-1037OC>

Price, L. C., Caramori, G., Perros, F., Meng, C., Gambaryan, N., Dorfmueller, P., Montani, D., Casolari, P., Zhu, J., Dimopoulos, K., Shao, D., Girerd, B., Mumby, S., Proudfoot, A., Griffiths, M., Papi, A., Humbert, M., Adcock, I. M., & Wort, S. J. (2013). Nuclear Factor κ -B Is Activated in the Pulmonary Vessels of Patients with End-Stage Idiopathic Pulmonary Arterial Hypertension. *PLoS One*, 8(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075415>

Quinones, Q. J., de Ridder, G. G., & Pizzo, S. V. (2008). GRP78: A chaperone with diverse roles beyond the endoplasmic reticulum. *Histol Histopathol*, 23(11), 1409–1416. <https://doi.org/10.14670/HH-23.1409>

Rieg, A. D., Bunting, N. A., Cranen, C., Suleiman, S., Spillner, J. W., Schnöring, H., Schröder, T., Von Stillfried, S., Braunschweig, T., Manley, P. W., Schälte, G., Rossaint, R., Uhlig, S., & Martin, C. (2019). Tyrosine kinase inhibitors relax pulmonary arteries in human and murine precision-cut lung slices. *Respir Res*, 20(1). <https://doi.org/10.1186/s12931-019-1074-2>

Schmitz, M. L., Shaban, M. S., Albert, B. V., Gökçen, A., & Kracht, M. (2018). The cross-talk of Endoplasmic Reticulum (ER) stress pathways with NF- κ B: Complex mechanisms relevant for cancer, inflammation and infection. *Biomedicines*, 6(2), 1–18. <https://doi.org/10.3390/biomedicines6020058>

Schwarz, D. S., & Blower, M. D. (2016). The endoplasmic reticulum: Structure, function and response to cellular signaling. *Cell Mol Life Sci*, 73(1), 79–94. <https://doi.org/10.1007/s00018-015-2052-6>

Shen, J., Chen, X., Hendershot, L., & Ron, P. (2002). ER Stress Regulation of ATF6 Localization by Dissociation of BiP/GRP78 Binding and Unmasking of Golgi Localization Signals. *Dev Cell*, 3(1), 99–111. [https://doi.org/10.1016/s1534-5807\(02\)00203-4](https://doi.org/10.1016/s1534-5807(02)00203-4)

Simpson, C. E., Chen, J. Y., Damico, R. L., Hassoun, P. M., Martin, L. J., Yang, J., Nies, M., Griffiths, M., Dhananjay Vaidya, R., Brandal, S., Pauciulo, M. W., Lutz, K. A., Coleman, A. W., Austin, E. D., Ivy, D. D., Nichols, W. C., & Everett, A. D. (2020).

Cellular sources of IL-6 and associations with clinical phenotypes and outcomes in PAH. *Eur Respir J*, 55(4). <https://doi.org/10.1183/13993003.01761-2019>

Siques, P., Pena, E., Brito, J., Alam, S. El, & Sena, C. M. (2021). Oxidative Stress , Kinase Activation , and Inflammatory Pathways Involved in Effects on Smooth Muscle Cells During Pulmonary Artery Hypertension Under Hypobaric Hypoxia Exposure. *Front Physiol*, 12(August), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.690341>

Soon, E., Holmes, A. M., Treacy, C. M., Doughty, N. J., Southgate, L., MacHado, R. D., Trembath, R. C., Jennings, S., Barker, L., Nicklin, P., Walker, C., Budd, D. C., Pepke-Zaba, J., & Morrell, N. W. (2010). Elevated levels of inflammatory cytokines predict survival in idiopathic and familial pulmonary arterial hypertension. *Circulation*, 122(9), 920–927. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.109.933762>

Tamura, Y., Phan, C., Tu, L., Le Hiress, M., Thuillet, R., Jutant, E. M., Fadel, E., Savale, L., Huertas, A., Humbert, M., & Guignabert, C. (2018). Ectopic upregulation of membrane-bound IL6R drives vascular remodeling in pulmonary arterial hypertension. *J Clin Invest*, 128(5), 1956–1970. <https://doi.org/10.1172/JCI96462>

Thenappan, T., Ormiston, M. L., Ryan, J. J., & Archer, S. L. (2018). Pulmonary arterial hypertension: Pathogenesis and clinical management. *BMJ*, 360, 2015–2018. <https://doi.org/10.1136/bmj.j5492>

Wu, J., Pan, W., Wang, C., Dong, H., Xing, L., Hou, J., Fang, S., Li, H., Yang, F., & Yu, B. (2019). H₂S attenuates endoplasmic reticulum stress in hypoxia-induced pulmonary artery hypertension. *Biosci Rep*, 39(7). <https://doi.org/10.1042/BSR20190304>

Xiao, Y., Chen, P. P., Zhou, R. L., Zhang, Y., Tian, Z., & Zhang, S. Y. (2020). Pathological mechanisms and potential therapeutic targets of pulmonary arterial hypertension: A review. *Aging Dis*, 11(6), 1623–1629. <https://doi.org/10.14336/AD.2020.0111>

Xu, D., Hu, Y. H., Gou, X., Li, F. Y., Yang, X. Y. C., Li, Y. M., & Chen, F. (2022). Oxidative Stress and Antioxidative Therapy in Pulmonary Arterial Hypertension. *Molecules*, 27(12). <https://doi.org/10.3390/molecules27123724>

Zaiss, M. M., Hall, C., McGowan, N. W. A., Babb, R., Devlia, V., Lucas, S., Meghji, S., Henderson, B., Bozec, A., Schett, G., David, J. P., Panayi, G. S., Grigoriadis, A. E., & Corrigan, V. M. (2019). Binding Immunoglobulin Protein (BIP) Inhibits TNF- α -

Induced Osteoclast Differentiation and Systemic Bone Loss in an Erosive Arthritis Model. *ACR Open Rheumatol*, 1(6), 382–393. <https://doi.org/10.1002/acr2.11060>

Zhang, Z., Zhang, L., Zhou, L., Lei, Y., Zhang, Y., & Huang, C. (2019). Redox signaling and unfolded protein response coordinate cell fate decisions under ER stress. *Redox Biol*, 25, 101047. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2018.11.005>

Zhang, Z., Zhao, L., Zhou, X., Meng, X., & Zhou, X. (2023). Role of inflammation, immunity, and oxidative stress in hypertension: New insights and potential therapeutic targets. In *Front Immunol*, 13. Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1098725>

Zhuan, B., Wang, X., Wang, M. D., Li, Z. C., Yuan, Q., Xie, J., & Yang, Z. (2020). Hypoxia induces pulmonary artery smooth muscle dysfunction through mitochondrial fragmentation-mediated endoplasmic reticulum stress. *Aging (Albany NY)*, 12(23), 23684–23697. <https://doi.org/10.18632/aging.103892>

9. Danksagung

Ich möchte allen danken, die mich bei der Entstehung dieser Promotion unterstützt haben.

An erster Stelle gilt mein Dank Professor Skowasch für die Bereitstellung dieses interessanten Themas, das mir den Zugang zur Forschung eröffnet hat, wie auch für die wissenschaftliche und persönliche Unterstützung.

Bei Dr. Adem Aksoy bedanke ich mich herzlich für seine großartige wissenschaftliche und persönliche Betreuung, der für jede meiner Fragen ein offenes Ohr hatte.

Ganz besonders bedanke ich mich bei Munti für die gute und geduldige Einarbeitung im Labor und die Unterstützung ab dem ersten Tag bis zum Abschluss dieser Arbeit. Auf deine Hilfe konnte ich stets setzen, dankeschön!

Danke auch an Elena, für die vielen gemeinsamen Stunden, die wir im Labor zusammen geschwitzt und gelacht haben.

Vielen Dank an Dr. Stella Frede aus der Anästhesie des UKB für die Bereitstellung der Hypoxiekammer. Weiterhin danke ich der DGIM, die mich mit Promotionsstipendium unterstützt haben. Das Freisemester, das dadurch möglich wurde, hat mich entscheidend vorangebracht.

Besonders danke ich meiner Familie und meinen Freunden für eure bedingungslose Unterstützung und euer Vertrauen – ein Rückhalt, auf den ich mich immer verlassen kann.

Teile der Dissertation wurden in folgender Publikation veröffentlicht:

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*, 27(5), 561–572. <https://doi.org/10.1007/s12192-022-01292-y>