

Aus der Klinik für Innere Medizin, Schwerpunkt Pneumologie

Direktor: Prof. Dr. C. Vogelmeier

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

in Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Gießen und
Marburg GmbH,
Standort Marburg

Die Aktivität antimikrobieller Peptide wird durch
die Interaktion mit Mukus der Atemwege
moduliert

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Humanmedizin
dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Kerstin Felgentreff
aus Wiesbaden

Marburg, 2008

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-
Universität Marburg am: 29.05.2008

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. M. Rothmund

Referent: Prof. Dr. Dr. R. Bals

1. Koreferent: Prof. Dr. R. Jacob

Inhalt

1. Einleitung	7
1.1 Mechanismen der Immunabwehr des Respirationstrakts	7
1.2 Antimikrobielle Peptide (AMPs)	9
1.2.1 Familien antimikrobieller Peptide	10
1.2.1.1 Die Familie der Defensine	10
1.2.1.2 Die Familie der Cathelizidine	11
1.2.1.3 Weitere antimikrobielle Peptide	12
1.2.2 Funktionen antimikrobieller Peptide	13
1.2.3 Physikalische Eigenschaften antimikrobieller Peptide	15
1.2.4 Die Rolle der antimikrobiellen Peptide bei Erkrankungen der Atemwege	16
1.3 Muzine	18
1.3.1 Einteilung der Muzine	18
1.3.2 Struktur und Eigenschaften von Muzinen	21
1.3.3 Die Rolle der Muzine bei der Immunabwehr der Atemwege	21
1.3.4 Die Rolle der Muzine bei Erkrankungen des Respirationstrakts	23
1.4 Die Immunabwehr der Atemwege bei der Zystischen Fibrose	24
1.5 Die chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD) basierend auf einem α_1-Antitrypsinmangel	25
2. Fragestellung	27

3. Material und Methoden	28
3.1 Herstellung der Proteine	28
3.1.1 Synthese und Aufbereitung von LL-37	28
3.1.2 Aufbereitung von kommerziellem Muzin	28
3.2 Analysen von humanen Sekreten der Atemwege	29
3.2.1 Allgemeines zur Herkunft der verwendeten humanen Proben	29
3.2.2 Bronchoalveoläre Lavage Flüssigkeit (BALF) von Patienten mit α_1 -Antitrypsinmangel	29
3.2.3 Bronchoalveoläre Lavage Flüssigkeit (BALF) von Asthmatikern	30
3.2.4 Bronchoalveoläre Lavage Flüssigkeit (BALF) von Probanden ohne akute Infektion der Atemwege	31
3.2.5 Sputumproben von Patienten mit Zystischer Fibrose	31
3.3 LL-37 und hBD-2 Enzym-linked Immunosorbent Assays (ELISA)	32
3.3.1 Quantitative Bestimmung von LL-37	32
3.3.2 Quantitative Bestimmung von hBD-2	33
3.4 Enzyme-linked Lektinsorbent Assay (ELLA)	34
3.4.1 ELLA zur quantitativen Bestimmung von Muzin	34
3.4.2 Nachweis der elektrostatischen Interaktion von LL-37 und Muzin	34
3.5 Gelelektrophorese und Western Blot	35
3.5.1 SDS- Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	35
3.5.2 Native- Polyacrylamidgelelektrophorese (Native-PAGE)	36
3.5.3 Western Blot	37
3.6 Antimikrobielle Assays	38
3.6.1 Kultivierung und Aufbereitung der Bakterien	38
3.6.2 Assay mit Variation der Muzin-Konzentration	39
3.6.3 Assay mit Variation der LL-37-Konzentration	40

3.7	Zirkulardichroismus Spektroskopie	41
3.7.1	Allgemeines zur Methode	41
3.7.2	Durchführung der Messungen	42
3.7.3	Auswertung der Messergebnisse	42
3.8	Statistische Auswertungen	43
4.	Ergebnisse	45
4.1	LL-37 und hBD-2 kommen in humanen Sekreten der Atemwege vor	45
4.1.1	LL-37 und hBD-2 in bronchoalveolärer Lavage Flüssigkeit (BALF) von Patienten mit chronisch obstruktiver Lungenerkrankung basierend auf einem α_1 -Antitrypsinmangel	45
4.1.2	LL-37 und hBD-2 in bronchoalveolärer Lavage Flüssigkeit (BALF) von Asthmatikern nach Allergen- und LPS-Exposition	46
4.2	LL-37 und Muzin interagieren elektrostatisch	48
4.2.1	Muzin bindet an auf eine Festphase aufgebracht LL-37	48
4.2.2	Die elektrostatische Interaktion von Muzin und LL-37 hat Einfluss auf das Verhalten in der Gelelektrophorese	51
4.3	Die Interaktion von LL-37 und Muzin hemmt die antimikrobielle Aktivität des AMP	53
4.4	Muzin beeinflusst die Konformation von LL-37	58
4.5	Das humane Cathelizidin LL-37/hCAP-18 akkumuliert im Mukus der Atemwege	61
4.5.1	LL-37/hCAP-18 und Muzin interagieren elektrostatisch in humaner bronchoalveolärer Lavage Flüssigkeit (BALF)	61
4.5.2	LL-37/hCAP-18 und Muzin in Sputumproben von Patienten mit Zystischer Fibrose	64

5. Diskussion	66
Die antimikrobiellen Peptide LL-37 und hBD-2 werden bei akuter Entzündung in die Sekrete der Atemwege abgegeben	66
LL-37 und Muzin interagieren elektrostatisch	69
Muzin induziert eine α -Helix in LL-37	71
Die elektrostatische Interaktion zwischen Muzin und LL-37 hat Einfluss auf dessen antimikrobielle Aktivität	72
Die Interaktion von LL-37 und Muzin hat klinische Relevanz für die lokale Immunabwehr der Atemwege	74
Ausblick	77
6. Zusammenfassung	79
7. Literaturverzeichnis	81
8. Anhang	97
8.1 Abkürzungsverzeichnis	97
8.2 Publikationen und Präsentationen	98
8.3 Akademische Lehrer	98
8.4 Danksagung	99
8.5 Ehrenwörtliche Erklärung	99

1. Einleitung

1.1 Mechanismen der Immunabwehr des Respirationstrakts

Der Respirationstrakt steht aufgrund seiner physiologischen Funktion in engem Kontakt mit seiner Umwelt. Über die Atemluft gelangen die verschiedensten Fremdkörper an die innere Oberfläche des Organs und machen eine permanente Interaktion mit potentiellen Pathogenen unumgänglich.

Neben allgemeinen Schutzfunktionen, wie dem Husten- und Niesreflex oder der Filterung der Atemluft in den Verzweigungen des Bronchialbaums, spielen zahlreiche zelluläre und molekulare Mediatoren des angeborenen und erworbenen Immunsystems eine wichtige Rolle bei der Abwehr.

Zum adaptiven Immunsystem zählen zelluläre Elemente, im wesentlichen B- und T-Lymphozyten. Dieser Zweig der Immunabwehr ist gekennzeichnet durch eine spezifische Reaktion auf einen wiederholten Kontakt mit einem spezifischen Antigen. Bei Exposition zu diesem Antigen findet eine klonale Expansion differenzierter Zellen statt.

Das evolutionsbiologisch ältere, angeborene Immunsystem wirkt hingegen mit unspezifischen Mechanismen auf eingedrungene Organismen und Fremdkörper ein. Im Gegensatz zu der adaptiven Abwehr sind die Effektoren der unspezifischen Abwehr permanent vorhanden und die beteiligten Zellen haben keine Gedächtnisfunktion. Dennoch können auch sie durch Infektion und Entzündung induziert werden und weisen zahlreiche Verbindungen mit der erworbenen Immunart auf [17].

Auf zellulärer Ebene sind vor allem Phagozyten wie die Alveolarmakrophagen der Lunge tätig, die Mikroorganismen und Fremdkörper phagozytieren und intrazellulär abtöten. Daneben gibt es weitere Effektorzellen wie Dendritische Zellen, neutrophile Granulozyten, Plasmazellen, Mastzellen, Fibroblasten und natürliche Killerzellen in der Submukosa der Atemwege [112].

Der gesamte Respirationstrakt ist von Epithelzellen ausgekleidet: Hochprismatisches Flimmerepithel, Clara Zellen, seröse und muköse Drüsenzellen, Becherzellen, neuroepitheliale Zellen sowie Typ I und II

Pneumozyten, die alle ebenfalls bedeutende immunologische Funktionen übernehmen [141]. Sie stellen nicht nur eine physikalische Barriere dar, sondern produzieren viele im Rahmen der angeborenen Abwehr aktive Substanzen [117]. Über bestimmte Transmembranrezeptoren, wie die Familie der Toll-like-Rezeptoren, können Epithelzellen molekulare Strukturen diverser Pathogene erkennen und über eine Signalkaskade eine Aktivierung der Agenten des unspezifischen wie auch des spezifischen Immunsystems induzieren [7;17].

Desweiteren sind zilienträgende Epithelzellen ein wesentlicher Bestandteil des mukoziliären Apparates. In den von mukösen Drüsen und Becherzellen produzierten viskösen Sekreten werden Partikel aus der Atemluft gebunden und in Richtung Oropharynx transportiert. Diese mechanischen Vorgänge wirken synergistisch mit antimikrobiellen Substanzen.

Die innere Oberfläche der Atemwege ist mit einer Flüssigkeit aus Plasma-Transudat und den Sekreten sämtlicher Zellen des Respirationstrakts beschichtet. A. Fleming beschrieb schon 1922 die antimikrobiellen Eigenschaften dieser Flüssigkeit bei der Entdeckung des Lysozyms [40]. In zahlreichen folgenden Studien sind darin Hunderte von Proteinen und Peptiden nachgewiesen worden, die ebenfalls dazu beitragen. Ihre antimikrobielle Aktivität erstreckt sich über ein breites Spektrum von Bakterien, Pilzen und Viren. Die Proteine Lysozym, Laktoferrin und sekretorischer Leukozyten Proteinase Inhibitor (SLPI) sind in hohen Konzentrationen in diesen Atemwegssekreten zu finden [27;105].

Lysozym entfaltet seine antimikrobielle Wirkung über die enzymatische Spaltung glykosidischer Bindungen der Peptidoglykane an Bakterienzellmembranen Gram-positiver Bakterien, zeigt jedoch auch Wirkung gegenüber Gram-negativen Organismen [17;105].

Laktoferrin wirkt zum einen über die Bindung von freiem Eisen und zum anderen durch Destabilisierung von Bakterienmembranen antimikrobiell [105]. SLPI ist ein kationischer Inhibitor der Leukozyten Elastase mit starken antimikrobiellen und anti-entzündlichen Eigenschaften [59;105].

Darüber hinaus sind Phospholipase A2, „bacterial permeability increasing protein“ (BPI), antimikrobielle Peptide (AMPs) (s.u.) und die von Typ II Pneumozyten und Clara Zellen produzierten Surfactant-Proteine A und D (SP-A, SP-D) in den Flüssigkeiten der Atemwege enthalten [105].

Wie viele andere Schleimhäute sezernieren auch die Atemwegsepithelien sekretorisches IgA, welches spezifisch mit Pathogenen interagiert [102;117].

Darüber hinaus ist das Komplementsystem ein ubiquitärer Bestandteil des angeborenen Immunsystems.

Im Fokus dieser Arbeit liegt die Rolle der AMPs und der Muzine, dem makromolekularen Hauptbestandteil des Mukus, bei der lokalen Abwehr der Atemwege.

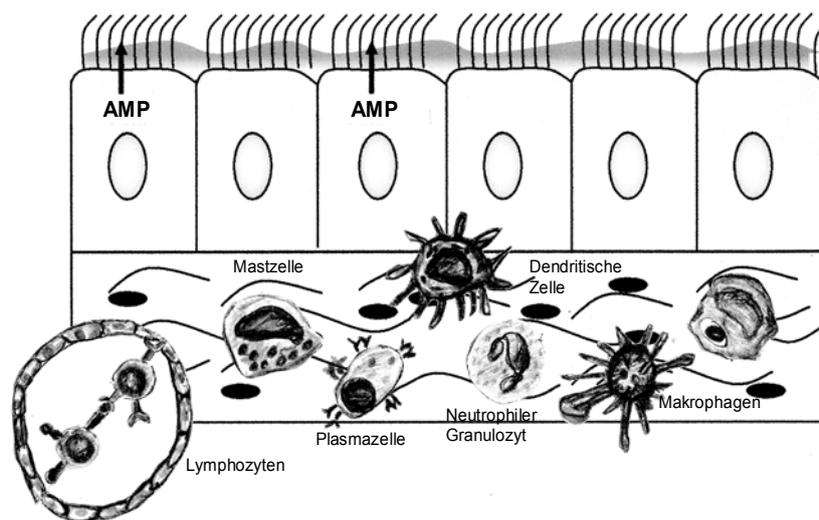


Abb. 1: Die Immunabwehr des Respirationstrakts.

Neben mechanischen Faktoren wie den Schutzreflexen und der Filterfunktion der Atemwege spielen die Epithelzellen sowie eingewanderte Zellen aus dem Blut eine wichtige Rolle bei der Immunabwehr. Die Epithelzellen stellen eine mechanische Barriere dar, tragen durch ihren Zilienschlag zum mukoziliären Transport bei und haben zudem sekretorische Funktion. Unter anderem werden auch AMPs in die Atemwegsflüssigkeiten sezerniert.

Die eingewanderten Zellen des Immunsystems begegnen Infektionen mit Phagozytose, Produktion von Zytokinen und Immunglobulinen sowie ebenfalls mit der Sekretion antimikrobieller Substanzen.

1.2 Antimikrobielle Peptide (AMPs)

AMPs sind niedermolekulare kationische Oligo- oder Polypeptide, die eine antimikrobielle Aktivität gegen ein breites Spektrum von pathogenen Mikroorganismen aufweisen.

1.2.1 Familien antimikrobieller Peptide

Im menschlichen Organismus liegen im wesentlichen zwei Familien der AMPs in der Lunge vor, die Defensine und die Cathelizidine [12;119].

Die Familien unterscheiden sich in ihrer Aminosäuren-Sequenz, in ihrer molekularen Masse und vor allem in ihrer dreidimensionalen Struktur.

Gemeinsam ist ihnen die Synthese als Propeptid. Nach der Abspaltung der N-terminalen Prosequenz weist das C-terminale kationische Peptid die antimikrobielle Eigenschaft auf. Die AMPs werden in ihren Herkunftszellen als Propeptide oder als aktive Peptide gespeichert.

1.2.1.1 Die Familie der Defensine

Defensine sind kleine, Arginin-reiche, kationische Peptide mit einem Molekulargewicht von 3500-6000 Da. Sie weisen eine dreisträngige β -Faltblattstruktur mit einer β -Haarschleife und kationischen Resten auf. In ihrer Primärsequenz sind sechs Zysteine enthalten, die an der Ausbildung von drei Disulfidbrücken beteiligt sind [31;115]. Die Lokalisation von Zystein innerhalb der Aminosäuresequenz und damit der Abstand der Disulfidbrücken voneinander, variiert innerhalb der Defensine. Dieser Unterschied wurde zum Anlass genommen, die AMP-Familie in drei Gruppen zu unterteilen, die α -, β -, und θ -Defensine.

Beim Menschen wurden vier α -Defensine in azurophilen Granula von neutrophilen Granulozyten gefunden [31;81] und daher als „human neutrophil peptides“ (HNP 1-4) bezeichnet, die nach der Phagozytose von Mikroorganismen mit dem Phagolysosom verschmelzen. Sie entfalten darin ihre antimikrobielle Wirkung über einen von Sauerstoff unabhängigen Mechanismus [81]. HNP-1-3 finden sich außerdem in B- und T-Lymphozyten sowie natürlichen Killerzellen und Monozyten [2]. Daneben wurden noch zwei weitere humane α -Defensine (HD 5 und 6) gefunden, die in zytoplasmatischen Granula der Panethschen Körnerzellen der Dünndarmmukosa exprimiert werden [68;69].

Die β -Defensine sind etwas größer als die α -Defensine und unterscheiden sich von diesen sehr in ihrer Primär-, aber nur geringfügig in ihrer Sekundärstruktur. Dabei differiert die Lokalisation der drei Disulfidbrücken. 1991 wurde ein antimikrobielles Peptid aus der Trachea

von Kühen (TAP: Tracheales antimikrobielles Peptid) isoliert, was sich diesbezüglich von den α -Defensinen unterschied und daher den β -Defensinen zugeordnet wurde [33]. Peptide dieser Familie wurden seither in vielen Spezies gefunden. Das zuerst beschriebene humane β -Defensin (hBD-1) wurde im Plasma entdeckt [16]. Das zweite Mitglied der Familie, hBD-2, in von Psoriasis betroffenen Hautläsionen [50]. Kurz darauf wurde die Expression von hBD-2 im Respirationstrakt, insbesondere in der Lunge, beschrieben [11]. Beide β -Defensine wurden in Atemwegssekreten in Konzentrationen im Bereich von ng/ml - μ g/ml nachgewiesen [119]. Mittlerweile sind die β -Defensine in vielen weiteren Organen, einschließlich des Urogenital- und Gastrointestinaltrakts, gefunden worden [11;96;138]. Während hBD-1 konstitutiv von Epithelien sezerniert wird, wird die Expression von hBD-2 durch mikrobielle Strukturen und zahlreiche Zytokine induziert [14;70;96;119]. Allerdings wurde kürzlich auch eine Induktion von hBD-1 durch vereinzelte Mediatoren beschrieben [122].

Ein weiteres β -Defensin, hBD-3, wurde in Keratinozyten psoriatischer Hautläsionen entdeckt [51]. hBD-3 hat gegenüber den anderen β -Defensinen mehr kationische Reste und eine stärkere antimikrobielle Aktivität gegen Gram-positive Bakterien. Seine Expression wird ebenfalls von Entzündungsmediatoren getriggert [51;122].

Alle Gene dieser drei β -Defensine liegen zusammenhängend auf Chromosom 8p23. Inzwischen sind noch drei weitere Gene dieser Familie (hBD-4 - 6) dort gefunden worden [44;147]. Auf der Basis von genomischen Datenbanken wurden noch 28 weitere Gene für humane β -Defensine identifiziert [113], deren Peptide bisher allerdings noch nicht charakterisiert wurden.

Die θ -Defensine, benannt nach ihrer zirkulären molekularen Struktur, sind bisher nur in Leukozyten von Rhesus-Affen beschrieben worden [130].

1.2.1.2 Die Familie der Cathelizidine

Die Cathelizidine sind in Säugetieren weit verbreitet. Es handelt sich um Propeptide mit einer N-terminalen Domäne mit dem Namen Cathelin und einer antimikrobiell aktiven C-terminalen Domäne [154]. Die

antimikrobielle Aktivität des 12-80 Aminosäuren langen Segments richtet sich gegen ein breites Spektrum pathogener Mikroorganismen von Bakterien, Pilzen, Viren bis hin zu Protozoen.

Im Menschen wurde bisher nur ein Cathelizidin nachgewiesen, das antimikrobielle Peptid LL-37 (4493 Da), benannt nach seiner Sequenz von 37 Aminosäuren und zwei Leucin zu Beginn. Sein Propeptid ist das „human cationic antimicrobial peptide 18“ (hCAP-18). LL-37/hCAP-18 wurde im Knochenmark entdeckt [4], doch seine Expression ist inzwischen in Neutrophilen, Monozyten, natürlichen Killerzellen, T- und B-Lymphozyten [2] und Epithelzellen diverser Organe des Gastrointestinal- [53;54] und Respirationstrakts [12] sowie im Hoden [4] und in der Haut [41] beschrieben. Das Propeptid hCAP-18 wird in spezifischen Vesikeln der Zellen gespeichert und während der Sekretion das aktive LL-37 durch Proteinase 3 davon abgespalten [121]. Im Gegensatz zu den oben vorgestellten Defensinen ist LL-37 ein lineares, α -helikales Peptid ohne Disulfidbrücken in seiner Sekundärstruktur. Wie die Defensine interagieren auch die Cathelizidine mit Lipidmembranen von Mikroorganismen [99]. Bei Entzündung oder Infektion wird das AMP LL-37 vermehrt exprimiert und an die Umgebung abgegeben [53;54;72;109]. Weitere Funktionen und Eigenschaften von LL-37 werden in den folgenden Abschnitten näher beleuchtet.

1.2.1.3 Weitere antimikrobielle Peptide

Neben den Defensinen und den Cathelizidinen sind noch weitere humane antimikrobielle Peptide bekannt.

Histatine werden kleine (3000-4000 Da), kationische, Histidin-reiche Peptide genannt, die konstitutiv von allen drei Speicheldrüsen sezerniert werden [5]. Sie haben im Speichel antibakterielle und vor allem antimykotische Aktivität und leisten einen wichtigen Beitrag zur Immunabwehr in der Mundhöhle.

Das AMP Granulysin wird von T-Lymphozyten und natürlichen Killerzellen produziert [38] und wirkt ebenfalls antimikrobiell auf ein breites Spektrum pathogener Mikroorganismen. Trotz der ähnlichen Wirkung unterscheidet sich Granulysin mit seinen vier α -helikalen Domänen strukturell von den anderen AMPs.

Bei der Immunabwehr der Haut spielen die antimikrobiellen Peptide Psoriasin und Dermicidin eine Rolle [110;111].

Das von Hepatozyten produzierte AMP Hepzidin ist ein regulierendes Hormon des Eisenstoffwechsels, das durch inflammatorische Stimuli induziert wird und die intestinale Resorption von Eisen inhibiert [43].

Darüber hinaus sind diverse AMP-Spaltprodukte mit antimikrobieller Aktivität beschrieben worden und es werden laufend neue antimikrobielle Peptide entdeckt.

1.2.2 Funktionen antimikrobieller Peptide

Die wesentliche Funktion der AMPs ist ihre antimikrobielle Aktivität gegen eine Vielzahl von Gram-negativen und Gram-positiven Bakterien sowie Pilzen und einigen Viren. Das antimikrobielle Spektrum wurde in zahlreichen *in vitro* Tests ermittelt. Die erforderlichen Konzentrationen der AMPs liegen dafür im mikromolekularen Bereich.

Die kationischen Peptide binden elektrostatisch an die anionischen glykosylierten Oberflächen der Mikroben und entfalten ihre antimikrobielle Wirkung über die Interaktion mit deren Biomembranen. Dadurch kommt es zum Verlust der Membranintegrität und letztlich zur Lyse der Zelle.

Selektive AMPs unterscheiden zwischen eukaryoten und prokaryoten Biomembranen aufgrund deren Lipid-Komposition [155]. Eukaryote Membranen enthalten im Gegensatz zu prokaryoten Cholesterol und Phosphatidylcholin. Zudem ist ihre Außenfläche fast neutral und nicht wie die äußere Bakterienmembran stark negativ geladen, was die Voraussetzung für die Selektion darstellt [151;155].

Bezüglich des genauen Wirkmechanismus werden verschiedene Möglichkeiten beschrieben: (1) Die AMPs bilden in ringförmiger Anordnung eine transmembrane Pore, indem sie ihre apolaren Reste der hydrophoben Lipidmembran zuwenden und mit ihren polaren Resten einen hydrophilen Kanal formen (*barrel-stave mechanism*). Diese Pore kann aus einem Komplex mehrerer aggregierter Monomere bestehen. (2) Die Peptide nehmen im Rahmen der Interaktion mit den geladenen und hydrophoben Biomembranen eine α -helikale Struktur an, wobei die Helix zunächst parallel zur Membran ausgerichtet ist. Die hydrophoben Reste der gebundenen Peptide verdrängen die polaren Köpfe der

Phosphorlipide und verursachen einen Bruch in der hydrophoben Region der Lipiddoppelschicht, was die Membranoberfläche destabilisiert. Ab einem bestimmten Verhältnis von Peptid zu Lipid assoziieren die Peptide zu Clustern, orientieren sich senkrecht zur Membran und formen transiente Poren (*toroid pore mechanism*). Im Gegensatz zum ersten Mechanismus findet hierbei keine Interkalierung der Peptide mit den Lipiden statt. (3) Oder die antimikrobiellen Peptide schichten sich aufgrund von elektrostatischen Kräften „wie ein Teppich“ (*carpet mechanism*) über die Membran und wirken im Sinne von Detergenzien destabilisierend. Sie beeinträchtigen die Fluidität und Permeabilität und führen ab einem bestimmten Konzentrationsverhältnis von Peptid zu Lipid zur kompletten Auflösung der Membran in einzelne Mizellen [116;151]. Der vorherrschende Mechanismus, über welchen das antimikrobielle Peptid mit der Biomembran interferiert, ist dabei zum einen abhängig von den chemischen und physikalischen Eigenschaften des Peptids selbst und zum anderen von der Ladung und Zusammensetzung der Membran [116;151]. Es ist auch möglich, dass ein Peptid, abhängig von äußeren Faktoren, auf verschiedenen Wegen mit Biomembranen interagiert.

Bisher wurde immer der Verlust der Membranintegrität in der Konsequenz der Interaktion mit der Lipiddoppelschicht als Ursache für den Zelltod gesehen. Doch gibt es Hinweise, dass neben dieser Funktion dafür noch weitere Mechanismen der antimikrobiellen Peptide von Bedeutung sind [76].

Für die Defensine wird die Permeabilisierung der Lipidmembran durch eine aus sechs bis acht Dimeren gebildete Pore angenommen [144]. Während sich die hydrophoben Reste der Moleküle der apolaren Lipidmembran zuwenden, bilden die polaren Reste eine wasserdurchlässige Pore, was zum Verlust der Membranintegrität führt. Um die Pore bilden zu können, muss eine Mindestanzahl von Molekülen an die anionische Oberfläche gebunden haben. Bei Gram-negativen Bakterien, wie z.B. *Escherichia coli*, permeabilisieren sie die äußere und die innere Membran [80].

Das Cathelizidin LL-37 interagiert NMR-Analysen zu Folge mit dem hier als zweites beschriebenen Mechanismus, indem es als Cluster transiente Poren in Biomembranen bildet [56]. Allerdings ist es hierbei nicht besonders spezifisch was die Konstitution der Lipidmembran und damit

die Spezies betrifft. Es ist zytotoxisch auf ein breites Spektrum prokaryoter Zellen, interagiert in hohen Konzentrationen aber auch mit eukaryoten Membranen [99;116].

Die antimikrobielle Wirkung der Defensine und LL-37/hCAP-18 in der Lunge ist synergistisch mit altbekannten antimikrobiellen Proteinen wie Lysozym, Laktoferrin und SLPI [11;12;120].

Doch über diese Eigenschaft hinaus entfalten AMPs noch eine Vielzahl weiterer Funktionen. Sowohl die Cathelizidine wie die Defensine übernehmen eine wichtige Rolle als Mediatoren bei akuter Infektion oder Entzündung. Sie stimulieren die Zytokinexpression vieler Immunzellen und rekrutieren als chemotaktische Faktoren weitere Effektoren der spezifischen wie unspezifischen Abwehr [2;114;149;150]. Damit stellen sie eine Verbindung zwischen dem angeborenen und dem erworbenen Immunsystem her.

Beide Familien haben Auswirkungen auf die Zellproliferation der Epithelien und nehmen Einfluss auf Angiogenese und Wundheilung [1;75].

Das humane Cathelizidin LL-37 bindet und neutralisiert bakterielle Lipopolysaccharide (LPS) und entfaltet damit potentiell eine protektive Wirkung gegen den toxischen Schock im Rahmen schwerer Infektionen [46;108;114].

1.2.3 *Physikalische Eigenschaften antimikrobieller Peptide*

Die meisten antimikrobiellen Peptide sind aufgrund ihrer kationischen Reste stark positiv geladen. Das humane Cathelizidin LL-37 hat eine positive Ladung von 5,8 bei neutralem pH. Diese und weitere biochemische Eigenschaften der AMPs wie ihre Konformation, ihr amphipathischer Charakter und die Anzahl ihrer hydrophoben Reste sind ganz wesentlich für die Interaktion mit Biomembranen [151].

Im Gegensatz zu den über Disulfidbrücken stabilisierten Defensinen mit β -Faltblatt-Struktur liegt das humane Cathelizidin LL-37 in wässrigem Puffer ungeordnet vor und nimmt erst durch die elektrostatische Interaktion mit anionischen Oberflächen, z.B. Bakterienmembranen, seine aktive α -helikale Form an.

Von Johansson *et al.* konnte gezeigt werden, dass die Konzentration von LL-37, der pH und die Salzkonzentration der Lösung die Konformation

des Cathelizidins beeinflusst [67]. LL-37 hat die Tendenz sich bei höheren Konzentrationen in neutralem Puffer zu Oligomeren zusammen zu lagern, was die Ausbildung einer α -helikalen Formation begünstigt [67;99]. Ebenso ein hoher pH der Lösung und die Anwesenheit von Anionen induzieren eine α -Helix. Gleichzeitig korreliert der Anteil der α -Helizität mit der antimikrobiellen Aktivität des Peptids; die α -Helix ist seine aktive Form.

Auf der anderen Seite wird die Wirkung der AMPs in Überständen von Epithelzellen durch einen niedrigen pH (im Bereich von 3-5) sowie durch einen hohen Salzgehalt nachweislich inhibiert [11;67;93].

1.2.4 *Die Rolle der antimikrobiellen Peptide bei Erkrankungen der Atemwege*

In den Sekreten der Atemwege finden sich zahlreiche kationische antimikrobielle Oligo- und Polypeptide, die vor lokaler Besiedelung mit Pathogenen schützen. Sie werden konstitutiv oder abhängig von inflammatorischen Stimuli von Epithelzellen und Leukozyten abgegeben und lassen sich in den Atemwegsflüssigkeiten nachweisen [3;24;28;109]. Sie leisten dort einen entscheidenden Beitrag zur lokalen Immunabwehr des Respirationstrakts und spielen eine Rolle bei einer Vielzahl von entzündlichen Erkrankungen der Atemwege unterschiedlicher Genese [58].

Die Familien der Defensine und der Cathelizidine sind die wesentlichen antimikrobiellen Peptide in der Lunge. Ihre Induktion im Rahmen einer Infektion erfolgt über proinflammatorische Zytokine oder bakterielle Strukturkomponenten, wie z.B. LPS von Gram-negativen Bakterien [20;37;52].

An der Regulation der Expression von hBD-2 sind der Transkriptionsfaktor NF- κ B [136] sowie Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (z.B. Raf-MEK1/2-ERK) beteiligt [90]. Darüber hinaus spielen auch intrazelluläres Calcium und AP-1 eine Rolle bei der Expression dieses Defensins in den Atemwegen [135].

Die Induktion des Cathelizidins LL-37/h-CAP-18 wurde über eine von dem durch *Mycobacterium tuberculosis* aktivierten Toll-like-Rezeptor-2 induzierten Expression des Vitamin-D-Rezeptors (VDR) und des Vitamin-D₁-Hydroxylase-Gens beschrieben [83].

Neben der direkten antimikrobiellen Aktivität (s.o.) haben antimikrobielle Peptide verschiedene immunmodulatorische Funktionen. LL-37 beeinflusst die Expression zahlreicher Gene verschiedener Chemokine sowie deren Rezeptoren mit anti- und proinflammatorischem Effekt [20;114]. LL-37 stimuliert die Freisetzung des Zytokins Interleukin 8 (IL-8) aus humanen Epithelzellen [114], wodurch Makrophagen und Neutrophile angelockt werden und wirkt auch selbst chemotaktisch auf Neutrophile, Monozyten und bestimmte Populationen von T-Lymphozyten [148;150].

In zahlreichen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass antimikrobielle Peptide im Rahmen von Infektionen der Atemwege vermehrt in die Sekrete abgegeben werden und mit weiteren Entzündungsparametern wie Differentialzellzahl und Zytokinmilieu korrelieren. So konnten im Rahmen von Pneumonien [8;61;64;109], diffuser Panbronchiolitis [10;60] sowie chronischer Infektionen bei der Zystischen Fibrose [24] oder COPD [146] erhöhte Konzentrationen von LL-37/hCAP-18, hBD-2 und hBD-3 in den Atemwegen gefunden werden. Auch bei der Lungentuberkulose durch Infektion mit *Mycobacterium tuberculosis* wurden α -Defensine im Plasma sowie in der bronchoalveolären Lavage Flüssigkeit (BALF) in erhöhten Konzentrationen nachgewiesen [9].

Außer bei Infektionen spielen antimikrobielle Peptide auch bei der allergischen Entzündung der Atemwege eine Rolle.

Zu den atopischen Erkrankungen der Lunge gehört das extrinsische Asthma bronchiale. Asthma bronchiale ist eine durch Allergene oder inhalative Noxen getriggerte Hypersensitivitätsreaktion der Bronchialschleimhaut vom Soforttyp, die zu einer reversiblen Obstruktion und Hyperreagibilität der Atemwege führt und mit Eosinophilie, Dyskrie und strukturellen Veränderungen der Bronchien einhergeht.

Wie schon eingangs erwähnt ist das Immunsystem ein fein reguliertes System zahlreicher Effektoren der spezifischen und unspezifischen Abwehr. Bei der Modulation der spezifischen Immunantwort spielen zwei Arten von CD4⁺ T-Helfer-Zellen, Th-1- und Th-2-Zellen, eine Rolle, die sich in der Expression ihrer Zytokine und in ihren Zielzellen unterscheiden.

In einem gesunden Immunsystem besteht ein Gleichgewicht zwischen Th-1- und Th-2-Zytokinen. Ist diese Balance zu Gunsten der Th-2-Zytokine gestört, treten Symptome atopischer Erkrankungen auf [49].

Eine gestörte Balance des erworbenen Immunsystems wirkt sich auch auf das angeborene aus. Die Th-2-Zytokine IL-4 und IL-13 supprimieren die Expression und Synthese der β -Defensine und des humanen Cathelicidins LL-37 [95]. Dies führt dazu, dass bei atopischen Erkrankungen, die mit einer vermehrten Expression von Th-2-Zytokinen einhergehen, durch den Verlust wichtiger Effektoren der lokalen Immunabwehr eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber Infektionen besteht [15;95;98].

1.3 Muzine

1.3.1 Einteilung der Muzine

Die Oberflächen der Schleimhäute – so auch die der Atemwege – sind mit viskösen Sekreten muköser und seröser Drüsenzellen, Becherzellen sowie Epithelzellen bedeckt. Der Mukus der Atemwege ist ein stark hydriertes Gel (95 % Wasser), zu dessen wesentlichen Bestandteilen die hochmolekularen Muzine gehören.

Mittlerweile sind 21 humane MUC-Gene beschrieben worden, die Muzine oder Muzin-ähnliche (*mucin-like*) Moleküle exprimieren (Tab.1). Dabei werden die sezernierten Muzine, die von MUC2, MUC5A, MUC5B, MUC6 exprimiert werden und für die gelartige Konsistenz des Mukus verantwortlich sind, von den transmembranen Muzinen MUC1, MUC3A/B, MUC4, MUC11, MUC12, MUC13, MUC15, MUC17 und MUC20 unterschieden [45;91;103;137]. Die löslichen Muzine (*gel forming mucins*) werden apikal von spezialisierten Epithelzellen sezerniert: MUC2 und MUC5A von Becherzellen, MUC5B und MUC6 von mukösen Drüsenzellen [63;103;142]. MUC5B wird von mukoiden Zellen der submukösen Drüsen in einer hoch- und einer niedermolekularen Form synthetisiert [134].

Die membranständigen Muzine werden von Epithelzellen apikal exprimiert und dienen dem Schutz der Oberflächen der Schleimhäute (MUC4) und halten kanalikuläre Strukturen offen (MUC1) [103]. Darüber hinaus spielen die Glykoproteine an der Zelloberfläche als Rezeptoren

eine Rolle in der zellulären Signaltransduktion [82]. MUC1 und MUC4 werden von Zellen muzinöser Karzinome exprimiert. Durch ihre Expression an der gesamten Zelloberfläche destabilisieren sie interzelluläre Kontakte und erleichtern so die Motilität maligner Zellen [103].

In den Atemwegen tragen vor allem die sezernierten löslichen Muzine MUC5AC, MUC5B und zu einem geringen Teil (2,5 %) MUC2 zur Viskosität der Sekrete bei [74]. In Sputum aus gesunden Atemwegen wurden Konzentrationen von 45-12000 µg/g MUC5AC und 2-1042 µg/g MUC5B nachgewiesen [74].

Zusätzlich finden sich Produkte von MUC7 und MUC8 in den Atemwegssekreten [82]. MUC7 ist ein kleines Glykoprotein, welches vorwiegend in serösen Zellen der Speicheldrüsen, aber auch in den Atemwegen, exprimiert wird und über seine Adhärenz zu Mikroorganismen antimikrobielle, insbesondere antimykotische, Aktivität aufweist [18;82]. Über die Funktion von MUC8 ist noch wenig bekannt.

Neben den sezernierten Muzinen sind auch die membranständigen Muzinfamilien MUC1, MUC4, MUC11, MUC13, MUC20 und MUC24 in den Atemwegen nachweisbar [82;132;137]. Durch Abschürfungen der Epithelien können auch diese Muzine im Mukus enthalten sein.

Muzingene	Lokalisation	Vorkommen
<i>Sekretorische Muzine</i>		
MUC2	11p15.5	Intestinum, kolorektale Karzinome, Gallenblase, Zervix, Bronchien
MUC5AC	11p15.5	Respirationstrakt, Magen
MUC5B	11p15.5	Speicheldrüsen, Respirationstrakt, Gallenblase, Pankreas, Zervix
MUC6	11p15.5	Magen, Duodenum, Gallenblase, Pankreas
<i>Membranständige Muzine</i>		
MUC1	1q21	Lunge, Pankreas, Urogenitaltrakt, Mamma- und Ovarialkarzinome
MUC3A	7q22.1	Intestinum, kolorektale Tumoren, Leber, Pankreas, Gallenblase, Herz, Thymus,

		Prostata
MUC3B	7q22.1	Intestinum
MUC4	3q29	Trachea, Lunge, Thymus, Schilddrüse, Intestinum, Hoden, Prostata, Ovarien, Uterus, Plazenta, Mamma, Speicheldrüsen, Karzinome diverser Organe
MUC11	7q22.1	Intestinum, Leber, Pankreas, Urogenitaltrakt, Thymus, Lunge
MUC12	7q22.1	Kolon
MUC13	3q13.3	Intestinum, Magen, Trachea, Lunge, Niere
MUC15	11p14.3	Mamma, Plazenta, Milz, Thymus, Intestinum, Lunge, Hoden, Ovarien, Prostata, lymphatisches Gewebe, Bluteukozyten, Knochenmark
MUC17	7q22.1	Intestinum, Magen
MUC20	3q29	Niere, Lunge, Leber, Urogenitaltrakt, Plazenta
<i>Muzinähnliche Glykoproteine</i>		
MUC7	4q13.3	Speicheldrüsen
MUC8	12q24.3	Trachea
MUC9	1p13	Eileiter
MUC14	4q24	Lunge, Niere, Herz
MUC16	19q13.2	Ovarialkarzinom (CA 125), Kornea, Konjunktiva
MUC18	11q23.3	Melanozyten (malignes Melanom), Gefäßendothel
MUC19	12q12	?
MUC24	6q21	Intestinum, Lunge, Schilddrüse, kolorektale und pankreatische Adenokarzinome

Tab. 1: Übersicht über die bislang bekannten Muzingene und ihre Expressionsorte [45;91;103;137]

1.3.2 Struktur und Eigenschaften von Muzinen

Muzine sind hochmolekulare Glykoproteine mit molekularen Massen im Bereich von 10 bis 30 MDa [30;133].

Die Muzinmonomere bestehen aus einer Proteindomäne, dem Apomuzin, mit zahlreichen posttranslational modifizierten O-glykosidischen Seitenketten. Die Apomuzine werden von den MUC-Genen kodiert und enthalten repetitive Sequenzen der Aminosäuren Prolin, Treonin und Serin, von denen die beiden letzten die O-glykosidischen Bindungen zu den Zuckern Sialin-Säure und N-Acetyl-Galaktosamin herstellen. Daneben kommen N-Acetyl-Glukosamin, Galaktose, Fukose und Sulfate in den Resten vor [78]. Die Kohlenhydratketten, die 70-80 % des Molekulargewichts ausmachen, sind in Länge und Struktur - linear oder verzweigt - sehr variabel und tragen zur Komplexität der Glykoproteine bei. Die zahlreichen glykosidischen Seitenketten verleihen ihnen eine starke negative Ladung.

Ein Muzinmakromolekül besteht aus vier bis fünf Untereinheiten (~2 MDa), die jeweils wieder mehrere Monomere (~400 kDa) von glykosylierten Apomuzinen enthalten [21;133]. Disulfidbrücken halten Untereinheiten und Monomere zusammen. Daraus ergeben sich lineare flexible Ketten verschiedener Länge (100 bis 5000 nm), die in keiner festen Sekundär- oder Tertiärstruktur vorliegen (*random coil*) [118]. Aufgrund ihrer hohen Flexibilität nehmen die Makromoleküle komplexe dreidimensionale Strukturen an.

Die Glykoproteine werden, geschützt durch kationisches Calcium, dehydriert in Granula der Zellen gespeichert und erst nach Sekretion hydriert [77]. Hierfür spielen der Wasseranteil und die Ionenzusammensetzung der Atemwegssekrete eine entscheidende Rolle. Der tatsächliche Mechanismus der Hydrierung der Makromoleküle ist allerdings noch nicht geklärt. Doch Muzine binden Wasser, quellen auf und bedingen so die rheologischen Eigenschaften des Mukus wie seine Elastizität, Viskosität und Tendenz zur Adhärenz [132].

1.3.3 Die Rolle der Muzine bei der Immunabwehr der Atemwege

Die Flimmerepithelzellen der Atemwege sind mit einer Flüssigkeit aus Plasmatrassudat und Sekreten von Epithelien und Blutzleukozyten

bedeckt. Diese Flüssigkeit besteht aus zwei Phasen: Einer flüssigen Phase periziliär an der Epitheloberfläche und einer viskösen Phase von Mukus obenauf (Abb. 2). Bakterien, Staubpartikel und andere inhalierte Fremdkörper werden vom Mukus gebunden und zusammen mit der periziliären Flüssigkeit durch den Zilienschlag der Flimmerepithelien in Richtung Larynx transportiert [89]. Größere Sekretmengen können zudem durch Husten oder Niesen erzeugten Luftstrom zum Mund gelangen. Aufgrund der Diversität und der anionischen Ladung ihrer Kohlenhydratketten stellen Muzine im Mukus zahlreiche Epitope zur Verfügung und erhöhen so die Affinität zu den inhalierten Fremdkörpern [19;78].

Die Effektivität dieses mechanischen Abwehrmechanismus ist entscheidend von der Höhe der das Epithel bedeckenden Flüssigkeiten abhängig. Übersteigt diese Höhe die Länge der Zilien des Flimmerepithels ($\sim 7\mu\text{m}$), ist der Transport der Sekrete erschwert [19]. Dies kann bei Hypersekretion von Mukus im Rahmen verschiedener Erkrankungen der Atemwege zu verstärkter Retention führen. Für die Regulation des Volumens der Atemwegsflüssigkeiten sind die sekretorischen Eigenschaften des Epithels von Bedeutung, das sowohl in der Lage ist, Flüssigkeit zu sezernieren, wie zu absorbieren und so die optimale Höhe der bedeckenden Flüssigkeit schafft. Die Elektrolytkonzentration sowie das Angebot an wässriger periziliärer Flüssigkeit bestimmen die Höhe der mukösen Schicht. Denn vermehrte seröse Sekretion wird nicht dem Volumen der unteren wässrigen Phase zugeführt, sondern wird von dem Mukusgel aufgesogen, was dadurch an Höhe gewinnt [19;131].

Neben der Funktion des Flimmerepithels, sowie Menge und Volumen des Mukus, tragen auch dessen rheologischen Eigenschaften zur Effektivität des mukoziliären Transports bei. Insbesondere seine Viskosität und seine Elastizität spielen hierbei eine Rolle, da beide Eigenschaften die Gleitfähigkeit des Mukus negativ beeinflussen [73].

Bei Störung dieses empfindlichen Systems können inhalierte Fremdkörper schlechter aus der Lunge entfernt werden, was die Besiedelung mit Bakterien erleichtert [143] (Kap. 1.3.4).

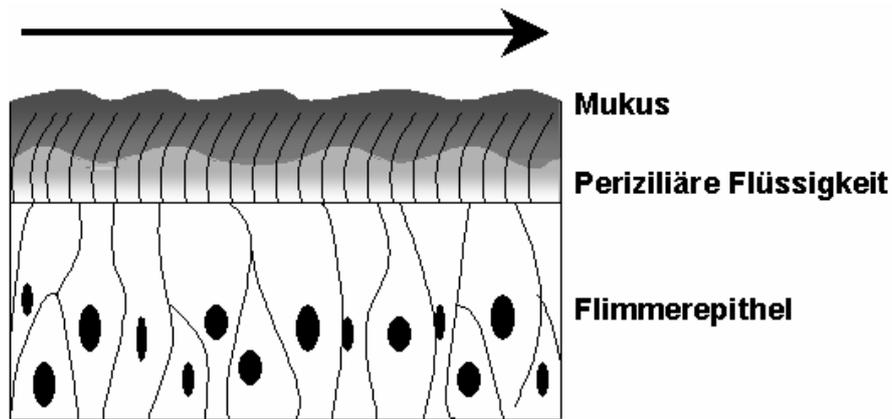


Abb. 2: Schema mukoziliärer Transport.

Das Atemwegsepithel ist bedeckt mit einem Gemisch aus Plasmatrassudat und den Sekreten verschiedenster Zellen. Die hydrierten sezernierten Muzine bilden das Mukusgel, das auf einer dünnen Schicht wässriger Flüssigkeit schwimmt. Über die Sekretion von Wasser reguliert das Epithel die Höhe dieser mukösen Schicht [19]. Die periziliäre Flüssigkeit sowie der Mucus obenauf werden durch den Zilienschlag zusammen mit gebundenen Fremdkörpern in Richtung Larynx transportiert.

1.3.4 Die Rolle der Muzine bei Erkrankungen des Respirationstrakts

Bei vielen Erkrankungen der Atemwege, wie akuten oder chronischen Infektionen, allergischen Entzündungen, der chronisch obstruktiven Lungenerkrankung (COPD) oder der Zystischen Fibrose, kommt es zu Veränderungen von Volumen und Zusammensetzung des Mucus. Inflammatorische Reize führen zu Hyperplasie und Hypertrophie von Becherzellen und mukösen Drüsenzellen und damit zu einer Hypersekretion von Muzinen bei Infektion und Entzündung [106]. Neben den Muzinen wird auch die periziliäre Flüssigkeit im Rahmen der Entzündung vermehrt sezerniert [47]. Allerdings ist nicht nur die Hyperplasie der Becherzellen per se für die Hypersekretion der Muzine verantwortlich; vielmehr wird die Sekretion der Glykoproteine durch eine Vielzahl inflammatorischer Stimuli induziert [66]. Zu diesen gehören im wesentlichen neutrophile Elastase [139], bakterielle Toxine [34] und Zytokine aus T-Zellen [25;47;82].

Ein entscheidender Faktor für die optimalen rheologischen Eigenschaften von Muzinen ist ihr Flüssigkeitsgehalt. Sind Ionen- und Wassersekretion des Epithels gestört, wie zum Beispiel bei der Zystischen Fibrose (Kap.

1.4), werden die Sekrete visköser und es bilden sich muköse Plaques, was den mukoziliären Transport stark beeinträchtigt.

Die resultierende Mukostase erleichtert Bakterien die Kolonisation der Sekrete. Muzine haben aufgrund ihrer anionischen Kohlenhydratreste eine hohe Affinität zu bakteriellen Zellmembranen und erleichtern die Adhärenz von Bakterien [29;132;143;145]. Dies ist zum einen Voraussetzung für einen effektiven mukoziliären Transport von Mikroorganismen aus der Lunge, ermöglicht zum anderen Bakterien bei Mukostase im Mukus zu kumulieren. Bestimmte Bakterien können sogar dicke Schleimplaques penetrieren und sich darin trotz hypoxischer Umgebung vermehren. Worlitzsch *et al.* haben die Adhärenz von *Pseudomonas aeruginosa* an Mukus beschrieben und seine Fähigkeit, unter anaeroben Bedingungen zu wachsen und oxidativem Stress mit Alginate-Sekretion zu begegnen [145].

1.4 Die Immunabwehr der Atemwege bei der Zystischen Fibrose

Die Zystische Fibrose (CF) (Synonym: Mukoviszidose) ist eine Erbkrankheit, die sich im Kindesalter üblicherweise mit chronischen respiratorischen Infekten und Malnutrition manifestiert. Sie wird autosomal-rezessiv auf nachfolgende Generationen vererbt, wobei nur homozygote Genträger erkranken. Die Ursache ist eine Mutation im CFTR-Gen (cystic fibrosis transmembrane regulator) auf dem Chromosom 7q31-32 [71;104;107]. Das CFTR-Produkt ist ein Chlorid-Kanal an der apikalen Zelloberfläche, der Cl⁻-Ionen in beiden Richtungen über der Zellmembran leitet. Sein Defekt beeinträchtigt die Leitfähigkeit der Membran für Ionen und damit die Flüssigkeitssekretion der Epithelzellen [19].

Dadurch werden die Sekrete in den Atemwegen immer visköser, was den mukoziliären Transport erheblich beeinträchtigt und zur Retention des zähen Schleims führt. Dieser bildet einen optimalen Nährboden für zahlreiche Keime, insbesondere *Pseudomonas aeruginosa*, *Haemophilus influenzae* und *Staphylococcus aureus* [87]. Obwohl die betroffenen Kinder mit gesunden Lungen geboren werden, verursachen chronische Infektionen schon schnell eine Zerstörung des Gewebes mit Einbußen der Lungenfunktion [87].

Neben der Lunge sind noch weitere Organsysteme von der Erkrankung betroffen, auf die hier nicht näher eingegangen wird.

1.5 Die chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD) basierend auf einem α_1 -Antitrypsinmangel

α_1 -Antitrypsin (AAT) ist ein Akute Phase Glykoprotein, das hauptsächlich in der Leber synthetisiert wird und als Protease-Inhibitor vor dem Gewebeverfall durch Proteasen, insbesondere der Elastase neutrophiler Granulozyten, schützt. Es gelangt über passive Diffusion aus dem Plasma oder durch lokale Sekretion von Epithelzellen und Alveolarmakrophagen in die Lunge [92].

Normalerweise besteht ein Gleichgewicht zwischen Proteasen und Antiproteasen, eine Imbalance zugunsten der Proteasen macht die Lunge anfällig für die unkontrollierte Zerstörung von Gewebe. Bei niedrigen Plasma-Spiegeln von AAT erhöht sich daher das Risiko zur Ausbildung eines Lungenemphysems [65].

Die Neutrophilen Elastase ist eine Serin-Protease, die Struktur-Proteine wie Kollagen, Elastin, Proteoglykane und Fibronectin des interstitiellen Lungengewebes spaltet [42]. Sie führt zu epithelialen Defekten [6] und beeinträchtigt den mukoziliären Transport, indem sie den Zilienschlag des Flimmerepithels vermindert [6] und die Hypersekretion von Mukus induziert [134].

Der AAT-Mangel ist eine autosomal co-dominant vererbte Erkrankung, bei der in der schweren Form statt dem normalen M-Allel das Z-Allel vorliegt, welches abnorme Proteine exprimiert [127]. Bei der Expression des Z-Allels kommt es durch Polymerisation der abnormalen Proteine zur Akkumulation und Retention in der Leber, was den AAT-Plasma-Spiegel auf 10-15 % des normalen MM Phenotyps reduziert [85]. Zudem ist das in geringeren Mengen vorhandene Z-AAT funktionell schlechter in der Inhibition der Elastase [84;97]. Homozygote Träger des Z-Allels haben daher ein erhöhtes Risiko schon in jungen Lebensjahren an einer COPD zu erkranken [79].

Neben dem Z-Allel gibt es noch die Variante des S-Allels, die zu leicht erniedrigten AAT-Spiegeln führt, das seltene Null-Allel, bei dem überhaupt kein AAT im Plasma zu detektieren ist sowie seltene abnorme M-Varianten [32;79].

Neben dem Lungenemphysem prädisponiert die Akkumulation von Z-AAT zu Lebererkrankungen wie neonataler Hepatitis, juveniler Zirrhose und hepatozellulärem Karzinom [100] sowie zu Manifestationen an Haut (z.B. Pannikulitis) und Gefäßen (z.B. Wegener Granulomatose) [127]. AAT-Polymere lassen sich auch in BALF nachweisen [36] und sind chemotaktisch für Neutrophile [92;101].

2. Fragestellung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war, das komplexe Zusammenwirken verschiedener Bestandteile der Sekrete der Atemwege zu untersuchen.

Die Bronchialschleimhaut ist mit einer Flüssigkeit bedeckt, die zahlreiche Komponenten enthält. Muzine als hochmolekulare Glykoproteine sind Hauptbestandteil des viskösen Mukus, antimikrobielle Peptide werden von diversen Zelltypen abgegeben und vermischen sich mit den anderen Sekreten. Da Muzine und antimikrobielle Peptide gemeinsam in diesen Flüssigkeiten vorliegen und zudem stark gegensätzliche Ladungen aufweisen, ist eine Interaktion der beiden Proteine wahrscheinlich. Dabei stellt sich die Frage, ob diese Interaktion Auswirkungen auf die Eigenschaft und Funktion der Peptide mit Konsequenz für die lokale Abwehr der Atemwege hat.

Daher sollte das Vorliegen einer elektrostatischen Interaktion von Muzin mit dem humanen Cathelicidin LL-37 untersucht werden sowie insbesondere deren Einfluss auf die Konformation und antimikrobielle Aktivität des AMP. Als nächstes stellte sich die Frage, ob eine solche Interaktion auch *in vivo* besteht und dort für die lokale Immunabwehr eine Rolle spielt. Dafür wurde die Interaktion von Muzin und LL-37 in humanen BALF-Proben gesunder Probanden und in Sputum-Proben von Patienten mit Zystischer Fibrose und chronischer Infektion der Atemwege analysiert.

Im Rahmen der Arbeit sollte außerdem die Frage beantwortet werden, ob die antimikrobiellen Peptide hBD-2 und LL-37/h-CAP-18 in humanen Atemwegssekreten vorliegen und durch akute Infektionen in ihrer Konzentration beeinflusst werden. Hierfür wurden die AMPs in BALF von Patienten mit einer auf einem α_1 -Antitrypsinmangel basierenden COPD zu Beginn und nach Ausheilung einer akuten Exazerbation gemessen.

3. Material und Methoden

3.1 Herstellung der Proteine

3.1.1 Synthese und Aufbereitung von LL-37

Das Cathelizidn LL-37 (LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLPRTES-COOH) wurde von Dr. Peter Henklein, Charité Berlin, synthetisch hergestellt. Das lyophilisierte Peptid wurde in Konzentrationen von 1 mg/ml in destilliertem H₂O gelöst und mit 0,01 % Essigsäure angesäuert aliquotiert.

3.1.2 Aufbereitung von kommerziellem Muzin

Kommerziell bezogenes Muzin, aufgereinigt aus Schweinemagen (mucine from porcine stomach type II, Sigma-Aldrich, München), wurde in neutralem Phosphat-Puffer (10 mM KH₂PO₄/K₂HPO₄, pH 7,2) gelöst und auf die Endkonzentration von 6 mg/ml verdünnt. Um die Salzkonzentration in der Muzinlösung zu reduzieren, wurde diese zunächst für 24 Stunden gegen 5 l destilliertes Wasser und anschließend weitere 24 Stunden gegen 2 l des bereits zum Lösen verwendeten Phosphat-Puffers bei 4°C dialysiert. Hierfür wurden Spectra-Por® Dialyseschläuche (Serva, Heidelberg) mit einem MWCO von 6000 – 8000 Da zunächst eine Stunde bei 70°C in destilliertem Wasser eingeweicht, dann mit 5 ml Portionen Muzin befüllt und durch Klemmen an den Enden fest verschlossen. Ständiges Rühren mit dem Magnetrührer gewährleistete eine gleichmäßige Verteilung der Ionen in der Dialyse-Flüssigkeit.

Ob die Muzinlösung mit der Dialyse auf eine physiologische Salzkonzentration gebracht werden konnte, wurde im Rahmen eines antimikrobiellen Assays (Kap. 3.6.3) kontrolliert. Denn ein zu hoher Salzgehalt in der Lösung zeigt selbst antimikrobielle Wirkung und beeinträchtigt die Funktion der antimikrobiellen Peptide, was für die nachfolgenden Versuche ausgeschlossen werden musste.

Hierfür wurden 2 ml Muzinlösung in einem Ultrazentrifugationsröhrchen von Vivaspin (Vivascience AG, Hannover) mit einem MWCO von 30.000 Da 30 min. in der Kühlzentrifuge (Megafuge 1. OR, Heraeus, Hanau) bei 4°C zentrifugiert. Es wurde davon ausgegangen, dass das hochmolekulare Muzin zwar von der Membran zurückgehalten wird, doch die proteinarme durchgepresste Flüssigkeit den gleichen Salzgehalt hat wie die Muzinlösung. Zwei 250 µl-Ansätze dieser Flüssigkeit, von denen einer 30 min. bei 37°C mit 50 µg/ml LL-37 inkubierte, wurden beide mit 12,5 µl einer Bakterienlösung (Kap. 3.6.3) inkubiert und auf Nähragar ausgestrichen. Nur wenn keine bakterizide Wirkung der Lösung selbst und kein Wirkverlust des antimikrobiellen Peptids darin zu erkennen war, wurde die dialysierte Muzinlösung für Versuche verwendet.

3.2 Analysen von humanen Sekreten der Atemwege

3.2.1 Allgemeines zur Herkunft der verwendeten humanen Proben

Bei den zur Analyse verwendeten humanen Proben handelte es sich um im Rahmen von Bronchoskopien gewonnene BALF und um spontan abgegebenes Sputum. Das Material wurde zur Verfügung gestellt von der Klinik für Innere Medizin, Abteilung Pneumologie, der Philipps-Universität Marburg; dem Fraunhofer-Institut für Toxikologie und experimentelle Medizin (ITEM), Abt. Klinische Allergie-, Asthma-, und Inhalationsforschung der Universitätsklinik Hannover; des Queen Elizabeth Medical Centre, Birmingham, UK und der Kinderklinik der Ludwig-Maximilian-Universität München. An allen Standorten haben die jeweiligen Ethik-Kommissionen der Verwendung der Proben für Proteinanalysen zugestimmt.

3.2.2 Bronchoalveoläre Lavage Flüssigkeit (BALF) von Patienten mit α_1 -Antitrypsinmangel

Die Lavage Flüssigkeiten von Patienten mit nachgewiesenem α_1 -Antitrypsinmangel wurden von Herrn Prof. Dr. Robert Stockley aus dem Queen Elizabeth Medical Centre, Birmingham, England zur Verfügung gestellt.

Alle Patienten litten an einer COPD mit eingeschränkter Lungenfunktion (FEV_1 $31,85 \pm 18,0$ % pred.) und nachweislich an einem AAT-Mangel (Mutation PiZZ). Bis auf zwei Patienten hatten alle eine positive Raucheranamnese mit im Mittel $24,6 (\pm 16,1)$ pack years.

In diesen BALF wurden im Enzym-linked Immunosorbent Assay (ELISA) die Konzentrationen des Cathelizidins LL-37/hCAP-18 und des humanen Defensins hBD-2 bestimmt (Kap. 3.3.1 und 3.3.2).

Von den insgesamt 191 vorliegenden Proben hatten 147 BALF-Proben ausreichende Volumina für die Messung. Dennoch mussten die Proben 1:5 mit Diluent, PBS-Puffer (225 mM NaCl, 1,05 mM KH_2PO_4 , 2,2 mM K_2HPO_4 , pH 7,4) mit 1 % Albumin (Kalbsserum, Fraktion V, Sigma-Aldrich, München), verdünnt werden, um das erforderliche Volumen für den ELISA zur Verfügung zu haben. Der Verdünnungsfaktor wurde in die Konzentrationsberechnung mit einbezogen.

Von einer Untergruppe aus 9 Patienten wurde beim Vorliegen einer akuten Exazerbation im Rahmen einer bronchoalveolären Lavage Probenmaterial gewonnen sowie nochmals 28 Tage danach. Hieran konnten die gemessenen Konzentrationen von LL-37/hCAP-18 und hBD-2 in der BALF unter akuter Entzündung und nach deren Abklingen miteinander verglichen werden.

3.2.3 Bronchoalveoläre Lavage Flüssigkeit (BALF) von Asthmatikern

Diese BALF-Proben wurden im Rahmen einer Studie gewonnen, die vom Fraunhofer-Institut für Toxikologie und experimentelle Medizin (ITEM), Abt. Klinische Allergie-, Asthma-, und Inhalationsforschung durchgeführt wurde [39;62]. Hierbei wurden 16 Asthmatiker im Abstand von 24 Stunden zweimal bronchoskopiert und lavagiert.

Bei der ersten Bronchoskopie wurde sowohl BALF gewonnen, als auch in verschiedene Segmentbronchien Allergenextrakt, bakterielles Endotoxin (LPS), die Kombination aus Allergen und LPS sowie physiologische NaCl-Lösung als Kontrolle instilliert. 24 Stunden später wurden die Probanden erneut lavagiert und BALF nach der *in vivo* Stimulation aus den entsprechenden Segmentbronchien gewonnen.

In allen BALF-Proben wurden LL-37/hCAP-18 und hBD-2 quantitativ im ELISA (Kap. 3.3.1 und 3.4.1) bestimmt. Das Probenmaterial wurde dafür ohne weitere Behandlung direkt eingesetzt.

3.2.4 *Bronchoalveoläre Lavage Flüssigkeit (BALF) von Probanden ohne akute Infektion der Atemwege*

Die von der Klinik für Innere Medizin des Universitätsklinikums Marburg zur Verfügung gestellten BALF-Proben waren im Rahmen diagnostischer Bronchoskopien von 28 Patienten ohne akute oder chronische Infektion der Atemwege gewonnen worden. Sie wiesen keine pathologische Zytologie auf und ergaben daher keinen Anhalt für eine Entzündung der Atemwege. Für die Analyse in dieser Arbeit wurden sie gepoolt und zum quantitativen Nachweis von LL-37/hCAP-18 und Muzin verwendet. Mit SDS-Gelelektrophorese und Western Blot wurde untersucht, ob in der BALF vorwiegend LL-37 oder sein Propeptid hCAP-18 vorlagen.

Nach dem Poolen der Proben (Volumen je 40 ml) wurden die Proteine darin mit Ultrazentrifugationsröhrchen von Vivaspin (Vivascience AG, Hannover) nach ihrer Größe getrennt. Durch den Zentrifugationsvorgang (4000 rpm für 30 min. bei 4°C) wurde die BALF durch eine Membran (MWCO 100.000 Da) gepresst. Die hochmolekulare Fraktion des Muzins blieb im viskösen Überstand oberhalb der Membran zurück, während ein großer Teil der Flüssigkeit in das Auffanggefäß darunter gelangte. LL-37/hCAP-18 und Muzin wurden sowohl im Überstand als auch in der Flüssigkeit der unteren Fraktion quantitativ mit ELISA bzw. mit einem Enzym-linked Lektinsorbent Assay (ELLA) (Kap. 3.3.1 und 3.4.1) bestimmt.

3.2.5 *Sputumproben von Patienten mit Zystischer Fibrose*

In dieser Arbeit wurden fünf Proben spontanen Sputums von fünf Patienten mit Zystischer Fibrose zur Analyse verwendet. Die Proben wurden von Herrn Prof. Dr. Matthias Griese aus der Kinderklinik der Ludwig-Maximilian-Universität München gesammelt und zugestellt.

Alle Patienten, im durchschnittlichen Alter von $29,8 \pm 2,8$ Jahren mit mäßig bis schwer eingeschränkter Lungenfunktion (FEV_1 $43,0 \pm 5,8$ % pred.), litten an einer chronischen Infektionen der Atemwege mit

Pseudomonas aeruginosa, befanden sich aber zum Zeitpunkt der Sputumabgabe in einem klinisch stabilen Zustand.

Die Proben wurden für die quantitative Bestimmung von LL-37 und Muzin mittels ELISA bzw. ELLA (Kap. 3.3.1 und 3.4.1) aufbereitet. Das Vorliegen von LL-37 oder seinem Propeptid hCAP-18 wurde mit SDS-Gelelektrophorese und Western Blot untersucht.

Da die Proben sehr viskös waren, wurden sie mit dem Skalpell geschnitten und in ca. 20 µl Portionen aliquotiert. Danach wurden sie 1:16 mit Kalium-Phosphat-Puffer (10 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$, pH 7,2) verdünnt und 1 Stunde bei Raumtemperatur mit 50 µl DNase (Quiagen, Hilden) inkubiert. Währenddessen wurden die Aliquots regelmäßig gevortext. Die Proben wurden anschließend in dieser Konzentration für die Gelelektrophorese verwendet. Doch mussten sie für den ELISA noch 1:10000 und für den ELLA 1:100000 mit dem schon zuvor gebrauchten Phosphat-Puffer verdünnt werden.

3.3 LL-37 und hBD-2 Enzym-linked Immunosorbent Assays (ELISA)

3.3.1 Quantitative Bestimmung von LL-37

Bei diesem ELISA wurde eine Mikrotiterplatte (Nunc-Immuno-Plate, Wiesbaden) direkt mit den Proben beladen, ohne vorhergegangene Beschichtung mit einem Antikörper. Diese Vorgehensweise bot sich an, da LL-37 ein sehr klebriges Peptid mit einer hohen Affinität zu Plastik ist. Zur Bestimmung der LL-37/hCAP-18-Konzentration in den Proben wurde zusätzlich ein Standard mitgeführt, bestehend aus sieben Verdünnungen von 1000 ng/ml bis 15,125 ng/ml des synthetischen Peptids in Diluent (s.o.). Als Leerwert (Blank) wurde der Verdünnungspuffer (Diluent) alleine verwendet.

Alle Proben wurden grundsätzlich doppelt aufgetragen und aus diesen Doppelwerten der Mittelwert für die weitere Auswertung gebildet. Verdünnungsfaktoren wurden immer in die Konzentrationsberechnung einbezogen.

Die Proben wurden über Nacht bei 37°C auf der Platte angetrocknet. Am nächsten Tag wurde dreimal mit Waschpuffer (PBS-Puffer mit 1% Tween-20 (Roth, Karlsruhe)) gewaschen. Zur Entfernung ungebundener

Antikörper oder Antigen folgten zwischen jedem der darauf folgenden Schritte drei Waschschritte.

Um ein unerwünschtes Binden von Proteinen an die Platte zu verhindern, wurde diese mit 300 µl/well proteinreicher Blocking Reagenz (1% Protein in 50 mM Tris-HCl und 150 mM NaCl, pH 7,4, bezogen von Roche, Mannheim) für 2 Std. bei 37°C inkubiert.

Zur Detektion des Cathelizidins wurde ein monoklonaler Antikörper aus Maus gegen LL-37/hCAP-18 (clone1-1C12, Hbt HyCult, Uden, Niederlande) verwendet. Dieser wurde 1:120 in Diluent verdünnt und für 1 Std. bei RT inkubiert. Danach wurde ein sekundärer HRP-gekoppelter anti-Maus Antikörper (Amersham, Piscataway, NJ, USA) in einer Verdünnung von 1:6000 ebenfalls für 1 Std. bei RT aufgetragen. Als Substrat wurde das Chromogen TMB (Dako®, Glostrup, Dänemark) verwendet, das während 10-minütiger Inkubation bei RT von der Peroxidase zu einem blauen Farbstoff umgesetzt wurde. Anschließend wurde die Reaktion mit 3 N H₂SO₄ gestoppt und die Extinktion bei 450 nm mit dem Elx 800 ELISA-Reader (Bio-Tek, Bad Friedrichshall) gemessen.

3.3.2 *Quantitative Bestimmung von hBD-2*

Für diesen ELISA wurde ein polyklonaler Antikörper gegen das humane β-Defensin 2 (hBD-2) [11], gewonnen aus Kaninchen, in einer Verdünnung von 1:250 in Beschichtungspuffer (50 mM NaHCO₃/Na₂CO₃, pH 9,6) auf eine Mikrotiterplatte aufgebracht und über Nacht bei 4°C inkubiert.

Am darauf folgenden Tag wurde die Platte nach dreimaligem Waschen mit Waschpuffer (s.o.) für 2 Stunden bei 37°C mit Blocking Reagenz (s.o.) geblockt. Anschließend wurden die Proben aufgetragen. Zur Quantifizierung der Menge des Peptids in den Proben wurde als Standard eine Verdünnungsreihe des rekombinanten hBD-2 (synthetisch hergestellt und bezogen von Prof. Dr. Forssmann, IPF-Hannover) von 125 ng/ml bis 1,95 ng/ml aufgetragen. Die Proben inkubierten wieder über Nacht bei 4°C.

Detektiert wurde das Defensin am nächsten Tag mit einem polyklonalen anti-hBD-2-IgG-Antikörper aus Ziege (Abcam, Cambridge, UK), welcher 1:1000 in PBS mit 1 % Albumin eine Stunde bei RT inkubierte. Als

sekundärer Antikörper wirkte HRP-konjugiertes anti-Ziege-IgG (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) 1:40000 in Diluent ebenfalls für eine Stunde bei RT ein. Auch bei diesem ELISA wurde das Chromogen TMB als Substrat verwendet, der Farbumschlag mit 3 N H₂SO₄ gestoppt und die Extinktion bei 450 nm mit dem ELISA-Reader detektiert.

3.4 Enzyme-linked Lektinsorbent Assay (ELLA)

3.4.1 ELLA zur quantitativen Bestimmung von Muzin

Zur Bestimmung von Muzin wurde eine Mikrotiterplatte mit dem Lektin UEA I (von *Ulex europaeus*, Sigma, Taufkirchen) 1:1000 in Beschichtungspuffer (s.o.) über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach dem Waschen und Blocken mit Blocking Reagenz (s.o.) wurden die Proben aufgetragen, inklusive eines Standards aus einer Verdünnungsreihe des kommerziellen Muzins (Kap. 3.1.2) von 750 ng/ml bis 5,86 ng/ml. Die optimale Verdünnung der Proben wurde in vorhergegangenen Versuchen getestet. Die Proben inkubierten erneut über Nacht bei 4°C.

Am darauf folgenden Tag wurde Muzin mit einem an Biotin gekoppelten Lektin aus *Tritium vulgare* WGA (wheat germ agglutinin, Sigma-Aldrich, Taufkirchen) detektiert, das in einer Verdünnung von 1:2000 in Diluent 2 Std. bei RT einwirkte.

Danach wurde POD-konjugiertes Streptavidin (Roche, Mannheim) in einer 1:1000 Verdünnung für 30 min. bei RT eingesetzt. Anschließend wurde das Chromogen-Substrat TMB auf die Platte gegeben und für 10 min. inkubiert. Die Reaktion wurde mit 3 N H₂SO₄ gestoppt und die Extinktion bei 490 nm mit dem ELISA-Reader gemessen.

3.4.2 Nachweis der elektrostatischen Interaktion von LL-37 und Muzin

Zum Nachweis der elektrostatischen Bindung von Muzin an LL-37 wurde eine Mikrotiterplatte zur Hälfte mit LL-37 beschichtet. Hierfür wurde das antimikrobielle Peptid in einer Konzentration von 40 µg/ml in Beschichtungspuffer verdünnt und die Platte mit 100 µl/well (4 µg LL-37/well) über Nacht bei 4°C inkubiert. Die andere Hälfte der Platte blieb zur Kontrolle unbeschichtet.

Am nächsten Tag wurde nach dem Blocken Muzin in einer Verdünnungsreihe von 1500 bis 11,22 µg/ml jeweils von A – H über die gesamte Platte aufgetragen und über Nacht bei 4°C inkubiert.

Die Detektion des Muzins erfolgte am darauf folgenden Tag wie in Kap. 3.4.1 beschrieben. Doch wurde hier kein Standard mitgeführt und die vom ELISA-Reader detektierte Extinktion nicht in Konzentrationen umgerechnet.

Um die Interaktion von Muzin und LL-37 auf der Basis elektrostatischer Kräfte zu überprüfen, wurde in einem weiteren Experiment der Einfluss von Kochsalz auf die Bindung untersucht. Nach der Inkubation von Muzin wurde in drei verschiedenen Ansätzen jeweils dreimal mit verschiedenen NaCl-Konzentrationen (1 M; 2 M; 4 M) gewaschen. Als Kontrolle fungierte eine analog zum vorhergegangenen Versuch nicht mit Salz behandelte Platte. Nach dieser Behandlung wurde das Salz wieder mit Waschpuffer von den Platten entfernt, um die nachfolgende Detektion von Muzin nicht zu beeinträchtigen. Muzin wurde anschließend mit dem in Kap. 3.4.1 beschriebenen ELLA detektiert.

3.5 Gelelektrophorese und Western Blot

3.5.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Mit dieser Methode wurde ebenfalls die Interaktion von LL-37 und Muzin untersucht sowie BALF- und Sputum-Proben aufgetrennt, um das Vorliegen von LL-37 bzw. hCAP-18 darin nachzuweisen.

Für die Untersuchung der Interaktion von LL-37 und Muzin in der Gelelektrophorese wurde dialysiertes Muzin (6 mg/ml) (Kap. 3.1.2) mit 20 ng synthetischem LL-37 für 30 min. bei 37°C inkubiert und aufgetragen. Als Kontrollen wurden Muzin und LL-37 der gleichen Konzentrationen in Phosphatpuffer (10 mM KH₂PO₄/K₂HPO₄, pH 7,2) verwendet. Von allen Proben wurden 30 µl 2:1 mit Probenpuffer Roti®Load 1 (Roth, Karlsruhe) vermischt. Anschließend wurden sie 10 min. bei 96°C im Heizblock erhitzt und dann 3 min. bei 13.000 rpm zentrifugiert, um Verluste durch den Erwärmungsvorgang einzusparen.

Von den Humanproben wurden ebenfalls jeweils 30 µl eingesetzt und genauso behandelt. Als Kontrolle wurden hier 10 ng LL-37 in PBS-Puffer mitgeführt.

Die vorbereiteten Proben (45 µl) wurden auf ein 10-20% Tris-HCl Criterion™ Precast Gel (Bio-Rad, München) in der entsprechenden Criterion Cell-Elektrophoresekammer (Criterion System, BioRad, München) aufgetragen. Um Anhalt über die Größe der aufgetrennten Proteine zu geben, wurden 10 µl eines Proteinstandards (SeaBlue2Plus; Invitrogen, Karlsruhe) mitgeführt. Als Laufpuffer wurde ein Tris-Tricin Puffer benutzt (1,2 M Tris, 800 mM Tricin, 2% SDS, pH 8,5). Die Elektrophorese wurde mit einer Spannung von 60 V gestartet, bis alle Proben in das Sammelgel eingezogen waren und danach auf 100 V erhöht, bis die Lauffront des Probenpuffers das untere Ende des Gels erreicht hatte (Spannungsquelle: Power Pac 300, BioRad, München). Anschließend wurde das Gel für den Western Blot (Kap. 3.5.3) verwendet.

3.5.2 Native-Polyacrylamidgelelektrophorese (Native-PAGE)

In der nativen PAGE wurde ebenfalls die Interaktion von LL-37 mit Muzin untersucht.

Im Gegensatz zur denaturierenden erfolgt bei der nicht-denaturierenden PAGE die Auftrennung der Proteine im elektrischen Feld nach ihrer Nettoladung, Masse und nativen Gestalt. Der Elektrophorese- und Probenpuffer, sowie der Trenn- und Sammelgelpuffer, enthielten daher weder das Detergenz SDS noch Mercaptoethanol, um die Struktur der Proteine nicht zu zerstören.

Die nativen Polyacrylamidgele wurden selbst hergestellt (Tab. 2).

Komponenten	Trenngel (7,5 %)	Sammelgel (4,5 %)
3 M Tris-HCl; pH 8,9	1,25 ml	
500 mM Tris-HCl ; pH 6,7		1 ml
Saccharose (40 %)		4 ml
Acrylamid-Bisacrylamid (30 %)	2,5 ml	1,2 ml
ddH ₂ O	6,5 ml	1,68 ml
Ammoniumpersulfat (10 % w/v)	100 µl	80 µl
TEMED	8 µl	8 µl

Tab.2: Herstellung von Trenngel und Sammelgel.

Für die Gelelektrophorese wurde dialysiertes Muzin (6 mg/ml) mit 50 ng LL-37 nach gemeinsamer Inkubation für 30 min. bei 37°C verwendet. Als Kontrollen fungierten wieder Muzin und LL-37 der entsprechenden Konzentration in Phosphatpuffer.

30 µl Probe wurden 2:1 mit nicht-denaturierendem Probenpuffer (500 mM Tris, 20 % v/v Glycerol, 0,1 % Bomphenol-Blau (Roth, Karlsruhe)) vermischt und im Gegensatz zur SDS-PAGE vor dem Auftragen auf das Gel nicht erhitzt, um eine Denaturierung der Proteine zu vermeiden.

Zur Elektrophorese wurde nicht-denaturierender Laufpuffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, pH 8,3) verwendet. Als Proteinstandard wurden ebenfalls 10 µl SeaBlue2Plus aufgetragen, um eine grobe Orientierung über die Größe der in dem nativen Gel wandernden Proteine zu erhalten.

3.5.3 *Western Blot*

Die in der Elektrophorese aufgetrennten Proteine wurden mittels Elektrotransfer auf eine 0,45 µm dicke Nitrozellulose-Membran (TransBlot®, BioRad, München) übertragen und für den nachfolgenden immunologischen Nachweis immobilisiert.

Der Western Blot wurde nach der SDS- wie nach der nativen PAGE nach dem gleichen Verfahren durchgeführt.

Zur Vorbereitung auf den Transfer wurden die Gele für ein paar Minuten in dem zum Blotten verwendeten Tris-Glycin-Puffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20 v/v % Methanol, pH 8,3) äquibriert. Geblottet wurde für 2,5 Stunden bei konstanten 30 V und 4°C.

Vor der Immundetektion wurde die Membran zur Absättigung noch freier Bindungsstellen über Nacht bei 4°C in 10 %iger fettarmer Milch inkubiert. Dafür wurden 10 g fettarmes Milchpulver (Roth, Karlsruhe) in 100 ml PBS gelöst.

In dieser Arbeit wurde nur das Cathelizidin LL-37/hCAP-18 im Western Blot detektiert, wofür der ebenfalls für den ELISA verwendete monoklonale Antikörper aus Maus IgG (Kap. 3.3.1) benutzt wurde. Hierbei wurde er 1:500 in 5 %iger Milch verdünnt und die Membran für 3 Stunden bei Raumtemperatur damit beschichtet.

Zwischen dem Antikörperwechsel wurde die Membran mehrfach mit PBS gewaschen und inkubierte danach 2 Stunden bei RT mit dem an eine ECL-Peroxidase gekoppelten sekundären Anti-Maus-Antikörper (Kap.

3.3.1), 1:6000 verdünnt in 5 %iger Milch. Nach diesem Vorgang wurde die Membran erneut gewaschen und dann für 5 min. mit dem Substrat Super-Signal®West Femto Kit (Pierce, Bonn) überschichtet. In der Dunkelkammer wurde in bestimmten Zeitabständen Filmmaterial (Kodak, Stuttgart) mit der fluoreszierenden Membran belichtet und anschließend entwickelt.

3.6 Antimikrobielle Assays

Zur Untersuchung des Einflusses der Bindung von LL-37 an Muzin auf die antimikrobielle Wirkung des Cathelizidins wurden verschiedene Assays durchgeführt, mit denen die antimikrobielle Aktivität von LL-37 in Anwesenheit von Muzin gegen *Pseudomonas aeruginosa* und gegen *Streptococcus pneumoniae* getestet wurde. Gemessen wurde die bakterizide Wirkung an dem Überleben der Kolonie bildenden Einheiten (KBE) in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen der beiden Proteine. Im ersten Experiment wurde bei konstanter LL-37-Konzentration die Konzentration von Muzin schrittweise reduziert. Im darauf folgenden Versuch wurde stattdessen bei konstantem Muzin-Gehalt die Konzentration von LL-37 in einzelnen Schritten angehoben. Beide Experimente wurden mit beiden Bakterienstämmen durchgeführt und lediglich deren unterschiedliche Anforderungen an die Wachstumsbedingungen berücksichtigt.

3.6.1 Kultivierung und Aufbereitung der Bakterien

Für beide Assays wurden die Bakterienstämme *Pseudomonas aeruginosa* (PAO1) und *Streptococcus pneumoniae* (PN36, von Dr. M. Witzentrath, Charité, Berlin) verwendet. Die Bakterien wurden bei –80°C in Glycin aufbewahrt. Für die Anzucht wurden Pseudomonaden mit einer Impföse in 10 ml einer peptonhaltigen Nährbouillon (Roth, Karlsruhe) überimpft und über Nacht bei 37°C und 180 rpm im Schüttelinkubator kultiviert. Am nächsten Morgen wurde 1 ml der Bakteriensuspension in 10 ml frischer Nährlösung überimpft und erneut für 2-3 Stunden im Schüttelinkubator inkubiert bis eine optische Dichte (OD) von 0,1 erreicht war. Die OD wurde mit dem Photometer (Ultrospec® 2100 pro,

Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) bei einer Wellenlänge von 600 nm bestimmt.

Die Streptokokken wurden mit einer Öse auf einer Blutagarplatte (Merckoplate®, Merck, Darmstadt) ausgestrichen und über Nacht im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂ bebrütet. Am nächsten Tag wurden 1-2 Kolonien dieser Platte in 10 ml des flüssigen Soja-Pepton-Nährmediums (Caso Y, Roth, Karlsruhe) mit 2 % fötalem Kalbsserum (Gibco, Karlsruhe) überimpft. Die Bakterien wurden 3-4 Stunden in der Nährlösung bei 37°C und 5 % CO₂ im Brutschrank kultiviert bis eine OD₆₀₀ von ~ 0,1 erreicht war.

Die Bakterien der neu angesetzten Suspensionen wurden für 3 min. bei 13.000 rpm abzentrifugiert und zweimal mit 2 ml Phosphat-Puffer (10 mM KH₂PO₄/K₂HPO₄, pH 7,2) gewaschen. Anschließend wurde das Pellet in 1 ml Phosphat-Puffer resuspendiert und auf eine OD₆₀₀ von 0,03 verdünnt, was ca. 4×10^5 KBE/ml entsprach. Diese Bakteriensuspensionen wurden für den Assay verwendet.

Als Agarplatten zur Kultivierung von *Pseudomonas aeruginosa* wurde Nähragar (Roth, Karlsruhe), von *Streptococcus pneumoniae* Blutagar (s.o.) verwendet.

3.6.2 Assay mit Variation der Muzin-Konzentration

Von dialysiertem Muzin (6 mg/ml) in Phosphat-Puffer (Kap. 3.1.2) wurden Verdünnungen angefertigt und je zwei 250 µl Ansätze der Konzentrationen von 6000, 3000, 1500, 750, 375, 187,5 und 93,75 µg/ml aliquotiert. Jeweils zu einem dieser Ansätze wurden 12,5 µg LL-37 (50 µg/ml) gegeben. Bei dem anderen wurde das entsprechende Volumen durch Puffer ersetzt. Alle Ansätze inkubierten 30 min. bei 37°C, um die Bindung von LL-37 an Muzin zu optimieren.

Zum Ausschluss einer Kontamination wurden je ein Ansatz des Arbeitspuffers und der Muzinlösung von 6 mg/ml mitgeführt. Alle Ansätze, bis auf die beiden Negativkontrollen von Puffer und Muzin, wurden mit 12,5 µl der zuvor hergestellten Bakteriensuspension inokuliert und gut gevortext.

Zur Kontrolle der ausreichenden antimikrobiellen Aktivität wurden 50 µg/ml LL-37 in Phosphat-Puffer gegeben und mit der gleichen Menge Bakterien inokuliert. Das Experiment wurde nur als gültig angesehen,

wenn die Konzentration von 50 µg/ml LL-37 im Puffer die maximale antimikrobielle Wirkung zeigte, d.h. kein Bakterienwachstum nachweisbar war und keine Kontamination des Puffers oder Muzins vorlag. Um ein repräsentatives Ergebnis zu erhalten, wurden von jedem Ansatz drei Ausführungen angefertigt.

Die Ansätze der Pseudomonaden inkubierten anschließend bei geschlossenem, die der Streptokokken bei geöffnetem Deckel in ihren Eppendorf-Cups eine Stunde bei 37°C. Danach wurden die Agarplatten in der Mitte geteilt und auf die eine Hälfte 25 µl des ursprünglichen Ansatzes und auf die andere das gleiche Volumen dessen 1:100 Verdünnung im Arbeitspuffer mit einer Impföse großflächig ausgestrichen.

Die beimpften Agarplatten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert, die der Streptokokken zusätzlich bei 5 % CO₂. Am nächsten Morgen wurden die gewachsenen Kolonien gezählt und der Versuch unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors und Mittelung der gezählten KBE in den drei Ausführungen eines jeden Ansatzes ausgewertet.

3.6.3 *Assay mit Variation der LL-37-Konzentration*

In diesem Experiment wurde LL-37 in Konzentrationen von 50, 100, 125 und 150 µg/ml in Muzin konstanter Konzentrationen gegeben, für eine Stunde bei 37°C inkubiert und wie im bereits beschriebenen Assay mit Bakterien inokuliert. Dabei wurde die Muzin-Konzentration so gewählt, dass den Ergebnissen des vorangegangenen Versuchs zu Folge (Kap. 3.6.2) die antimikrobielle Aktivität von LL-37 darin gerade noch inhibiert war. Das war bei den Pseudomonaden bei 375 µg/ml, bei den Streptokokken bei 750 µg/ml der Fall.

Als Kontrolle wurden 50 µg/ml LL-37 im Phosphat-Puffer und ein Ansatz der Muzinlösung ohne LL-37 mit Bakterien beimpft. Wieder waren alle Ansätze in dreifacher Ausfertigung vorhanden. Nach einer Stunde bei 37°C wurden sie zusammen mit ihren 100fachen Verdünnungen auf Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bebrütet. Am nächsten Tag wurden die überlebenden KBE ausgezählt.

3.7 Zirkulardichroismus Spektroskopie

3.7.1 Allgemeines zur Methode

Mit der Zirkulardichroismus-Spektroskopie lässt sich die Differenz der Absorption von links-drehendem und rechts-drehendem polarisiertem Licht messen. Diese ist abhängig von der Struktur der Proteine in der Probe und bei den Enantiomeren einer chiralen Verbindung gegensätzlich.

Die Absorption des zirkular gedrehten Lichts wird von einem CD-Spektrometer über einen ganzen Wellenlängenbereich (für Proteinmessungen von 190 – 250 nm) gemessen. Abhängig von der Konformation der Proteine ergeben sich charakteristische Kurvenverläufe mit typischen Maxima und Minima bei bestimmten Wellenlängen, so genannte CD-Spektren. Anhand dieser lässt sich die Sekundärstruktur der Proteine erkennen, bzw. mittels geeigneter Programme genau berechnen (Kap. 3.7.3).

Diese Methode wurde hier angewandt, um den Einfluss der elektrostatischen Interaktion von Muzin und LL-37 auf die Konformation von LL-37 zu untersuchen.

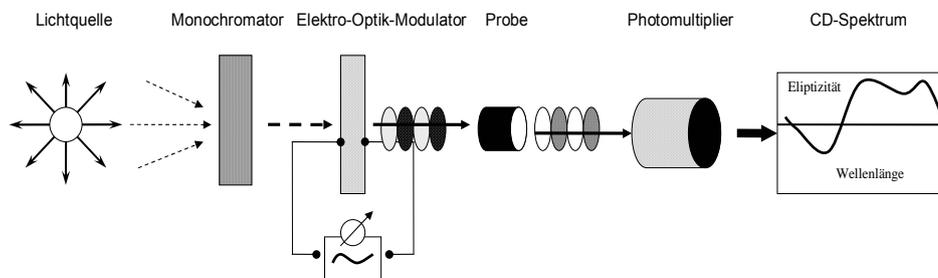


Abb. 3: Schema CD-Spektrometer.

Das Licht einer Xenon-Lampe tritt durch ein doppeltes Prisma, den Monochromator, der die unterschiedlichen Wellenlängen generiert und das Licht linear polarisiert. Danach gelangt der Lichtstrahl durch einen Elektro-Optik-Modulator, an dem eine Wechselspannung angelegt ist und der das linear polarisierte Licht in zirkular polarisiertes Licht transformiert. Dieses Licht tritt durch die Küvette und wird teilweise von der Probe darin absorbiert. Ob mehr rechts- oder mehr links-drehendes Licht absorbiert wird, ist abhängig von den Substanzen in der Probe. Das durchtretende Lichtsignal wird durch einen

Photomultiplier verstärkt und detektiert. Ein entsprechendes Computerprogramm registriert die Messung und erstellt die Kurven der CD-Spektren.

3.7.2 *Durchführung der Messungen*

Dialysiertes Muzin (Kap. 3.1.2) in Verdünnungen von 750, 375, 187,5 und 94 µg/ml wurde mit 45 µg/ml (10 µM) und 180 µg/ml (40 µM) LL-37 versetzt und die CD-Spektren dieser Lösungen sowie die der Muzinlösungen ohne antimikrobielles Peptid bestimmt. Um die natürliche Konformation des Cathelizidins bei dieser Konzentration zu ermitteln, wurde LL-37 der gleichen Konzentration in neutralem Phosphat-Puffer (10 mM KH₂PO₄/K₂HPO₄, pH 7,2) gemessen. Das Volumen aller Ansätze betrug 1 ml.

Alle Messungen wurden mit freundlicher Unterstützung von Herrn Prof. Dr. Dr. Bringmann und der Hilfe von Frau Gulder aus dem Institut für Organische Chemie der Justus-Liebig-Universität Würzburg an einem Jasco J-715 Spektropolarimeter (Jasco, Easton, MD, USA) bei Raumtemperatur durchgeführt. Die CD-Spektren wurden in einem Wellenlängenbereich von 190 nm bis 250 nm bei einer Messgeschwindigkeit von 20 nm/min und einer Auflösung von 0.5 nm/Messpunkt registriert. Jedes Spektrum wurde aus dem Mittelwert von fünf Messungen errechnet.

Die Ansätze wurden in einer Quartz-Küvette mit 1 mm Länge gemessen. Zuerst wurde das Spektrum des Arbeitspuffers registriert und von allen weiteren Messungen als Leerwert abgezogen. Bei den übrigen Ansätzen wurde das Spektrum von Muzin der jeweiligen Konzentration im Puffer von dem Spektrum der gemischten Lösung von LL-37 und Muzin abgezogen, so dass der alleinige Effekt des Peptids im CD-Spektrum erkennbar wurde.

3.7.3 *Auswertung der Messergebnisse*

Die CD-Spektren wurden nach der Methode von Sreerama und Woody [124-126] mit den Programmen des Software-Pakets CDPro ausgewertet, welches im Internet frei erhältlich ist [123]. Darin sind die Programme SELCON 3, CDsstr und CONTIN/LL enthalten. Diese Programme vergleichen die Messdaten des Spektrums mit denen eines

Pools von Referenzproteinen, deren räumliche Struktur aufgrund von etablierten Methoden, wie z.B. NMR-Spektroskopie, bekannt ist. Anhand der Ähnlichkeit der Messdaten der Proben mit denen der Referenzproteine bekannter Konformationen wird der prozentuale Anteil der Sekundärstrukturen α -Helix, β -Faltblatt und „random coil“ errechnet. Dabei wird noch zwischen regulärer und verzerrter Helix, bzw. Faltblatt, unterschieden. Die Konformation mit dem höchsten prozentualen Anteil ist als die am wahrscheinlichsten vorliegende Struktur des analysierten Proteins zu werten.

Die Auswahl des Proteinreferenzsets spielt eine wichtige Rolle. Das Referenzset sollte dem untersuchten Protein ähnliche Eigenschaften aufweisen, im Falle von LL-37 z.B. α -helikale Proteine enthalten.

Die gemessenen CD-Spektren wurden mit allen drei Programmen analysiert und die Ergebnisse gemittelt. Dabei wurde die Unterscheidung zwischen regulärer oder verzerrter Konformation nicht beibehalten.

Mit dieser mathematischen Auswertung ließen sich die Einflüsse der verschiedenen Muzinkonzentrationen auf die Konformation von LL-37 quantifizieren und objektiv miteinander vergleichen.

3.8 Statistische Auswertungen

In dieser Arbeit wurden alle graphischen Daten mit der Software Sigmaplot (Version 10.0) für Windows erstellt und in Diagrammen als Mittelwerte \pm Standardabweichung dargestellt.

Die statistischen Auswertungen wurden in SPSS 14.0 für Windows durchgeführt.

Der Unterschied zweier Gruppen der experimentellen Daten wurde mit dem T-Test (zweiseitig) getestet.

Für die statistische Auswertung der antimikrobiellen Peptide in den humanen Sekreten der Atemwege wurden nicht-parametrische Tests verwendet. Für den Vergleich der AMP-Konzentrationen in der BALF der Patienten mit α_1 -Antitrypsinmangel zu Beginn und nach Ausheilung einer Exazerbation wurde der Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test angewendet. Dieser Test wurde ebenfalls für den Vergleich der LL-37/hCAP-18- und hBD-2-Konzentration in der BALF nach segmentaler Instillation verschiedener Substanzen bei der Gruppe der Asthmatiker benutzt.

Das Signifikanzniveau wurde überall bei $\alpha = 0,05$ festgesetzt.

Die Auswertung der CD-spektroskopischen Daten wurde in Kap. 3.7.3 beschrieben.

4. Ergebnisse

4.1 LL-37 und hBD-2 kommen in humanen Sekreten der Atemwege vor

4.1.1 LL-37 und hBD-2 in bronchoalveolärer Lavage Flüssigkeit (BALF) von Patienten mit chronisch obstruktiver Lungenerkrankung basierend auf einem α_1 -Antitrypsinmangel

Um den Einfluss akuter Infektionen der Atemwege auf die Konzentrationen der antimikrobiellen Peptide hBD-2 und LL-37/hCAP-18 in den Atemwegsflüssigkeiten zu untersuchen, wurden diese in Proben von BALF quantitativ bestimmt. Diese Proben wurden im Rahmen von bronchoalveolären Lavagen von Patienten mit COPD und nachgewiesenem α_1 -Antitrypsinmangel (PiZZ) gewonnen (Kap. 3.2.2). In diesen BALF-Proben wurden im ELISA die Konzentrationen des Cathelizidins LL-37/hCAP-18 und des humanen Defensins hBD-2 bestimmt (Kap. 3.3).

Ausgewertet wurden die Konzentrationen der Peptide in den Proben des gesamten Patientenkollektivs und der Untergruppe der Patienten, die zu Beginn und nach Ausheilung einer Exazerbation lavagiert worden war.

Im Mittel betragen die in den BALF-Proben des gesamten Patientenkollektivs gemessenen Werte für das Cathelizidin LL-37/hCAP-18 783,43 ng/ml und für das humane Defensin hBD-2 26,70 ng/ml (Standardabweichungen $\pm 2676,32$ ng/ml und $\pm 39,20$ ng/ml). Die gemessenen Konzentrationen der beiden AMPs standen in keinem Zusammenhang zueinander.

In der Gruppe der Patienten, die am Beginn einer akuten Exazerbation und 28 Tage danach lavagiert worden waren, betrug die Konzentration von LL-37/hCAP-18 am Tag 1 im Mittel 538,59 ng/ml (Standardabweichung $\pm 504,33$ ng/ml) und am Tag 28 nur noch 268,12 ng/ml (Standardabweichung $\pm 366,69$ ng/ml). Die mittlere Konzentration von hBD-2 betrug am ersten Tag 27,09 ng/ml und 28 Tage später noch 10,59 ng/ml (Standardabweichungen $\pm 26,23$ ng/ml und $\pm 14,74$ ng/ml).

Bei dem Vergleich der Konzentrationen von LL-37/hCAP-18 der beiden Tage (Wilcoxon-Rang-Test) zeigte sich ein signifikanter Abfall des

antimikrobiellen Peptids in den BALF-Proben nach dem Abklingen der akuten Exazerbation ($p=0,015$).

Auch das humane Defensin hBD-2 war bei der akuten Infektion deutlich höher in der BALF konzentriert als nach deren Ausheilung ($p=0,018$).

Damit lässt sich zeigen, dass die antimikrobiellen Peptide LL-37/hCAP-18 und hBD-2 bei akuter Exazerbation einer COPD auf dem Boden eines α_1 -Antitrypsinmangels und positiver Raucheranamnese vermehrt in die Atemwegsflüssigkeit abgegeben werden als im gesunden Zustand.

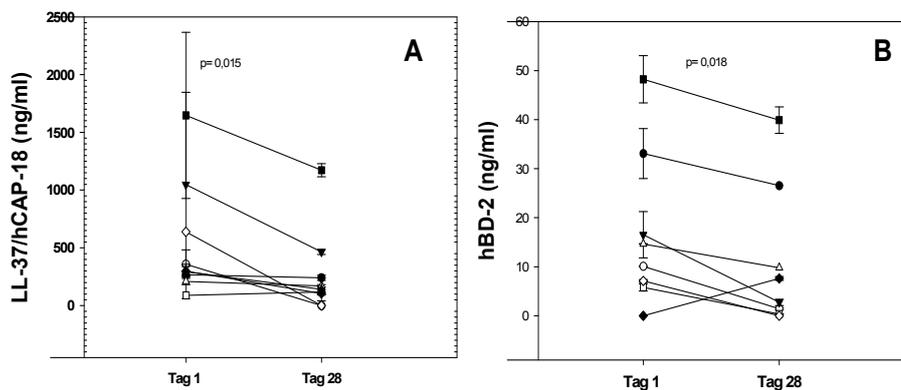


Abb. 4: LL-37/hCAP-18 (A) und hBD-2 (B) in BALF von COPD-Patienten mit α_1 -Antitrypsinmangel zu Beginn und nach Ausheilung einer akuten Exazerbation.

In den BALF, die zu Beginn und nach Ausheilung einer akuten Exazerbation gewonnen worden waren, wurden im ELISA LL-37/hCAP-18 (Diagramm A) und hBD-2 (Diagramm B) quantitativ bestimmt. Dargestellt sind die im Mittel gemessenen Konzentrationen und deren Standardabweichungen an beiden Tagen für jeden Patienten.

Am ersten Tag der Exazerbation war LL-37/hCAP-18 in signifikant höherer Konzentration in der BALF nachzuweisen als 28 Tage später nach erfolgter Therapie ($p=0,015$) (A).

Dasselbe gilt für hBD-2, das ebenfalls bei akuter Infektion in der BALF erhöht war ($p=0,018$) (B).

4.1.2 LL-37 und hBD-2 in bronchoalveolärer Lavage Flüssigkeit (BALF) von Asthmatikern nach Allergen- und LPS-Exposition

In der vom Fraunhofer-Institut durchgeführten Studie wurde Asthmatikern im Rahmen einer BAL segmental in verschiedene Bronchien NaCl, Allergenextrakt, das bakterielle Endotoxin LPS und ein Gemisch aus

beidem instilliert (Kap. 3.2.3). In Proben der nach 24 Stunden gewonnenen BALF wurden LL-37/hCAP-18 und hBD-2 im ELISA quantitativ bestimmt (Kap. 3.3).

Die mittleren Konzentrationen der AMPs nach segmentaler Instillation der verschiedenen Extrakte sind in Tab. 3 aufgeführt.

Segmentale BALF	[hBD-2] (ng/ml)	Standard abw. \pm (ng/ml)	[LL-37/hCAP-18] (ng/ml)	Standard abw. \pm (ng/ml)
Basalwert (B)	0,1	0,16	153,39	60,65
Kontrolle (NaCl-Lösung) (K)	0,18	0,17	299,27	194,34
Allergenextrakt (A)	0,18	0,35	446,94	227,33
LPS (L)	0,22	0,33	748,81	253,26
Allergen und LPS (AL)	0,34	0,42	585,50	294,64

Tab. 3: Tabelle der mittleren hBD-2 und LL-37/hCAP-18-Konzentrationen in der BALF von Asthmatikern nach segmentaler Stimulation.

In diesen BAL-Flüssigkeiten zeigte sich nach Allergen-Instillation im Mittel eine erhöhte LL-37/hCAP-18-Konzentration gegenüber der Kontrolle ($p= 0,02$) (Wilcoxon-Rang-Test). Doch eine noch stärkere Induktion des Cathelizidins in den Atemwegen war nach LPS- und nach kombinierter LPS- und Allergen-Instillation zu beobachten ($p= 0,001$ und $p= 0,017$).

Die höchste Konzentration von LL-37/hCAP-18 wurde in der segmentalen BALF nach LPS-Instillation gefunden. Interessanterweise war bei der kombinierten Exposition mit Allergen und LPS dagegen weniger antimikrobielles Peptid vorhanden.

In den gewonnenen BAL-Flüssigkeiten wurde auch hBD-2 detektiert (Tab. 3). Im Gegensatz zu LL-37/hCAP-18 unterschieden sich die hBD-2-Konzentrationen in der BALF der verschiedenen Segmentbronchien aber kaum voneinander.

Diese Daten zeigen, dass die antimikrobiellen Peptide LL-37/hCAP-18 und hBD-2 im Rahmen akuter Infektionen sowie allergischer Entzündung

der Atemwege vermehrt exprimiert werden und in den Sekreten in erhöhter Konzentration nachzuweisen sind.

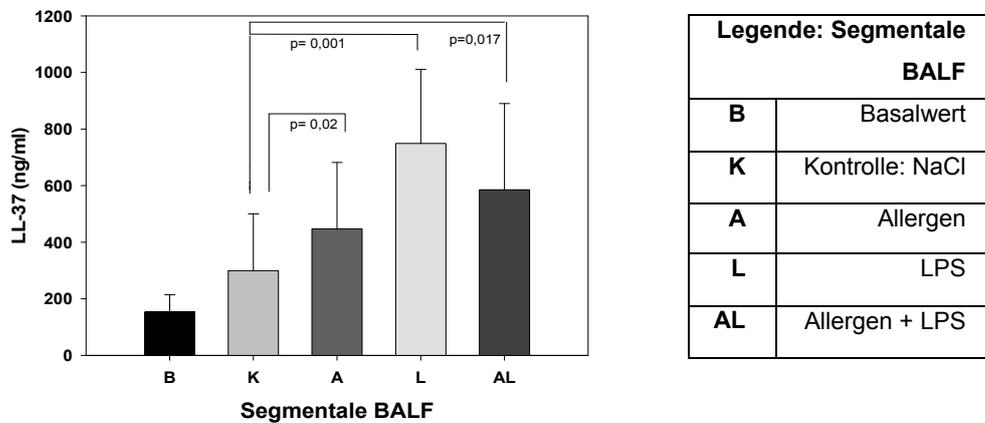


Abb. 5: LL-37/hCAP-18 in der segmentalen BALF.

LL-37/hCAP-18 wurde in der segmentalen BALF der Asthmatiker quantitativ im ELISA bestimmt. In Abb. 5 sind die mittleren Konzentrationen von LL-37/hCAP-18 und deren Standardabweichungen dargestellt.

Die Konzentration von LL-37 war nach Allergen- (A) ($p=0,02$) und mehr noch nach LPS-Exposition (L) ($p=0,001$) deutlich erhöht gegenüber der Kontrolle (K). Bei der kombinierten Instillation von Allergen und LPS (AL) lag das Cathelizidin interessanterweise in einer geringeren Konzentration vor als nach LPS-Exposition alleine.

4.2 LL-37 und Muzin interagieren elektrostatisch

4.2.1 Muzin bindet an auf eine Festphase aufgebracht LL-37

Entzündliche Erkrankungen der Atemwege führen nicht nur zu einer verstärkten Sekretion antimikrobieller Peptide, sondern stimulieren auch die Expression hochmolekularer Proteine wie Muzine, einem wesentlichen Bestandteil des Mukus.

Mucus spielt eine wichtige Rolle beim mukoziliären Transport zur Reinigung der Atemwege. In ihm werden Pathogene und andere Fremdkörper gebunden und durch den Zilienschlag der Flimmerepithelien in Richtung Larynx transportiert. Seine starke Adhärenz zu sämtlichen Partikeln und Substanzen ist somit eine fundamentale Eigenschaft des Mukus.

Muzine bieten mit ihren stark verzweigten Ketten mit zahlreichen Zuckerresten eine große Auswahl an Epitopen zur Adhärenz verschiedenster Substanzen. Aufgrund ihrer starken negativen Ladung sind dabei auch elektrostatische Wechselwirkungen mit kationischen Molekülen von Bedeutung. Da die kationischen AMPs in den Atemwegen vorkommen, ist eine Interaktion mit dem anionischen Mukus wahrscheinlich und wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht.

Die elektrostatische Interaktion von LL-37 und Muzin wurde mit einem ELLA nachgewiesen. Zusätzlich wurde das Verhalten der Proteine in der denaturierenden SDS- und der nativen PAGE untersucht.

Für den ELLA wurde LL-37 auf eine Mikrotiterplatte aufgebracht und Muzin daran gebunden und detektiert (Kap. 3.4.1). Als Maß für die Menge des an der Platte haften gebliebenen Muzins wurde die vom ELISA-Reader gemessene Extinktion verwendet.

Das detektierte Signal war deutlich stärker nach Inkubation von Muzin auf der mit LL-37 beschichteten als auf der unbeschichteten Kontroll-Platte, trotz der sonst gleichen Behandlung. Besonders bei den höheren Konzentrationen der aufgetragenen Verdünnungsreihe von Muzin zeigte sich ein deutlicher Unterschied des detektierbaren Signals (Student-T-Test für gepaarte Stichproben: $p = 0,00001$ bei $750 \mu\text{g/ml}$ Muzin). Es ist davon auszugehen, dass dies auf eine Bindung von Muzin an das auf die Platte aufgebrachte LL-37 zurückzuführen ist.

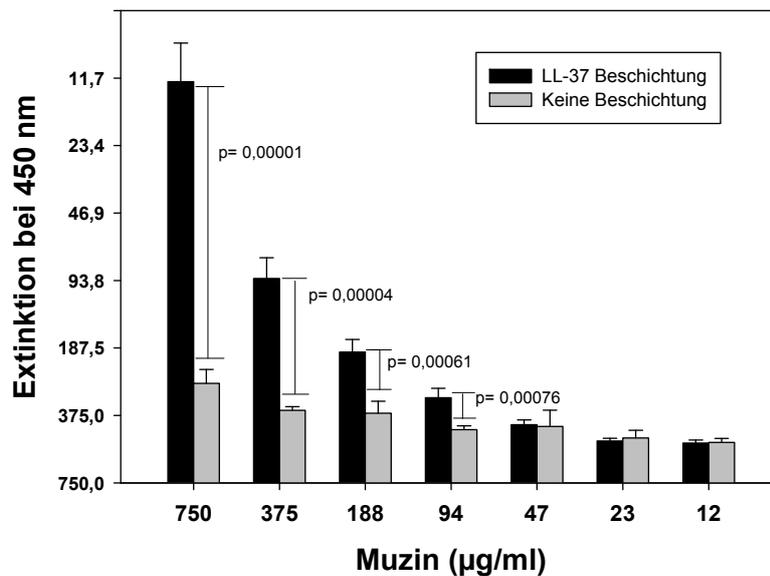


Abb. 6: Bindung von Muzin an auf eine Festphase aufgebracht LL-37.

Die mit dem ELISA-Reader gemessene Extinktion nach Bindung und Detektion verschiedener Muzin-Konzentrationen auf einer mit LL-37 beschichteten im Vergleich zu einer unbeschichteten Mikrotiterplatte.

Nach der Inkubation von Muzin auf der mit LL-37 beschichteten Platte ließ sich signifikant mehr Muzin detektieren als auf der Kontroll-Platte ($p= 0,00001$). Dieser Effekt ist bei höheren Muzin-Konzentrationen stärker ausgeprägt und nimmt bei niederen Konzentrationen ab.

In einem weiteren Experiment wurde untersucht, ob die Bindung von Muzin an LL-37 rein elektrostatischen oder anderen Kräften unterliegt. Hierfür wurde durch das Waschen mit hohen Salzkonzentrationen von 1 M, 2 M und 4 M NaCl nach der Inkubation von 750 µg/ml Muzin auf einer mit LL-37 beschichteten Platte die Bindung von Muzin an LL-37 wieder gelöst. Das ließ sich durch einen starken Rückgang des detektierbaren Signals nach Salzeinfluss zeigen. Dabei war die Abnahme der messbaren Absorption abhängig von der Höhe der angewendeten Salzkonzentration. Schon nach der Behandlung mit 1 M NaCl-Lösung blieb im Vergleich zur unbehandelten Platte deutlich weniger Muzin auf der mit LL-37 beschichteten Platte haften ($p= 0,016$; Student-T-Test für gepaarte Stichproben). Nach Einwirkung von 2 M und 4 M NaCl war der Unterschied noch größer ($p= 0,008$ und $p= 0,009$). Zwischen der Einwirkung von 1 M und 2 M bzw. 4 M NaCl wurde ebenfalls ein signifikanter Unterschied gefunden ($p= 0,001$).

Die Ergebnisse zeigen, dass die Bindung von Muzin an LL-37 von der Salzkonzentration abhängig ist und damit sehr wahrscheinlich auf elektrostatischen Kräften beruht.

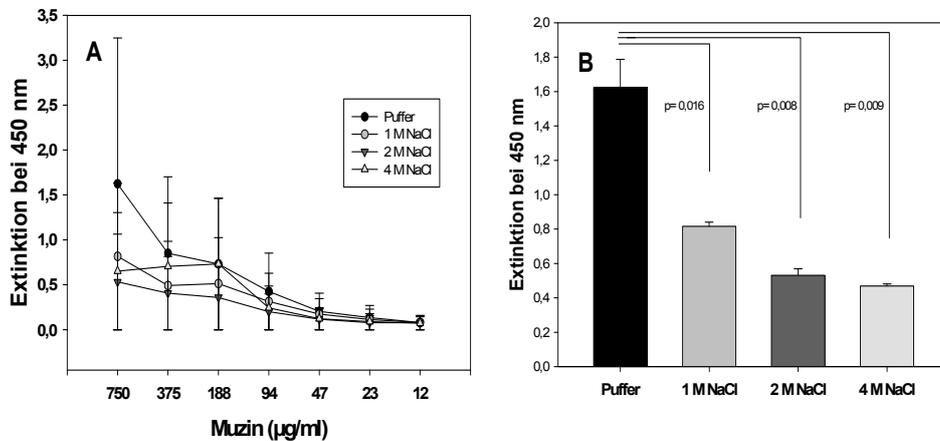


Abb. 7: Detektion von Muzin nach Behandlung mit 1 M, 2 M und 4 M NaCl.

Nach der Inkubation von Muzin auf der mit LL-37 beschichteten Platte wurde vor der Detektion des Glykoproteins dreimal mit hochkonzentrierten Salzlösungen gewaschen und Muzin anschließend im ELLA (Kap. 3.4.1) detektiert.

Gegenüber der nicht mit NaCl behandelten Kontrolle führte die Einwirkung der Salzlösungen von 1 M, 2 M und 4 M konzentrationsabhängig zu einem verminderten Signal durch weniger haften gebliebenes Muzin (A).

In Diagramm B ist das detektierte Signal bei 750 µg/ml Muzin auf einer mit LL-37 beschichteten Platte nach einem eingeführten Waschschrift mit 1 M, 2 M und 4 M NaCl-Lösungen gegenüber der herkömmlich behandelten Kontroll-Platte dargestellt.

4.2.2 Die elektrostatische Interaktion von Muzin und LL-37 hat Einfluss auf das Verhalten in der Gelelektrophorese

Die Interaktion von Muzin mit dem humanen Cathelidzin LL-37 wurde außerdem in der Gelelektrophorese untersucht. Dabei wurden 20 ng LL-37 in der SDS-PAGE (50 ng in der nativen PAGE) und 180 µg dialysiertes Muzin (Kap. 3.1.2) nach gemeinsamer Inkubation sowohl in der denaturierenden SDS-PAGE als auch in der nativen PAGE aufgetrennt (Kap. 3.5).

Dabei sollte geprüft werden, ob das AMP LL-37 aufgrund der Interaktion mit dem hochmolekularen anionischen Muzin in seiner Wanderung durch das Gel beeinflusst wird.

In der SDS-PAGE wanderte das mit Muzin inkubierte LL-37 auf derselben Höhe mit der unbehandelten Positiv-Kontrolle (20 ng LL-37). Im anschließenden Western Blot lagen beide Banden direkt nebeneinander (Abb. 8).

In der nativen PAGE hingegen wanderte das zuvor mit Muzin inkubierte LL-37 entgegen seiner natürlichen Ladung zur Anode. Dabei war im folgenden Western Blot (Abb. 9) die Positiv-Kontrolle überhaupt nicht mehr zu detektieren, weil sie entsprechend ihrer positiven Ladung in Richtung Kathode aus dem Gel heraus gelaufen war. Die ebenfalls aufgetragene Muzin-Kontrolle reagierte kaum mit dem LL-37/hCAP-18-Antikörper.

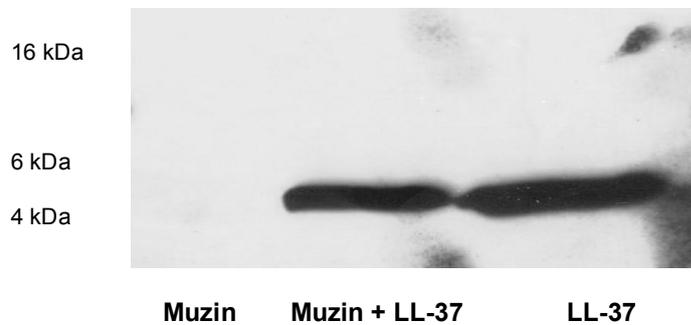


Abb. 8: Western Blot: An Muzin gebundenes LL-37 nach SDS-PAGE.

180 µg Muzin (6 mg/ml) und 20 ng LL-37 wurden nach gemeinsamer Inkubation mit SDS-PAGE aufgetrennt. Als Kontrollen wurden 20 ng LL-37 und 180 µg Muzin im Puffer aufgetragen. Nach dem anschließend durchgeführten Western Blot wurde LL-37 immunologisch detektiert.

Das mit Muzin inkubierte LL-37 wurde in der denaturierenden SDS-PAGE nicht von dem anionischen Glykoprotein zurückgehalten und erschien als Bande direkt neben der LL-37-Kontrolle.



Abb. 9: Western Blot: An Muzin gebundenes LL-37 nach nativer PAGE.

Mit der nativen PAGE wurden drei Ansätze von 180 µg Muzin und 50 ng LL-37 nach gemeinsamer Inkubation aufgetrennt. Als Kontrollen wurden Muzin und LL-37 in gleicher Menge aufgetragen. Anschließend wurde das Gel auf eine Nitrozellulosemembran geblottet und gebundenes LL-37 immunologisch detektiert. Die Peptid-Kontrolle lässt nur eine schwache Bande erkennen. Es ist wahrscheinlich, dass das kationische LL-37 hier entgegen der Laufrichtung zur Kathode gewandert und damit aus dem Gel herausgelaufen ist. Doch die drei Ansätze mit LL-37 und Muzin zeigen deutliche Banden, die in Richtung Anode auslaufen. Da Muzin mit dem LL-37-Antikörper kaum reagiert, ist anzunehmen, dass es sich hier um das Cathelizidin handelt, das aufgrund der Interaktion mit dem anionischen Muzin entgegen seiner natürlichen Ladung zur Anode wandert.

4.3 Die Interaktion von LL-37 und Muzin hemmt die antimikrobielle Aktivität des AMP

Der Einfluss der elektrostatischen Interaktion von LL-37 und Muzin auf die antimikrobielle Aktivität des AMP wurde in antimikrobiellen Assays mit *Pseudomonas aeruginosa* (PAO1) und *Streptococcus pneumoniae* (PN36) untersucht.

Hierfür wurde Muzin in seriellen Verdünnungen von 6000 µg/ml bis 93 µg/ml mit LL-37 (50 µg/ml) inkubiert und anschließend die Bakterien inokuliert. Nach einer Einwirkzeit von 1 h wurden die Ansätze auf Agarplatten ausgestrichen und die überlebenden KBE am darauf folgenden Tag ausgezählt (Kap. 3.6.3).

Bei den Muzin-Konzentrationen von 6000 bis 1500 µg/ml fand sich in den gemischten Ansätzen ein ungebremstes Bakterienwachstum. Mehr noch vermehrten sich die Bakterien in den Muzinlösungen besonders gut und

die ausgezählten KBE überstiegen die Zahl der Kolonien, die aus den im Arbeitspuffer überlebenden Bakterien hervorgingen.

In dem Assay mit den Pseudomonaden zeigte sich in den Ansätzen mit 750 µg/ml Muzin schon ein Rückgang des Bakterienwachstums, der ab der Konzentration von 375 µg/ml signifikant war (T-Test: $p= 0,028$). Ab einer Muzin-Konzentration von 187 µg/ml war die antimikrobielle Wirkung von LL-37 mit der im Puffer gleichzusetzen und es wurden keine KBE mehr detektiert (Abb. 10).

Diese konzentrationsabhängige Reduktion der antimikrobiellen Wirkung von LL-37 spricht dafür, dass es durch die Interaktion mit dem gegensätzlich geladenen Muzin in seiner bakteriziden Wirkung gehemmt wird.

Um die Bedeutung des Konzentrationsverhältnisses der Bindungspartner für die antimikrobielle Aktivität von LL-37 zu untersuchen, wurde für ein weiteres Experiment der Assay modifiziert. Dabei wurde eine konstante Konzentration von Muzin (375 µg/ml) verwendet und LL-37 von 50 µg/ml auf 100 µg/ml, 125 µg/ml und 150 µg/ml gesteigert. Die Muzin-Konzentration wurde so gewählt, dass LL-37 bei 50 µg/ml gerade noch in seiner Funktion inhibiert war, d.h. noch nicht alle Bakterien abgetötet worden waren.

Mit Steigerung der LL-37-Konzentration war gegenüber den zuvor eingesetzten 50 µg/ml LL-37 ein deutlich vermindertes Überleben von Bakterien zu verzeichnen ($p= 0,02$) (Abb. 11).

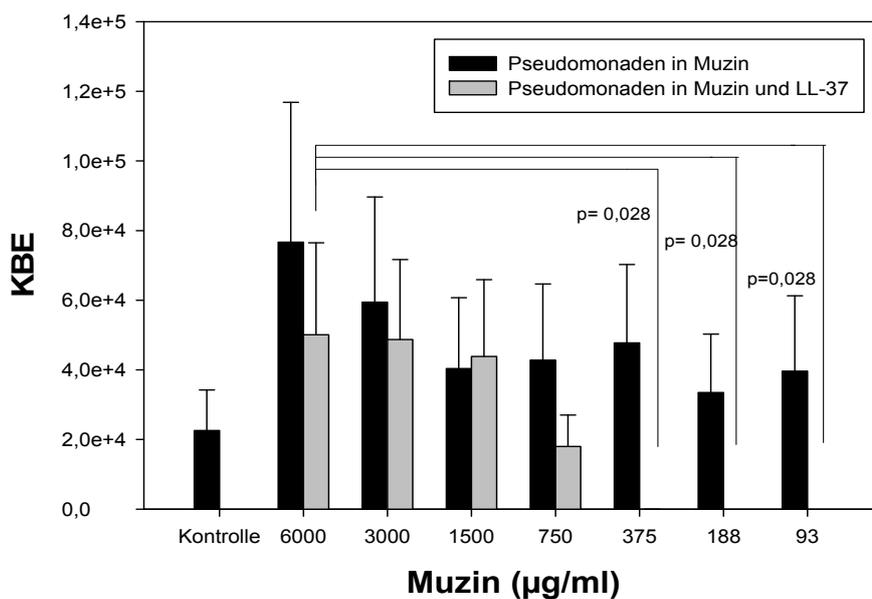


Abb. 10: Die antimikrobielle Aktivität von 50 µg/ml LL-37 gegen *Pseudomonas aeruginosa* in Gegenwart von Muzin verschiedener Konzentrationen.

Pseudomonas aeruginosa wurde in Muzinlösungen der Konzentrationen von 6000 µg/ml bis 93 µg/ml mit und ohne Zusatz von 50 µg/ml LL-37 inokuliert. Nach einer Stunde Inkubation wurden die Ansätze ausgestrichen und die überlebenden KBE am nächsten Tag ausgezählt. Das Peptid LL-37 wurde in der gleichen Konzentration als Kontrolle für die vorhandene antimikrobielle Aktivität im Puffer verwendet. Zum Ausschluss von Kontaminationen fungierten Puffer-Ansätze ohne das AMP.

Bis zu einer Muzin-Konzentration von 375 µg/ml war die antimikrobielle Aktivität von LL-37 in den Muzinlösungen deutlich inhibiert. Bei Muzin-Konzentrationen darunter überlebten dagegen keine Bakterien mehr.

Die verwendete LL-37-Konzentration wurde im Puffer als bakterizid nachgewiesen.

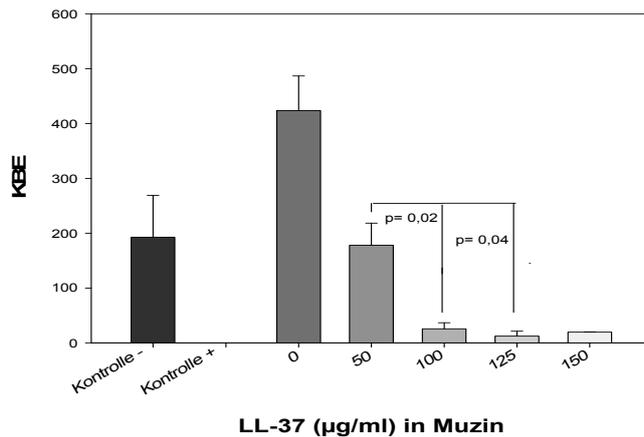


Abb. 11: Die antimikrobielle Aktivität gegen *Pseudomonas aeruginosa* von 50, 100, 125, 150 µg/ml LL-37 in 375 µg/ml Muzin.

Bei der Muzin-Konzentration von 375 µg/ml ließ sich durch den Einsatz von höheren Konzentrationen des Cathelizidins wieder eine bakterizide Wirkung erreichen.

In Abb. 11 sind die im Mittel gezählten überlebenden KBE und die zugehörigen Standardabweichungen in Ansätzen von 50, 100, 125 und 150 µg/ml LL-37 in 375 µg/ml Muzin dargestellt. Als Kontrolle wurde Puffer mit und ohne LL-37 (50 µg/ml) verwendet.

Durch die Steigerung der LL-37-Konzentration ließ sich dessen Inhibition durch das gegenwärtige Muzin teilweise aufheben und folglich weniger überlebende KBE in den Ansätzen nachweisen ($p= 0,02$ und $p= 0,04$). Allerdings konnten nicht alle Bakterien durch LL-37 dieser Konzentrationen abgetötet werden.

Beide Assays wurden außerdem mit *Streptococcus pneumoniae* (PN36) durchgeführt (Abb. 12 und 13).

Die Ergebnisse deckten sich weitgehend mit denen der Versuche mit den Pseudomonaden. Nur waren hier schon ab einer Muzin-Konzentration von 375 µg/ml alle Bakterien abgetötet. Bereits bei 750 µg/ml Muzin war die Zahl der überlebenden KBE gegenüber den höher konzentrierten Ansätzen signifikant reduziert ($p= 0,017$). Ob die Pneumokokken empfindlicher gegenüber LL-37 sind, bleibt offen, doch der inhibierende Effekt des Muzins auf die Aktivität des Cathelizidins ließ sich auch hier unzweifelhaft erkennen.

Dementsprechend wurde bei dem zweiten Assay Muzin in der Konzentration von 750 µg/ml verwendet und LL-37 in den verschiedenen Konzentrationen (s.o.) zugesetzt. Auch hier ließ sich durch Steigerung der LL-37-Konzentration, trotz der Anwesenheit von Muzin, wieder eine,

wenn auch nicht signifikante, antimikrobielle Wirkung des Peptids erreichen.

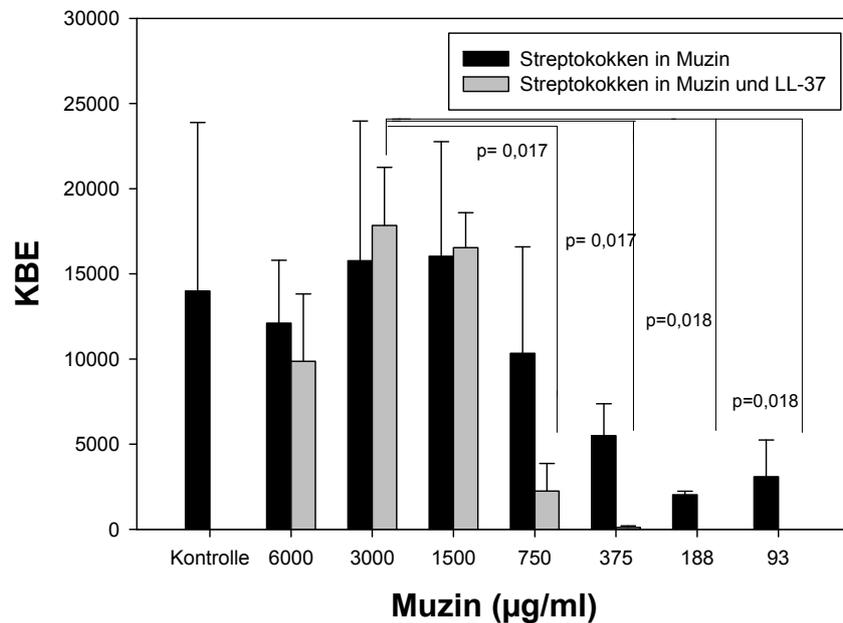


Abb. 12: Die antimikrobielle Aktivität gegen *Streptococcus pneumoniae* von 50 µg/ml LL-37 in Gegenwart von Muzin verschiedener Konzentrationen.

Streptococcus pneumoniae wurde in Muzin der Konzentrationen von 6000 µg/ml bis 93 µg/ml mit und ohne Zusatz von 50 µg/ml LL-37 inokuliert. Nach Einwirkung von LL-37 wurden die Ansätze auf Nähragarplatten ausgestrichen und die KBE am nächsten Tag ausgezählt. Kontrollen wurden entsprechend des Assays mit den Pseudomonaden mitgeführt.

Dargestellt sind die durchschnittlich überlebenden KBE der einzelnen Ansätze mit ihren zugehörigen Standardabweichungen.

Die antimikrobielle Aktivität von LL-37 war bis zu einer Konzentration von 750 µg/ml Muzin deutlich inhibiert. Bei niedrigeren Konzentrationen überlebten keine KBE mehr.

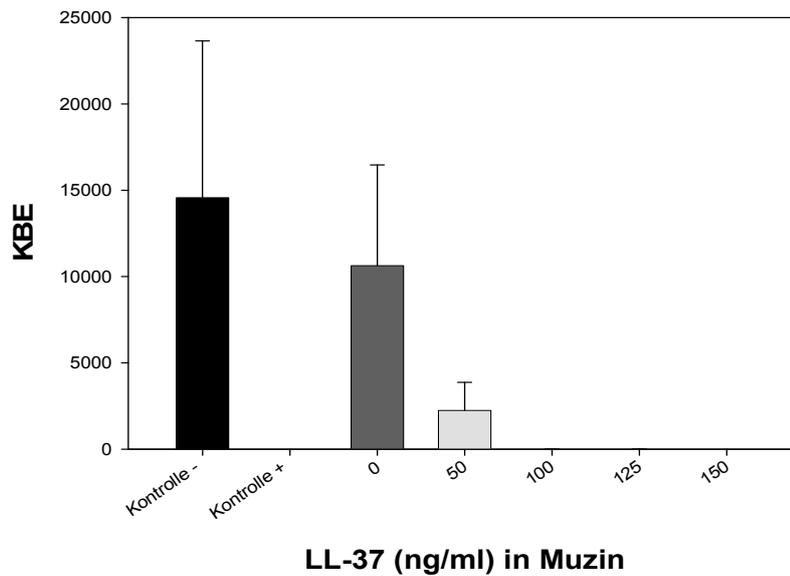


Abb. 13: Die antimikrobielle Aktivität gegen *Streptococcus pneumoniae* von 50, 100, 125, 150 µg/ml LL-37 in 750 µg/ml Muzin.

Da in dem vorhergegangenen Versuch die antimikrobielle Aktivität von LL-37 in der Muzinlösung von 750 µg/ml gerade noch inhibiert war, wurde in diesem Experiment die LL-37-Konzentration darin von 50 auf 100, 125, und 150 µg/ml gesteigert. Wie bei den anderen Versuchen wurden die Ansätze ausgestrichen und am folgenden Tag die KBE gezählt. Das Diagramm zeigt die in den Ansätzen durchschnittlich überlebenden KBE und deren Standardabweichungen.

Während LL-37 in einer Konzentration von 50 µg/ml noch inhibiert war, reichte seine antimikrobielle Aktivität schon bei der doppelten Konzentration wieder aus, fast alle Bakterien in den Ansätzen abzutöten. Allerdings waren die Unterschiede zwischen den Ansätzen der verschiedenen LL-37-Konzentrationen hier nicht signifikant.

4.4 Muzin beeinflusst die Konformation von LL-37

Das Cathelizidin LL-37 ist nur in seiner α -helikalen Konformation antimikrobiell aktiv. Es nimmt diese Sekundärstruktur ab einer bestimmten Konzentration sowie in Interaktion mit anionischen Molekülen wie Salzen [67] oder mit Bakterienmembranen [56] an. Mit der CD-Spektroskopie wurde die Konformation von LL-37 unter Einfluss von Muzin analysiert, um herauszufinden, ob Muzin die Konformation von LL-37 ändert und auf diesem Wege seine antimikrobielle Aktivität unterbindet. LL-37 wurde in den Konzentrationen von je 10 µM (45

$\mu\text{g/ml}$) und $40\ \mu\text{M}$ ($180\ \mu\text{g/ml}$) in Muzin von $750\ \mu\text{g/ml}$ bis $93\ \mu\text{g/ml}$ CD-spektroskopisch untersucht. Dabei wurden die CD-Spektren des Puffers und der Muzinlösungen selbst von denen der gemischten Ansätze abgezogen, so dass das CD-Spektrum des humanen Cathelidins LL-37 erhalten wurde (Kap. 3.7.2 und 3.7.3).

Voraussetzung für den Nachweis einer Konformationsänderung war, dass LL-37 in der angewendeten Konzentration im Phosphat-Puffer noch in keiner festen Sekundärstruktur vorlag. Da dies konzentrationsabhängig ist, war die Wahl der LL-37-Konzentration für diesen Versuch besonders bedeutend. Denn ab einer bestimmten Konzentration lagert sich das AMP LL-37 zu Oligomeren zusammen und nimmt dadurch ebenfalls eine α -helikale Konformation an [67].

Die gemessene Eliptizität aufgetragen auf die Wellenlänge ergibt das jeweilige CD-Spektrum eines Proteins. Die typischen Sekundärstrukturen α -Helix, β -Faltblatt und „random coil“ haben charakteristische Kurvenverläufe, die eine Annäherung an die tatsächliche Sekundärstruktur des analysierten Proteins geben können.

Der prozentuale Anteil der im jeweiligen Protein vorliegenden Strukturen wurde mit dem Softwarepaket CDPro errechnet (Kap. 3.7.4). Dies ermöglichte einen objektiven Vergleich der einzelnen CD-Spektren von LL-37 unter Einfluss der verschiedenen Muzin-Konzentrationen.

Bei einer Konzentration von $40\ \mu\text{M}$ lag LL-37 bereits in einer α -helikalen Konformation vor, weshalb diese Messungen nicht zur Analyse von Konformationsänderungen verwendet werden konnten.

Bei $10\ \mu\text{M}$ hatte LL-37 noch eine weitgehend ungeordnete Struktur im Arbeitspuffer, wobei es schon die Tendenz zur Annahme einer α -Helix zeigte (27 % ungeordnet, 32 % α -helikal). Die Gegenwart von Muzin führte zu einer deutlichen Veränderung des CD-Spektrums in Richtung α -Helizität. Dies ließ sich schon an den für die α -Helix typischen Maxima (bei $190\ \text{nm}$) und Minima (bei 218 und $226\ \text{nm}$) der Kurve erkennen (Abb. 14) und letztendlich mit der Software CDPro berechnen (Abb. 15).

Damit ließ sich nachweisen, dass Muzin in LL-37 eine α -Helix induziert. So hatten in Anwesenheit von $93\ \mu\text{g/ml}$, der niedrigsten der hier verwendeten Muzin-Konzentrationen, schon 61 % des antimikrobiellen Peptids eine α -helikale Konformation angenommen. Analog dazu nahm der Anteil der ungeordneten Struktur des Peptids von 27 % auf 12 % ab.

Bei weiterer Steigerung der Muzin-Konzentration in den folgenden Ansätzen änderte sich an dem prozentualen α -Helix-Anteil, der noch auf 67 % anstieg, nicht mehr viel.

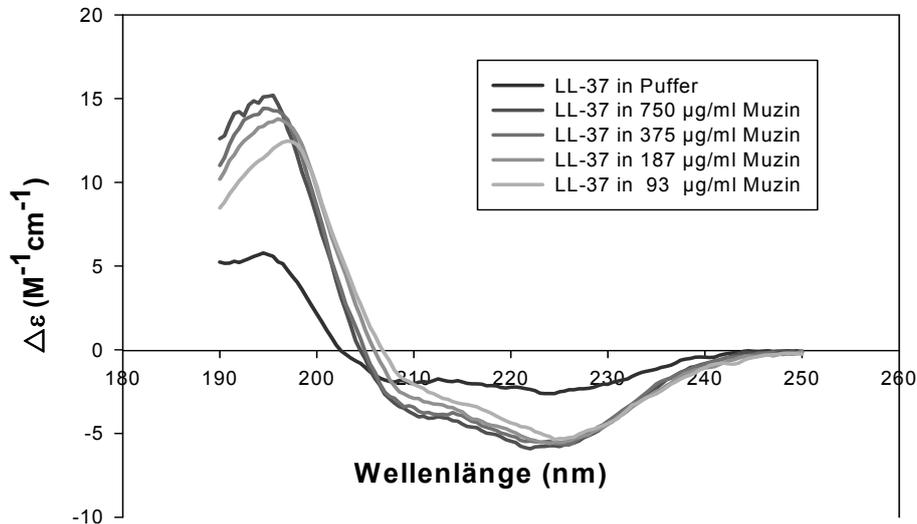


Abb. 14: CD-Spektren von LL-37 unter Einfluss von Muzin.

Die CD-Spektren von 10 μ M LL-37 wurden im Puffer und in Muzinverdünnungen von 750 μ g/ml bis 93 μ g/ml bestimmt.

Aufgetragen ist die gemessene Eliptizität auf die Wellenlänge in dem Bereich von 190 nm bis 250 nm. Jedes CD-Spektrum ist der Mittelwert aus 5 Messungen abzüglich der Ausschläge, die auf den verwendeten Phosphat-Puffer und die Muzinlösungen selbst zurückzuführen sind.

Die in Gegenwart von Muzin detektierten CD-Spektren wiesen, im Gegensatz zu dem von LL-37 im Puffer, die für eine α -Helix-Konformation typischen Kurvenverläufe mit einem Maximum bei 190 – 200 nm und zwei Minima zwischen 200 und 230 nm auf. Bei steigender Muzin-Konzentration veränderten sich die Kurven nicht mehr wesentlich.

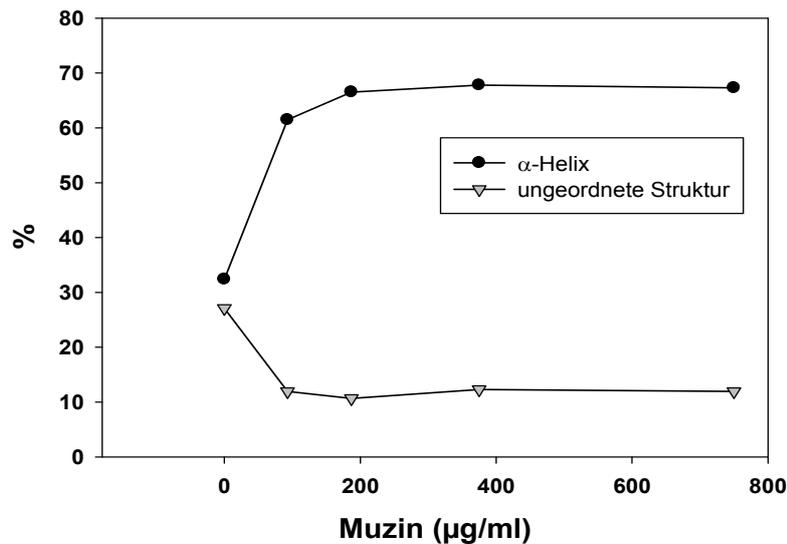


Abb. 15: Helix-Induktion in LL-37 durch die Interaktion mit Muzin.

Das Diagramm zeigt den prozentualen Anteil des in einer α -Helix vorliegenden antimikrobiellen Peptids und parallel dazu den Anteil an ungeordneten Strukturen in Abhängigkeit von der Muzin-Konzentration.

Der Anteil der α -Helizität in dem AMP verdoppelte sich fast bei Vorliegen der niedrigsten Muzin-Konzentration von 93 $\mu\text{g/ml}$ (von 32 % in Puffer auf 61 % in Muzin). Analog dazu nahm das Vorliegen der ungeordneten Struktur um die Hälfte ab (von 27 % auf 12 %). Bei weiterer Erhöhung der Muzin-Konzentration stieg der Helix-Anteil nur noch geringfügig an (67 %).

4.5 Das humane Cathelizidin LL-37/hCAP-18 akkumuliert im Mukus der Atemwege

4.5.1 LL-37-hCAP-18 und Muzin interagieren elektrostatisch in humaner bronchoalveolärer Lavage Flüssigkeit (BALF)

Um die Interaktion von LL-37 und Muzin auch in humanen Atemwegssekreten nachzuweisen, wurden die Proteine in den 28 gepoolten BALF-Proben von Patienten ohne nachweisbare Infektion der Atemwege nach ihrer Größe separiert. Hiefür wurden sie in einem Ultrazentrifugationsröhrchen mit einem MWCO von 100.000 Da zentrifugiert. Dabei blieb das hochmolekulare Muzin im viskösen Überstand über der Membran zurück, während sich eine wässrige Phase mit den kleineren Proteinen im Auffanggefäß darunter sammelte. Sowohl

im Überstand wie in der filtrierten Flüssigkeit wurden LL-37/hCAP-18 und Muzin im ELISA gemessen (Kap. 3.2.4).

Dieser Versuch sollte zeigen, ob LL-37 (4493 Da) aufgrund der elektrostatischen Interaktion mit Muzin im Überstand zurückgehalten wird.

Wie zu erwarten, konnte das hochmolekulare Muzin die Membran kaum passieren. Die ermittelte Konzentration von Muzin betrug im zähen Überstand im Mittel 2480 ng/ml (Standardabweichung \pm 101,47 ng/ml) und im filtrierten Unterstand 109 ng/ml (Standardabweichung \pm 19,22 ng/ml).

Aufgrund der vergleichsweise geringen molekularen Größe von LL-37 wäre anzunehmen gewesen, dass das kleine AMP vorwiegend in der durchgepressten Flüssigkeit vorliegt. Allerdings betrug die mittlere LL-37/hCAP-18-Konzentration im Überstand 495,62 ng/ml (Standardabweichung \pm 466,29 ng/ml) und im unteren Kompartiment 129,64 ng/ml (Standardabweichung \pm 100,51 ng/ml).

Das Peptid LL-37/hCAP-18 ist trotz seines geringen Molekulargewichtes größtenteils nicht durch die Membran getreten, sondern mit Muzin im viskösen Überstand zurückgeblieben. Das bedeutet, dass die Interaktion von Muzin und LL-37/hCAP-18 auch in humaner BALF vorhanden ist und das natürliche Verhalten der Proteine beeinflusst.

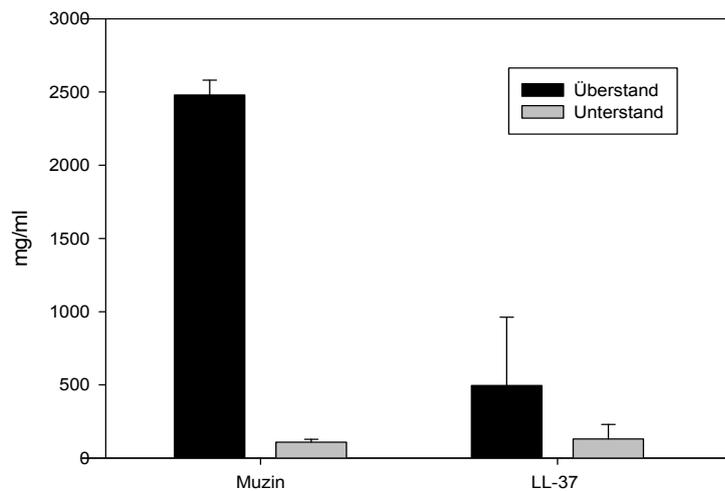


Abb. 16: LL-37/hCAP-18 und Muzin in der oberen und der unteren Fraktion der zentrifugierten BALF.

Dargestellt sind die mittleren Konzentrationen von Muzin und LL-37 in der oberen und der unteren Fraktion der BALF nicht entzündeter Atemwege und deren Standardabweichungen.

Muzin wurde entsprechend den Erwartungen vorwiegend im Überstand zurückgehalten. Doch auch LL-37/hCAP-18 war darin höher konzentriert als im Unterstand.

Vor dem Vermischen wurden die BALF-Proben in der SDS-PAGE aufgetrennt und LL-37/hCAP-18 immunologisch im Western Blot detektiert, um die darin vorliegende molekulare Form des Peptids zu ermitteln.

Dabei ließ sich ausschließlich hCAP-18 nachweisen. Die detektierten Banden lagen über der mitgeführten Kontrolle von synthetischem LL-37 (4493 Da) und auf der Höhe der 16-kDa-Bande des mitgeführten Proteinstandards.

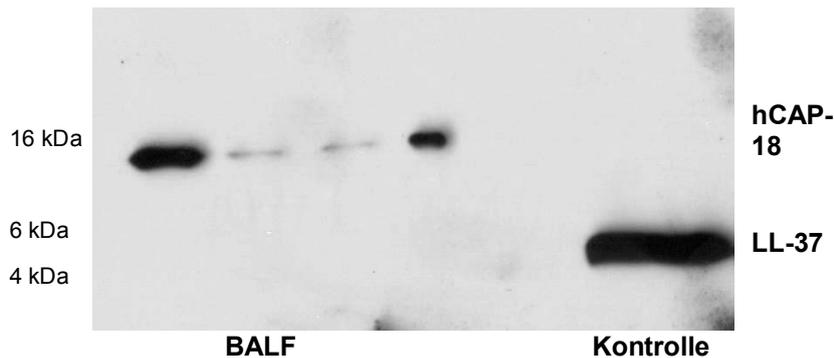


Abb. 17: Western Blot von BALF nicht entzündeter Atemwege.

Bei diesem Western Blot wurden vier BALF-Proben, in denen sich anhand der Zellzahl keine Entzündung der Atemwege nachweisen ließ, analysiert. Die Proben wurden auf ein 10-20% Tris-HCl Criterion™ Precast Gel (Bio-Rad) aufgetragen und bei 100 V elektrophoretisch aufgetrennt (Kap. 3.5.1). Synthetisches LL-37 (4493 Da) ist als Kontrolle mitgelaufen (100 ng) sowie ein Protein-Marker zum Abschätzen der Größe der detektierten Proteine.

Anhand der Lage zum Marker (Höhe der 16-kDa-Bande) und zur LL-37-Kontrolle ist davon auszugehen, dass es sich bei den detektierten Banden um das Propeptid hCAP-18 handelt.

4.5.2 *LL-37/hCAP-18 und Muzin in Sputumproben von Patienten mit Zystischer Fibrose*

In diesen Proben spontan abgegebenen Sputums von fünf Patienten mit Zystischer Fibrose und chronischer Infektion mit *Pseudomonas aeruginosa* (Kap. 3.2.5) wurden LL-37/hCAP-18 und Muzin im ELISA bzw. ELLA quantitativ bestimmt (Kap. 3.3.1 und 3.4.1) und zudem mit SDS-PAGE und Western Blot analysiert (Kap. 3.5.1 und 3.5.3).

Die in den Proben gemessene Muzin-Konzentration erreichte Werte von 68,28 µg/ml bis zu 16,6 mg/ml (MW 7,5 mg/ml, Standardabweichung ± 6,9 mg/ml). Das antimikrobielle Peptid LL-37/hCAP-18 war in Konzentrationen von 7,5 mg/ml bis zu 30 mg/ml (MW 17,5 mg/ml, Standardabweichung ± 9,1 mg/ml) darin zu finden. Genaue Angaben über die Konzentrationen der Proteine enthält Tabelle 4.

Sowohl Muzin als auch LL-37/hCAP-18 waren in diesen Proben weitaus höher konzentriert als in den zuvor analysierten BALF aus nicht entzündeten Atemwegen.

Patienten	[LL-37/hCAP-18] mg/ml	[Muzin] mg/ml
1	10,3	16,6
2	7,6	10,2
3	16,8	0,8
4	22,6	9,8
5	30,1	0,68

Tab.4: Tabelle der gemessenen LL-37/hCAP-18- und Muzin-Konzentrationen in spontanem Sputum von fünf Patienten mit Zystischer Fibrose.

Nach dem Auftrennen in der SDS-PAGE wurde im folgenden Western Blot die vorwiegend vorliegende Form des Peptids in den Proben ermittelt. Für die SDS-Gelelektrophorese wurden die Proben 1:16 verdünnt und analog zur Analyse der BALF-Proben (Kap. 4.5.1) ein Proteinstandard und 100 ng synthetisches LL-37 als Kontrolle mitgeführt. Interessanterweise wurden in den Sputum-Proben von Patienten mit Zystischer Fibrose und chronischer Infektion mit *Pseudomonas aeruginosa* sowohl hCAP-18 als auch LL-37 und Oligomere des Peptids mittlerer Größe in großer Menge gefunden.

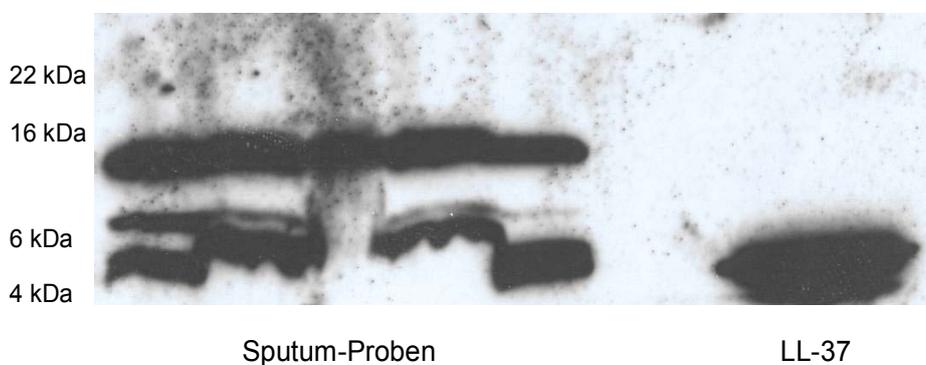


Abb. 18: Western Blot mit Sputum-Proben von CF-Patienten.

Im oben gezeigten Western Blot sind alle Sputum-Proben der fünf Patienten mit Zystischer Fibrose aufgetragen. Darin konnte sowohl LL-37 als auch hCAP-18 nachgewiesen werden. Bei den Banden dazwischen handelt es sich wahrscheinlich um Oligomere von LL-37. Die oberen Banden sind auf der Höhe der 16-kDa-Bande des Proteinstandards gelaufen und entsprechen hCAP-18, die unteren kommen neben der Kontrolle des synthetischen LL-37 zu liegen.

5. Diskussion

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit haben gezeigt, dass das humane Cathelizidin LL-37 mit Muzinen der Atemwegsflüssigkeiten eine auf elektrostatischen Kräften basierende Bindung eingeht. Diese Interaktion hat Einfluss auf die Konformation des Cathelizidins, indem sie eine α -Helix induziert, sowie auf seine antimikrobielle Aktivität. In humanen Sputum- und BALF-Proben ließ sich eine Anreicherung des antimikrobiellen Peptids im Mukus nachweisen.

Diese Erkenntnisse geben Einblick in die Komplexität der antimikrobiellen Abwehr der Atemwege und bieten mögliche Erklärungen für die verminderte Effektivität der lokalen Immunabwehr bei Hypersekretion oder Retention von Mukus in den Atemwegen.

Die antimikrobiellen Peptide LL-37/hCAP-18 und hBD-2 werden bei akuter Entzündung in die Sekrete der Atemwege abgegeben

Antimikrobielle Peptide werden von Epithelzellen und zahlreichen Zellen der Immunabwehr sezerniert und sind bereits in diversen Körperflüssigkeiten nachgewiesen worden. Die wichtigsten Familien der AMPs in den Atemwegen sind die Defensine und das humane Cathelizidin LL-37/hCAP-18 (Kap. 1.2). In zahlreichen Studien wurden diese in BALF oder Sputum gesunder Individuen sowie bei unterschiedlichen Erkrankungen der Atemwege analysiert [3;10;24;72]. Es ist bekannt, dass AMPs bei Infektion und Entzündung vermehrt exprimiert werden [58].

In der vorliegenden Arbeit wurden die Konzentrationen von LL-37/hCAP-18 und hBD-2 in humanen BALF-Proben von COPD-Patienten mit α_1 -Antitrypsinmangel sowie von Asthmatikern nach segmental bronchialer Instillation von NaCl, Allergen, LPS und LPS/Allergen (Kap. 3.2.2 und 3.2.3) bestimmt. Darüber hinaus wurden LL-37/hCAP-18 und Muzin in BAL gesunder Probanden und in spontan abgegebenem Sptum von Patienten mit Zystischer Fibrose analysiert.

Von den Patienten mit α_1 -Antitrypsinmangel litten alle an einer COPD mit eingeschränkter Lungenfunktion und hatten, bis auf zwei Ausnahmen, alle eine positive Raucheranamnese. Eine Untergruppe von 9 Patienten

wurde zu Beginn einer akuten Exazerbation lavagiert und nochmals 28 Tage später. Somit wurden BALF-Proben zum Zeitpunkt einer akuten Entzündung sowie nach deren Ausheilung gewonnen.

Im gesamten Patientenkollektiv zeigte sich gegenüber den Basalwerten in der BALF der Asthmatiker (Kap. 3.2.3) ein erhöhter Spiegel von LL-37/hCAP-18 und von hBD-2. Dies könnte zum einen auf möglicherweise vorliegende chronische Infektionen der Atemwege mit permanenten Entzündungsreizen zurückgehen und zum anderen auf den gestörten mukoziliären Transport im Rahmen der COPD [88], der eine Anreicherung von LL-37 in retinierten mukösen Sekreten zur Folge hat.

In der Untergruppe der Patienten, die zu Beginn und nach Ausheilung einer Exazerbation lavagiert worden waren, wurden die Konzentrationen von LL-37/hCAP-18 und hBD-2 zum Zeitpunkt der akuten Exazerbation signifikant höher gemessen als 28 Tage nach Beginn der Therapie.

Diese Ergebnisse zeigen, dass LL-37/hCAP-18 und hBD-2 im Rahmen von akuten Entzündungen der Atemwege vermehrt sezerniert werden.

In der BALF der Asthmatiker ließ sich ein signifikanter Anstieg der LL-37-Konzentration nach Instillation von Allergen und noch deutlicher nach Einwirkung von LPS zeigen. Bei der Stimulation mit der Kombination von LPS und Allergen lag LL-37 in geringerer Konzentration in der BALF vor als nach Einfluss von LPS alleine. Allerdings war dieser Unterschied nicht signifikant. Dennoch ist die Tatsache interessant, dass LPS bei gleichzeitiger Einwirkung von Allergen einen schwächeren Effekt auf die Sekretion von LL-37 zu haben scheint.

Das β -Defensin hBD-2 war ebenfalls in der BALF messbar, veränderte sich nach LPS- oder NaCl-Stimulation aber kaum in seiner Konzentration.

Wie die Ergebnisse zeigen, hat die Einwirkung von LPS auf die Bronchialschleimhaut eine Entzündungsreaktion mit nachweislich erhöhten LL-37-Konzentrationen in der BALF zur Folge (Kap. 4.1.2). Dabei kann nicht differenziert werden, ob LL-37 vermehrt von Epithelzellen abgegeben oder von angelockten Neutrophilen freigesetzt wurde.

Die Einwirkung von Allergen auf die Bronchialschleimhaut induziert eine allergische Entzündung mit vermehrtem Influx von Zellen, neben eosinophilen auch von neutrophilen Granulozyten [86]. Dabei wird der Einstrom von Neutrophilen sogar weit vor dem Peak der Eosinophilen

beobachtet [86]. Da LL-37 vorwiegend von Neutrophilen sezerniert wird, kommt es vermutlich zu einer Freisetzung des AMP aus diesen Zellen, die im Rahmen der allergischen Entzündung in die Lunge wandern.

Es ist bekannt, dass das bakterielle Endotoxin LPS zu einer Induktion antimikrobieller Peptide, insbesondere der β -Defensine, in Epithelzellen führt [14;128]. An der Regulation der Expression von hBD-2 sind der Transkriptionsfaktor NF- κ B [136] und Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (z.B. Raf-MEK1/2-ERK) beteiligt [90]. Allerdings ließ sich in der hier durchgeführten Untersuchung keine Induktion der hBD-2-Sekretion durch die topische Stimulation mit Lipopolysacchariden nachweisen (Kap. 4.1.2) und somit nicht mit den Erkenntnissen aus der Literatur in Einklang bringen.

Auch das Cathelicidin LL-37/h-CAP-18 wird durch Produkte Gram-negativer und Gram-positiver Bakterien, wie LPS und LTA (Lipoteichonsäuren), induziert [94]. Bei der Induktion von LL-37 spielt die über den aktivierten Toll-like-Rezeptor-2 hervorgerufene Expression des Vitamin-D-Rezeptors (VDR) und des Vitamin-D₁-Hydroxylase-Gens eine Rolle [83]. Zudem induziert LPS die Expression entsprechender Zytokine, insbesondere IL-8, die für den Influx von Neutrophilen als entscheidende Quelle von LL-37 verantwortlich sind [94;128].

Interessanterweise ist die stimulierende Wirkung von LPS auf die Sekretion von LL-37 bei gleichzeitigem Einfluss von Allergen tendenziell vermindert. Es ist möglich, dass bei der kombinierten Einwirkung von LPS und Allergen die über den Th-2-Weg induzierten Zytokine die Sekretion von LL-37 inhibieren. Es wurde bereits beschrieben, dass Th-2-Zytokine, wie z.B. IL-4 und IL-13, einen hemmenden Effekt auf die Expression von antimikrobiellen Peptiden haben [95] und diese bei atopischen Erkrankungen in verminderter Konzentration vorliegen [15;95;98]. Die Suppression der Immunantwort auf das LPS durch die allergische Entzündung könnte eine Erklärung für die erhöhte Prävalenz von Infekten im Rahmen von atopischen Erkrankungen sein.

Trotz der gegenüber der Norm erhöhten AMP-Spiegel gehen chronische Erkrankungen der Atemwege, wie das Asthma bronchiale, die COPD oder die Zystische Fibrose mit einer erhöhten Anfälligkeit gegenüber respiratorischen Infekten einher. Dabei stellt sich die Frage, ob das lokale Abwehrsystem durch bestimmte Faktoren beeinträchtigt wird. Zugleich findet sich bei diesen Erkrankungen häufig eine vermehrte

Produktion von Mukus. Ursachen hierfür sind eine Hypersekretion von Muzinen, z.B. getriggert durch Entzündung, oder die Retention von Mukus in den Atemwegen durch gestörten mukoziliären Transport.

Mukus spielt aufgrund seiner Interaktion mit zahlreichen Substanzen eine wichtige Rolle bei der Abwehr des Respirationstrakts. Chronische Reize wie der Einfluss von Zigarettenrauch oder die dauerhafte Besiedelung der Luftwege mit Bakterien verursachen eine Hyperplasie und Hypersekretion der Becherzellen [88;106]. Verschiedene Entzündungsmediatoren wie Interleukine [25;47;66], neutrophile Elastase [139] oder bakterielle Produkte [34;94] stimulieren ebenfalls die Sekretion von Muzinen. Durch die Hypersekretion von Muzinen wird die Zusammensetzung des Mukus verändert und er wird visköser. Dies beeinträchtigt den mukoziliären Transport und führt zur Retention von Mukus in den Atemwegen. Die retinierten Schleimplaques bieten nicht nur einen Nährboden für chronische bakterielle Infektionen, sondern beeinflussen zudem die Abwehrfunktion antimikrobieller Substanzen in diesen Sekreten.

LL-37 und Muzin interagieren elektrostatisch

Neben Muzinen werden auch antimikrobielle Peptide von den Epithelzellen abgegeben und finden sich ebenfalls in den viskösen Sekreten. Die starke gegensätzliche Ladung der kationischen antimikrobiellen Peptide und der negativ geladenen Muzine sowie ihr gemeinsames Vorkommen in den Atemwegsflüssigkeiten macht eine elektrostatische Wechselwirkung der beiden Moleküle wahrscheinlich.

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob Muzine im Mukus der Atemwege mit antimikrobiellen Peptiden, exemplarisch mit dem Cathelizidin LL-37, interagieren und dadurch das lokale Abwehrsystem der Lunge beeinflussen. Die elektrostatische Interaktion von LL-37 und Muzin wurde mit einem ELLA und in der nativen PAGE nachgewiesen.

Für den Nachweis der Bindung mit dem ELLA wurde eine Mikrotiterplatte mit LL-37 beschichtet und mit Muzin inkubiert (Kap. 3.4.2).

Muzin bindet nachweislich besser an eine mit dem AMP vorbeschichtete Platte als an eine unbeschichtete Kontroll-Platte. Diese Interaktion lässt sich durch die Einwirkung von Kochsalz behindern, was für eine Interaktion auf der Basis von elektrostatischen Kräften spricht.

Mit der PAGE (Kap. 3.5) sollte geprüft werden, ob aufgrund der elektrostatischen Interaktion der beiden Proteine das positiv geladene LL-37 bei seiner Wanderung durch das Gel von dem hochmolekularen anionischen Muzin zurückgehalten wird. Dies ist nur möglich, wenn die Proteine, wie in der nativen PAGE, in ihrer natürlichen Ladung nicht beeinträchtigt und in der Gelelektrophorese nach Ladung und Größe aufgetrennt werden. In der SDS-PAGE wandern dagegen alle Proteine an SDS gebunden zur Anode und werden nur nach ihrer Größe aufgetrennt.

Unter der Annahme, dass die elektrostatische Interaktion von Muzin und LL-37 deren Verhalten in der Gelelektrophorese beeinflusst, kann dies nur in der nativen PAGE der Fall sein, denn in der SDS-PAGE dürfte aufgrund der veränderten Ladung der Proteine die Interaktion nicht mehr bestehen.

Dies hat sich in den Ergebnissen bestätigt: In der SDS-PAGE wanderte das mit Muzin inkubierte LL-37 direkt neben der unbehandelten Kontrolle, in der nativen PAGE hingegen lief das sonst kationische AMP entgegen seiner natürlichen Ladung zur Anode (Kap. 4.2.2).

Dies ist als weiterer Nachweis für eine auf elektrostatischen Kräften basierende Interaktion zu sehen, die durch die denaturierenden Eigenschaften des SDS aufgehoben wird.

Allerdings handelt es sich hierbei um keine spezifische Bindung. Es ist bereits beschrieben, dass LL-37 mit anderen Proteinen wie Glykosaminoglykanen [13] oder Alginate [23] sowie sogar mit Nukleinsäuren wie DNA [140] Bindungen dieser Art eingeht. Das Cathelizidin LL-37 ist als kationisches, noch dazu sehr klebriges Molekül, zu solchen Interaktionen prädisponiert. Es handelt sich daher bei der Interaktion von LL-37 und Muzin ebenfalls um eine rein unspezifische Bindung, basierend auf elektrostatischen Kräften. Diese ist für eine Akkumulation des AMPs im Mukus der Atemwege verantwortlich.

Um zu zeigen, dass LL-37/hCAP-18 auch in humanen Atemwegssekreten mit Muzinen interagiert, wurden 28 BALF-Proben von Individuen ohne entzündliche Erkrankung der Atemwege zusammengegeben und analysiert. Hierfür wurden die Proben durch eine Filtermembran mit einer Porengröße von 100.000 Dalton zentrifugiert und LL-37/hCAP-18 und Muzin in beiden Fraktionen, dem zähen Überstand und der durch die Membran gepressten Flüssigkeit, bestimmt

(Kap. 4.5.1). Wie zu erwarten, war Muzin von der Membran zurückgehalten worden und vor allem in der oberen Fraktion zu finden. Doch ließ sich zeigen, dass auch das Cathelizidin LL-37 trotz seiner geringen molekularen Größe, aufgrund welcher es problemlos die Membran hätte passieren können, im zähen Überstand mit dem zurückgehaltenen Muzin höher konzentriert war als in der durchgetretenen Flüssigkeit. Das bedeutet, dass LL-37/hCAP-18 auch *in vivo* in den Atemwegssekreten vermehrt an Muzin gebunden vorliegt und mit diesem akkumuliert.

Muzin induziert eine α -Helix in LL-37

Anschließend wurde der Frage nachgegangen, ob die elektrostatische Interaktion der beiden Proteine Einfluss auf die Sekundärstruktur des AMP LL-37 hat. Mit CD-spektroskopischen Konformationsanalysen von LL-37 in Gegenwart von Muzin konnte gezeigt werden, dass das Glykoprotein in dem Cathelizidin konzentrationsabhängig eine α -Helix induziert.

Bei einer Konzentration von 10 μ M lag das antimikrobielle Peptid im Puffer noch in weitgehend ungeordneter Struktur vor, zeigte aber schon deutliche Tendenzen zur Annahme einer α -helikalen Konformation (α -Helizität ca. 30 %). In Muzinlösungen einer Konzentration um 100 μ mol/l formierte sich LL-37 gleicher Konzentration bereits zu einem Anteil von über 60 % zu einer α -helikalen Sekundärstruktur. Dieser Effekt ließ sich durch Erhöhung der Muzinkonzentration nur noch geringfügig steigern (Kap. 4.4).

Allerdings kann die α -Helizität von LL-37 nie mehr als 70-80 % erreichen, da der N-Terminus des Peptids keine fertige α -Helix bilden kann [35].

Das Cathelizidin LL-37 ist in seiner aktiven Form ein lineares α -helikales Peptid, das seine antimikrobielle Aktivität über die Interaktion mit Biomembranen von Mikroorganismen ausübt [99]. Seine Sekundärstruktur ist dabei abhängig von seiner Konzentration, dem pH und dem Salzgehalt bzw. der Konzentration starker Anionen des Mediums [67]. In höheren Konzentrationen lagert sich LL-37 zu Oligomeren zusammen, was in dem AMP ebenfalls eine α -Helix-Konformation induziert. Die Konzentration des Peptids, ab welcher

dieses nicht mehr in einer ungeordneten Sekundärstruktur, sondern dominierend in einer Helix vorliegt, ist in der Literatur kontrovers beschrieben. So soll LL-37 allein im Puffer bei 40 μM noch weitgehend unformiert vorliegen [67] oder bereits bei 10 μM die Tendenz zur Annahme einer α -Helix zeigen [57]. Letzteres deckt sich mit den Ergebnissen in dieser Arbeit.

Die Tatsache, dass die Einwirkung von Anionen jeglicher Art eine α -Helix in LL-37 induziert, ist ebenfalls nicht überraschend. Das AMP LL-37 interagiert in seiner bekanntesten biologischen Funktion elektrostatisch mit anionischen Membranen von Mikroorganismen (Mechanismus s. Kap. 1.2.2). Bei der Anlagerung richtet sich das Molekül entsprechend so aus, dass sich die polaren Reste zur Membran hin und die unpolaren von ihr weg wenden. Dabei bildet sich physiologischerweise eine α -Helix aus, was schließlich Voraussetzung für die Penetration der Membran und die Zerstörung der Zelle ist.

Ähnliches findet auch bei der Interaktion von LL-37 mit geladenen Molekülen oder Ionen statt. Bei zunehmender Ionen-Konzentration der Lösung wird es für das Peptid immer unbequemer seine hydrophoben Reste dem polaren Medium zuzuwenden und es bildet Sekundärstrukturen aus und aggregiert zu Oligomeren.

Es ist denkbar, dass sich auch bei der elektrostatischen Interaktion mit Muzin alle positiv geladenen Anteile des kationischen AMPs dem Anion zuwenden, wobei es seine hydrophoben Reste dem polaren Medium aussetzen müsste. Um dies zu vermeiden, formiert sich das Peptid in einer α -Helix und umschließt seine unpolaren Reste im Inneren der Struktur.

Daneben wirken auch andere anionische Proteine, z.B. Polysaccharide wie Alginat [57], in gleicher Weise auf das Cathelizidin LL-37 und auf andere kationische antimikrobielle Peptide [23] ein und induzieren eine α -helikale Konformation.

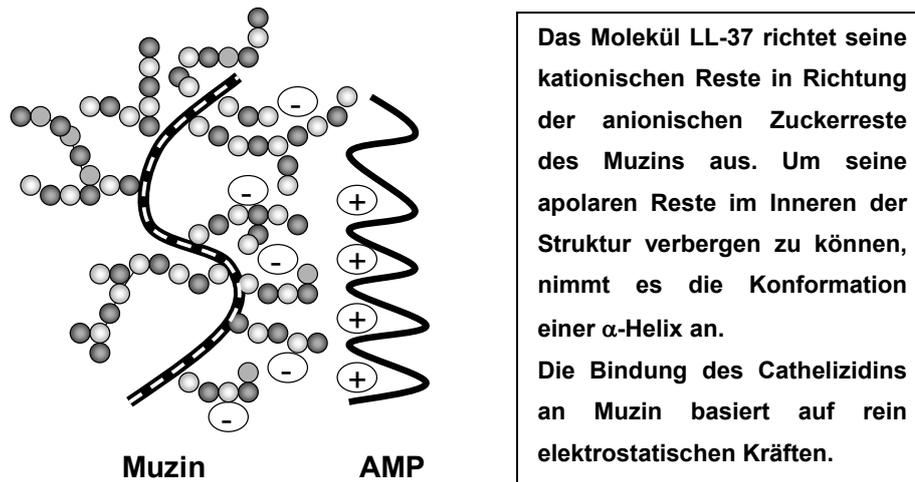


Abb. 19: Muzin induziert eine α -Helix in LL-37.

Die elektrostatische Interaktion zwischen Muzin und LL-37 hat Einfluss auf dessen antimikrobielle Aktivität

Interessanterweise verliert LL-37 trotz der Induktion seiner biologisch aktiven Form durch die Interaktion mit Muzin seine antimikrobielle Aktivität.

In den antimikrobiellen Assays mit *Pseudomonas aeruginosa* und *Streptococcus pneumoniae* ließ sich zeigen, dass die antimikrobielle Aktivität von LL-37 in Lösungen mit hohen Muzinkonzentrationen inhibiert war, in Anwesenheit geringerer Mengen Muzin hingegen nicht mehr. Durch Erhöhung der LL-37-Konzentration konnte trotz Vorliegen relevanter Muzinmengen wieder eine antimikrobielle Wirkung erreicht werden (Kap. 4.3).

Es wurde bereits beschrieben, dass LL-37 elektrostatisch mit anionischen Makromolekülen wie DNA oder Glykosaminoglykanen interagiert und diese Interaktion einen negativen Einfluss auf seine antimikrobielle Aktivität hat [13;140]. Außerdem wurde gezeigt, dass die Interaktion mit anionischen bakteriellen Polysacchariden, insbesondere Alginate, die biologisch aktive α -Helix in LL-37 induziert, was auch hier mit einem Funktionsverlust einhergeht [57].

Möglicherweise blockiert das anionische Glykoprotein durch die elektrostatische Bindung die für die Interaktion mit Bakterienmembranen oder für andere antimikrobiell wirksame Mechanismen notwendigen Bindungsstellen des Peptids. Wenn LL-37 an ein Muzinmolekül

gebunden hat, steht es für keine weitere Interaktion zur Verfügung. Dies erklärt auch die Tatsache, dass der Effekt der Inhibition der antimikrobiellen Aktivität von LL-37 von der Konzentration der beiden Bindungspartner abhängig ist. Das Verhältnis der beiden Proteine in einer Lösung ist somit entscheidend: Übersteigt die Menge an vorliegendem Muzin die des AMPs erheblich, wird alles LL-37 daran gebunden und steht nicht mehr für die Interaktion mit Biomembranen zur Verfügung. Folglich kommt es zum Funktionsverlust. Bei ausreichend hoher Konzentration des AMPs sind die unspezifischen „Bindungsstellen“ des Glykoproteins abgesättigt und es ist genug freies LL-37 für die Abtötung von Mikroorganismen vorhanden. Dies erklärt einen funktionellen Mangel von antimikrobiellen Peptiden bei Erkrankungen der Atemwege, bei denen dieses Verhältnis verschoben ist.

Die Interaktion von LL-37 und Muzin hat klinische Relevanz für die lokale Immunabwehr der Atemwege

Sowohl das AMP LL-37 als auch Muzine sind wichtige Bestandteile der Sekrete der Atemwege. Beide kommen in den die Epithelzelloberfläche bedeckenden Flüssigkeiten vor und leisten, wenn auch auf ganz unterschiedliche Weise, einen Beitrag zur unspezifischen Immunabwehr der Atemwege.

Muzine haben aufgrund ihrer negativen Ladung und den Kohlenhydratresten in ihren Seitenketten eine hohe Affinität zu den verschiedensten Substanzen. Diese Tendenz zur Adhärenz ist eine wichtige Eigenschaft für das Binden von Fremdkörpern und deren Abtransport aus den Atemwegen. Das humane Cathelizidin LL-37 ist dagegen ein antimikrobielles Peptid, das über die Interaktion mit Biomembranen in der Lage ist, pathogene Mikroorganismen abzutöten.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass LL-37 sowohl *in vitro* als auch in humanen Atemwegssekreten mit Muzinen interagiert. Es haftet in BALF-Proben gesunder Individuen an Muzin und reichert sich in hochviskösen Muzinplaques, wie sie z.B. bei der Zystischen Fibrose in den Atemwegen vorkommen, in hohen Konzentrationen an (Kap. 4.5).

Es wäre zu erwarten, dass die verschiedenen Abwehrmechanismen von LL-37 und Muzin synergistisch miteinander im Einklang stehen und sich AMPs im Mukus anreichern, um dort ihre antimikrobielle Aktivität auf die

darin immobilisierten Pathogene auszuüben. Unter diesem Gesichtspunkt scheint es kontrovers, dass die Interaktion mit Muzin die antimikrobielle Wirksamkeit des AMPs stattdessen beeinträchtigt.

Allerdings ist das Cathelizidin nicht sehr spezifisch in seiner Bindung an Phosphorlipide und hat in hohen Konzentrationen auch einen zytotoxischen Effekt auf eukaryote Zellen [34]. Somit kann eine Inhibition von LL-37, insbesondere wenn es in sehr hohen Konzentrationen vorliegt (z.B. CF-Sputum max. 30 mg/ml, s. Kap. 4.5.2), biologisch auch von Vorteil sein. Das umliegende Gewebe wird dadurch vor einer Schädigung durch eigenes LL-37 bewahrt.

Vor allem ist jedoch zu bedenken, dass in Atemwegssekreten gesunder Individuen mit „normalen“ Konzentrationen von LL-37/hCAP-18 und Muzinen LL-37 trotz der Anwesenheit der Muzine antimikrobiell aktiv ist. Das weist darauf hin, dass das Verhältnis der beiden Proteine in den Atemwegsflüssigkeiten zueinander für eine funktionstüchtige Immunabwehr entscheidend ist. Ist dieses Verhältnis zugunsten der Muzine gestört, verliert LL-37 seine antimikrobielle Wirkung, was einen Funktionsverlust der lokalen Immunabwehr der Lunge bedeutet. Klinische Relevanz hat die Inhibition von LL-37 im Mukus der Atemwege wohl dann, wenn eine Imbalance der beiden Proteine in den Atemwegsflüssigkeiten vorliegt.

Dies ist zum einen Folge einer chronischen Hypersekretion von Muzinen, z.B. im Rahmen eines chronischen Entzündungsreizes und beruht zum anderen auf dem gestörten mukoziliären Transport mit Retention von Mukus in den Atemwegen. Dabei stellen die chronische Infektion und der gestörte mukoziliäre Transport einen Teufelskreis dar. Durch die beeinträchtigte Entfernung von Mukus aus den Atemwegen können sich chronische bakterielle Infektionen etablieren. Der daraus resultierende permanente Entzündungsreiz stimuliert neben der Expression von antimikrobiellen Peptiden die Hypersekretion von Muzinen, was die Sekrete noch visköser macht und zu ihrer Retention in den Atemwegen führt.

Bei chronischen Erkrankungen wie der Zystischen Fibrose oder der COPD ist der mukoziliäre Transport gestört und es kommt zur Retention von Mukus in den Bronchien [88;152]. Da der unspezifische Abwehrmechanismus der „mukoziliären Clearance“ nur noch eingeschränkt funktioniert, führt dies zu einer erhöhten Anfälligkeit

gegenüber akuten und chronischen Infekten [153;26]. Der zusätzliche Ausfall der antimikrobiellen Aktivität von LL-37, wie gegebenenfalls auch die anderer kationischer AMPs, könnte die Anfälligkeit gegenüber akuten und die Hartnäckigkeit chronischer Infektionen der Luftwege erhöhen. Das betrifft im Wesentlichen alle Erkrankungen des Respirationstrakts, die mit einer Hypersekretion oder Retention von Muzin einhergehen. Dies soll am Beispiel der Zystischen Fibrose noch näher erläutert werden.

Bei der Zystischen Fibrose (Mukoviszidose) ist die Flüssigkeitssekretion des respiratorischen Epithels aufgrund der Mutation des CFTR-Kanals stark vermindert, was die Sekrete der Atemwege hochviskös macht (Kap. 1.4). Bestimmte Bakterien, z.B. *Pseudomonas aeruginosa*, *Haemophilus influenzae* und *Staphylococcus aureus*, können in diesen Schleimplaques überleben und sich vermehren [145;87]. So können sich mit Fortschreiten der Erkrankung chronische Infektionen in den Atemwegen etablieren, was Auswirkungen auf die lokale Immunabwehr hat.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden in Sputum-Proben von Patienten mit Zystischer Fibrose stark erhöhte Konzentrationen von Muzinen sowie des Cathelizidins LL-37/h-CAP-18 gefunden (Kap. 4.5.2).

Es wurde bereits beschrieben, dass bei CF-Patienten in den Sekreten der Atemwege LL-37/hCAP-18 entzündungsabhängig erhöht ist und mit der Schwere der Lungenerkrankung korreliert [24]. Auch Muzin liegt in diesen Sekreten in erhöhten Konzentrationen vor [152]. Ob bei der Mukoviszidose tatsächlich eine Hypersekretion von Mukus mit einer gesteigerten Sekretion von Muzinen besteht, wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Auf der einen Seite soll die Hyper- und Metaplasie der Becherzellen zu einer gesteigerten Sekretion von MUC5AC führen [48], doch auf der anderen ist die Konzentration von MUC5AC und MUC5B gegenüber gesunden Individuen vermindert und die erhöhte Viskosität des Mukus eher auf die darin enthaltene DNA zurückzuführen [55]. Denn neben den Muzinen sind bei der Mukoviszidose auch Nukleinsäuren aus im entzündeten Gewebe zugrunde gegangen Neutrophilen für die hochviskösen Sekrete verantwortlich. Dabei ist sogar wahrscheinlich, dass kationische Peptide zur Stabilisierung der aus DNA gebildeten hochmolekularen Komplexe beitragen [129].

Auch chronische Infektion und Entzündung, wie sie bei der Zystischen Fibrose regelhaft vorkommen, induzieren eine Hypersekretion von Muzinen [25;34;66;106]. Außerdem ist eine Ankonzentrierung von Muzinen schon aufgrund der starken Dehydrierung des Mukusgels anzunehmen.

In der vorliegenden Arbeit wurden in Sputum-Proben von Patienten mit Zystischer Fibrose gegenüber Atemwegssekreten gesunder Individuen stark erhöhte Konzentrationen von Muzinen nachgewiesen. Es ist wahrscheinlich, dass das Verhältnis von Muzinen zu antimikrobiellen Peptiden in diesem Fall beeinträchtigt ist. Somit sind ein Großteil der antimikrobiellen Peptide an überschüssiges Muzin gebunden und stehen damit der Immunabwehr nicht mehr zur Verfügung.

In diesem Zusammenhang lässt sich die Inhibition des humanen Cathelizidins LL-37 durch eine Interaktion mit Muzinen als eine Erklärung für die verminderte Effektivität der AMPs in Sekreten von CF-Patienten und eine damit verbundene erhöhte Anfälligkeit gegenüber akuten und chronischen Infektionen interpretieren.

Ausblick

Die Erkenntnisse der vorliegenden Arbeit deuten auf ein komplexes System der Immunabwehr in den Atemwegen hin. Neben mechanischen und zellulären Abwehrmechanismen liegen verschiedene antimikrobielle Substanzen in den Atemwegsflüssigkeiten vor, die sich in ihrer Wirkungsweise überlappen, ergänzen und offenbar auch modulieren. Es handelt sich um ein feinreguliertes System, für dessen Funktionsfähigkeit das Verhältnis der einzelnen Substanzen von entscheidender Bedeutung ist. Ist dies aus dem Gleichgewicht geraten, wird die lokale Immunabwehr beeinträchtigt. Es ist davon auszugehen, dass es noch weitere Interaktionen zwischen den einzelnen Komponenten der Atemwegsflüssigkeiten gibt, deren Imbalancen ebenfalls einen negativen Effekt auf ihre antimikrobiellen Eigenschaften haben.

Das humane Cathelizidin LL-37 ist ein sehr effektives antimikrobielles Peptid, das einen wichtigen Beitrag zur Abwehr in den Atemwegen leistet. Allerdings zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit auch, dass LL-37 leicht durch hochmolekulare, glykosylierte Substanzen wie Muzine in seiner Funktion inhibiert werden kann. Im Gegensatz zu den

Defensinen, die über drei Disulfidbrücken stabilisiert werden, hat LL-37 als lineares α -helikales Peptid eine instabilere Struktur und interagiert aufgrund seiner Tendenz zur Adhärenz mit sämtlichen Molekülen. Dies macht es besonders anfällig für Imbalancen der Komponenten des Gesamtsystems der lokalen Immunabwehr.

Darüber hinaus wird die Bedeutung eines intakten mukoziliären Apparates ersichtlich. Eine Behinderung dieses mechanischen Abwehrsystems bedeutet nicht nur den Verlust der Elimination von Pathogenen aus den Atemwegen und die Etablierung chronischer Infektionen, sondern bedeutet auch den Verlust weiterer antimikrobieller Faktoren der lokalen Immunabwehr.

Unter diesem Gesichtspunkt ist die Wiederherstellung der natürlichen Systeme in den Atemwegen ein erfolgversprechendes Therapiekonzept zur Bekämpfung respiratorischer Infektionen bei chronischen Lungenerkrankungen.

6. Zusammenfassung

Der Respirationstrakt steht in engem Kontakt mit seiner Umwelt und potentiellen Pathogenen. Der für die mechanische Reinigung bedeutende mukoziliäre Apparat besteht aus dem Flimmerepithel und viskösen Sekreten, in denen Fremdkörper gebunden und durch Schlag der Zilien in Richtung Oropharynx transportiert werden. Der makromolekulare Hauptbestandteil des Mukus der Atemwege sind Muzine, hochmolekulare, anionische Proteine mit stark glykosylierten Seitenketten, die aufgrund ihrer Ladung und komplexen Struktur leicht verschiedene Substanzen binden können. Bei der lokalen Immunabwehr des Respirationstrakts spielen antimikrobielle Peptide (AMPs) eine wichtige Rolle. AMPs sind niedermolekulare, kationische Oligo- bis Polypeptide, die über ihre Interaktion mit Biomembranen die Lyse eines breiten Spektrums mikrobieller Zellen herbeiführen. Darüber hinaus fungieren sie als Entzündungsmediatoren, Induktoren von Angiogenese und Wundheilung und chemotaktische Faktoren. In den Atemwegen werden zwei Familien von antimikrobiellen Peptiden exprimiert: Die Defensine und die Cathelizidine. Das humane Cathelizidin LL-37/hCAP-18 liegt in seiner biologisch aktiven Form in einer α -helikalen Konformation vor, abhängig von seiner Konzentration sowie pH und Salzgehalt des Puffers. Bei neutralem pH ist es stark positiv geladen.

Das Ziel dieser Arbeit war, die Interaktion des kationischen Cathelizidins LL-37 mit hochmolekularem anionischen Muzin sowie deren Auswirkungen auf die Sekundärstruktur und die antimikrobielle Funktion des Peptids zu untersuchen. Da beide Proteine in den die Bronchialschleimhaut bedeckenden Flüssigkeiten vorkommen und gegensätzlich geladen sind, ist eine elektrostatische Wechselwirkung zwischen ihnen anzunehmen. Zusätzlich wurden AMPs in Abhängigkeit von akuten Entzündungsprozessen in humanen Atemwegssekreten nachgewiesen.

Das Defensin hBD-2 und das Cathelizidin LL-37/hCAP-18 wurden quantitativ mit einem Enzym-linked Immunosorbent Assay (ELISA) und Western Blot in Proben bronchoalveolärer Lavage (BAL) von Patienten mit COPD, Asthma bronchiale und gesunder Individuen bestimmt. Die antimikrobiellen Peptide waren dabei im Rahmen akuter Entzündungen

erhöht. Mit einem Enzym-linked Lektinsorbent Assay (ELLA) und nativer Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) konnte die elektrostatische Bindung von LL-37 an Muzin nachgewiesen werden. Der Einfluss von Muzin auf die Sekundärstruktur von LL-37 wurde mittels Zirkulardichroismus-Messungen analysiert. Hier zeigte sich, dass die Anwesenheit von Muzin eine α -helikale Konformation des Peptids induziert. Anschließend wurden antimikrobielle Assays gegen *Pseudomonas aeruginosa* und *Streptococcus pneumoniae* durchgeführt, um die antimikrobielle Aktivität des Peptids in Gegenwart von Muzin zu untersuchen. Hierbei zeigte sich eine signifikante Inhibition der antimikrobiellen Aktivität von LL-37 in Abhängigkeit der Konzentrationen des Glykoproteins. Zur Klärung der Frage, ob LL-37 auch *in vivo* an muzinhaltige Atemwegsflüssigkeiten gebunden vorliegt, wurden Sputumproben von fünf Patienten mit Zystischer Fibrose und chronischer Infektion der Atemwege sowie BAL von Patienten ohne entzündlichen Prozess mittels ELISA und Western Blot analysiert. In den Proben von Patienten mit Zystischer Fibrose lagen stark erhöhte Konzentrationen sowohl von LL-37 als auch von Muzinen vor.

Bei der Abwehr der Atemwege handelt es sich um ein komplexes, feinreguliertes System, zu dessen Funktionsfähigkeit das Verhältnis der einzelnen Komponenten zueinander von entscheidender Bedeutung ist. So wirkt sich ein Ungleichgewicht von antimikrobiellen Peptiden und Muzinen in den Atemwegssekreten mit Überwiegen der Muzine nachteilig auf die antimikrobielle Aktivität der AMPs aus. Vermutlich werden durch elektrostatische Kräfte die relevanten kationischen Gruppen des AMPs an das Muzin gebunden und stehen damit nicht mehr für die Interaktion mit Mikroorganismen zur Verfügung.

Klinische Relevanz hat die Interaktion von LL-37 und Muzinen dann, wenn das Gleichgewicht dieser beiden Proteine in den Atemwegsflüssigkeiten gestört ist. Dies ist z.B. der Fall bei entzündlichen und chronischen Erkrankungen der Atemwege, wie der COPD oder der Zystischen Fibrose, die zu einer Hypersekretion von Muzinen und Retention von Mukus führen. Gleichzeitig gehen diese Erkrankungen mit einer erhöhten Anfälligkeit gegenüber respiratorischen Infekten einher. Das gestörte Verhältnis von AMPs und Muzinen könnte die Prädisposition gegenüber Infektionen der Atemwege begünstigen.

7. Literaturverzeichnis

1. Aarbiou J., Verhoosel R.M., van Wetering S., de Boer W.I., van Krieken J.H., Litvinov S.V., Rabe K.F., Hiemstra P.S., **Neutrophil defensins enhance lung epithelial wound closure and mucin gene expression *in vitro***, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 2004, 30(2):193-201
2. Agerberth B., Charo J., Werr J., Olsson B., Idali F., Lindbom L., Kiessling R., Jörnvall H., Wigzell H., Gudmundsson G.H., **The human antimicrobial and chemotactic peptides LL-37 and α -defensins are expressed by specific lymphocyte and monocyte populations**, *Blood* 2000, 96:3086-3093
3. Agerberth B., Grunewald J., Castanos-Velez E., Olsson B., Jörnvall H., Wigzell H., Eklund A., Gudmundsson G.H., **Antibacterial components in bronchoalveolar lavage fluid from healthy individuals and sarcoidosis patients**, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1999, 160(1):283-290
4. Agerberth B., Gunne H., Odeberg J., Kogner P., Boman H.G., Gudmundsson G.H., **FALL-39, a putative human peptide antibiotic, is cysteine-free and expressed in bone-marrow and testis**, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1995, 92:195-199
5. Ahmad M., Piludu M., Oppenheim F.G., Helmerhorst E.J., Hand A.R., **Immunocytochemical localization of histatins in human salivary glands**, *J. Histochem. Cytochem.* 2004, 52(3):361-370
6. Amitani R., Wilson R., Rutman A., Read R., Ward C., Burnett D., Stockley R.A., Cole P.J., **Effects of human neutrophil elastase and *Pseudomonas aeruginosa* proteinases on human respiratory epithelium**, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 1991, 4(1):26-32
7. Armant M.A., Fenton M.J., **Toll-like receptors: a family of pattern-recognition receptors in mammals**, *Genome Biol.* 2002, 3(8):reviews 3011.1-3011.6
8. Ashitani J., Matsumoto N., Nakazato M., **Elevated levels of antimicrobial peptides in bronchoalveolar lavage fluid in patients with chronic eosinophilic pneumonia**, *Respiration* 2007, 74(1):69-75
9. Ashitani J., Mukae H., Hiratsuka T., Nakazato M., Kumamoto K., Matsukura S., **Elevated levels of alpha-defensins in plasma and BAL**

fluid of patients with active pulmonary tuberculosis, *Chest* 2002, 121(2):519-526

10. Ashitani J., Mukae H., Nakazato M., Ihi T., Mashimoto H., Kadota J., Kohno S., Matsukura S., **Elevated concentrations of defensins in bronchoalveolar lavage fluid in diffuse panbronchiolitis**, *Eur. Respir. J.* 1998, 11:104-111

11. Bals R., Wang X., Wu Z., Freeman T., Bafna V., Zasloff M., Wilson J.M., **Human β -defensin-2 is a salt-sensitive peptide antibiotic expressed in human lung**, *J. Clin. Invest.* 1998, 102:874-880

12. Bals R., Wang X., Zasloff M., Wilson J.M., **The peptide antibiotic LL-37/hCap-18 is expressed in epithelia of the human lung where it has broad antimicrobial activity at the airway surface**, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1998, 95:9541-9546

13. Baranska-Rybak W., Sonesson A., Nowicki R., Schmidtchen A., **Glycosaminoglycans inhibit the antibacterial activity of LL-37 in biological fluids**, *J. Antimicrob. Chemother.* 2006, 57(2):260-265

14. Becker M.N., Diamond G., Verghese M.W., Randell S.H., **CD14-dependent lipopolysaccharide-induced β -defensin-2 expression in human tracheobronchial epithelium**, *J. Biol. Chem.* 2000, 275(38):29731-29736

15. Beisswenger C., Kändler K., Hess C., Garn H., Felgentreff K., Wegmann M., Renz H., Vogelmeier C., Bals R., **Allergic airway inflammation inhibits pulmonary antibacterial host defense**, *J. Immunol.* 2006, 177:1833-1837

16. Bensch K.W., Raida M., Mägert H.-J., Schulz-Knappe P., Forssmann W.G., **hBD-1: a novel β -defensin from human plasma**, *FEBS Lett.* 1995, 368:331-335

17. Blasi F., Tarsia P., Aliberti S., **Strategic targets of essential host-pathogen interactions**, *Respiration* 2005, 72(1):9-25

18. Bobek L.A., Situ H., **MUC7 20-Mer: investigation of antimicrobial activity, secondary structure, and possible mechanism of antifungal action**, *Antimicrob. Agents Chemother.* 2003, 47(2):643-652

19. Boucher R.C., **New concepts of the pathogenesis of cystic fibrosis lung disease**, *Eur. Respir. J.* 2004, 23:146-158

20. Bowdish D.M.E., Davidson D.J., Lau Y.E., Lee K., Scott M.G., Hancock R.E.W., **Impact of LL-37 on anti-infective immunity**, *J. Leucoc. Biol.* 2005, 77:451-459
21. Carlstedt I., Lindgren H., Sheehan J.K., **The macromolecular structure of human cervical-mucus glycoproteins**, *Biochem. J.* 1983, 213:427-435
22. Chan C., Burrows L.L., Deber C.M., **Alginate as an auxiliary bacterial membrane: binding of membrane-active peptides by polysaccharides**, *J. Peptide Res.* 2005, 65(3):343-351
23. Chan C., Burrows L.L., Deber C.M., **Helix induction in antimicrobial peptides by alginate in biofilms**, *J. Biol. Chem.* 2004, 279(37):38749-38754
24. Chen C.I.-U., Schaller-Bals S., Paul K.P., Wahn U., Bals R., **β -defensins and LL-37 in bronchoalveolar lavage fluid of patients with cystic fibrosis**, *J. Cyst. Fibros.* 2004, 3(1):45-50
25. Chen Y., Thai P., Zhao Y.-H., Ho Y.-S., DeSouza M.M., Wu R., **Stimulation of airway mucin gene expression by interleukin (IL)-17 through IL-6 paracrine/autocrine loop**, *J. Biol. Chem.* 2003, 278(19):17036-17043
26. Chmiel J.F., Davis P.B., **State of the Art: Why do the lungs of patients with cystic fibrosis become infected and why can't they clear the infection?** *Respir. Res.* 2003, 4:8
27. Cole A.M., Dewan P., Ganz T., **Innate antimicrobial activity of nasal secretions**, *Infect. Immun.* 1999, 67:3267-3275
28. Cole A.M., Liao H.-I., Stuchlik O., Tilan J., Pohl J., Ganz T., **Cationic polypeptides are required for antibacterial activity of human airway fluid**, *J. Immunol.* 2002, 169:6985-6991
29. Davies J., Carlstedt I., Nilsson A.-K., Hakansson A., Sabharwal H., van Alphen L., van Ham M., Svanborg C., **Binding of *Haemophilus influenzae* to purified mucins from the human respiratory tract**, *Infect. Immun.* 1995, 63(7):2485-2492
30. Davies J.R., Hovenberg H.W., Linden C.-J., Howard R., Richardson P.S., Sheehan J.K., Carlstedt I., **Mucins in airway secretions from healthy and chronic bronchitic subjects**, *Biochem. J.* 1996, 313:431-439

31. De Smet K., Contreras R., **Human antimicrobial peptides: defensins, cathelicidins and histatins**, *Biotechnol. Lett.* 2005, 27(18):1337-1347
32. DeMeo D.L., Silverman E.K., **α_1 -antitrypsin deficiency. 2: Genetic aspects of α_1 -antitrypsin deficiency: phenotypes and genetic modifiers of emphysema risk**, *Thorax* 2004, 59(3):259-264
33. Diamond G., Zasloff M., Eck H., Brasseur M., Maloy W.L., Bevins C.L., **Tracheal antimicrobial peptide, a cysteine-rich peptide from mammalian tracheal mucosa: peptide isolation and cloning of a cDNA**, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1991, 88:3952-3956
34. Dohrman A., Miyata S., Gallup M., Li J.-D., Chapelin C., Coste A., Escudier E., Nadel J., Basbaum C., **Mucin gene (*MUC 2* and *MUC 5AC*) upregulation by Gram-positive and Gram-negative bacteria**, *Biochim. Biophys. Acta* 1998, 1406(3):251-259
35. Dürr U.H.N., Sudheendra U.S., Ramamoorthy A., **LL-37, the only human member of the cathelicidin family of antimicrobial peptides**, *Biochem. et Biophys. Acta* 2006, 1758:1408-1425
36. Elliott P.R., Bilton D., Lomas D.A., **Lung polymers in α_1 -antitrypsin deficiency-related emphysema**, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 1998, 18:670-674
37. Erdag G., Morgan J.R., **Interleukin-1 α and Interleukin-6 enhance the antibacterial properties of cultured composite keratinocyte grafts**, *Ann. Surg.* 2002, 235(1):113-124
38. Ernst W.A., Thoma-Uszynski S., Teitelbaum R., Ko C., Hanson D.A., Clayberger C., Krensky A.M., Leippe M., Bloom B.R., Ganz T., Modlin R.L., **Granulysin, a T-cell product, kills bacteria by altering membrane permeability**, *J. Immunol.* 2000, 165:7102-7108
39. Erpenbeck V.J., Hagenberg A., Dulkys Y., Elsner J., Bälder R., Krentel H., Discher M., Braun A., Krug N., Hohlfeld J.M., **Natural porcine surfactant augments airway inflammation after allergen challenge in patients with asthma**, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2004, 169(5):578-586
40. Fleming A., **On a remarkable bacteriolytic element found in tissues and secretions**, *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 1922, 93(653):306-317
41. Frohm M., Agerberth B., Ahangari G., Stahle-Bäckdahl M., Liden S., Wigzell H., Gudmundsson G.H., **The expression of the gene coding**

for the antibacterial peptide LL-37 is induced in human keratinocytes during inflammatory disorders, *J. Biol. Chem.* 1997, 272(24):15258-15263

42. Gadek J.E., Fells G.A., Zimmerman R.L., Crystal R.G., **Role of connective tissue proteases in the pathogenesis of chronic inflammatory lung disease**, *Environmen. Health Perspec.* 1984, 55:297-306

43. Ganz T., **Hepcidin – a peptide hormone at the interface of innate immunity and iron metabolism**, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2006, 306:183-198

44. Garcia J.-R.C., Krause A., Schulz S., Rodriguez-Jimenez F.-J., Klüver E., Adermann K., Forssmann U., Frimpong-Boateng A., Bals R., Forssmann W.-G., **Human β -defensin 4: a novel inducible peptide with a specific salt-sensitive spectrum of antimicrobial activity**, *FASEB J.* 2001, 15:1819-1821

45. **Genatlas**, Université Descartes Paris, <http://www.dsi.univ-paris5.fr/genatlas/>

46. Golec M., **Cathelicidin LL-37: LPS-neutralizing, pleiotropic peptide**, *Ann. Agric. Environ. Med.* 2007, 14(1):1-4

47. Gray T., Coakley R., Hirsh A., Thornton D., Kirkham S., Koo J.-S., Burch L., Boucher R., Nettlesheim P., **Regulation of MUC5AC mucin secretion and airway surface liquid metabolism by IL-1 β in human bronchial epithelia**, *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 2004, 286:320-330

48. Groneberg D.A., Eynott P.R., Oates T., Lim S., Wu R., Carlstedt I., Nicholson A.G., Chung K.F., **Expression of MUC5AC and MUC5B mucins in normal and cystic fibrosis lung**, *Respir. Med.* 2002, 96(2):81-86

49. Hansen G., **Das Th1/Th2 Paradigma in Asthma bronchiale**, *Monatsschr. Kinderheilkd.* 2001, 149:112-119

50. Harder J., Bartels J., Christophers E., Schröder J.-M., **A peptide antibiotic from human skin**, *Nature* 1997, 387(6636):861

51. Harder J., Bartels J., Christophers E., Schröder J.-M., **Isolation and characterization of human β -defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic**, *J. Biol. Chem.* 2001, 276:5707-5713

52. Harder J., Meyer-Hoffert U., Teran L.M., Schwichtenberg L., Bartels J., Maune S., Schröder J.-M., **Mucoid *Pseudomonas***

53. Hase K., Eckmann L., Leopard J.D., Varki N., Kagnoff M.F., **Cell differentiation is a key determinant of cathelicidin LL-37/humane cationic antimicrobial protein 18 expression by human colon epithelium**, *Infect. Immun.* 2002, 70(2):953-963
54. Hase K., Murakami M., Iimura M., Cole S.P., Horibe Y., Ohtake T., Obonyo M., Gallo R.L., Eckmann L., Kagnoff M.F., **Expression of LL-37 by human gastric epithelial cells as a potential host defense mechanism against *Helicobacter pylori***, *Gastroenterology* 2003, 125(6):1613-1625
55. Henke M.O., Renner A., Huber R.M., Seeds M.C., Rubin B.K., **MUC5AC and MUC5B mucins are decreased in cystic fibrosis airway secretions**, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 2004, 31(1):86-91
56. Henzler Wildman K.A., Lee D.-K., Ramamoorthy A., **Mechanism of lipid bilayer disruption by the human antimicrobial peptide, LL-37**, *Biochemistry.* 2003, 42(21):6545-6558
57. Herasimenka Y., Benincasa M., Mattiuzzo M., Cescutti P., Gennaro R., Rizzo R., **Interaction of antimicrobial peptides with bacterial polysaccharides from lung pathogens**, *Peptides* 2005, 26(7):1127-1132
58. Herr C., Shaykhiev R., Bals R., **The role of cathelicidin and defensins in pulmonary inflammatory diseases**, *Expert. Opin. Biol. Ther.* 2007, 7(9):1449-1461
59. Hiemstra P.S., Maassen R.J., Stolk J., Heinzl-Wieland R., Steffens G.J., Dijkman J.H., **Antibacterial activity of antileukoprotease**, *Infect. Immun.* 1996, 64:4520-4524
60. Hiratsuka T., Mukae H., Iiboshi H., Ashitani J., Nabeshima K., Minematsu T., Chino N., Ihi T., Kohno S., Nakazato M., **Increased concentrations of β -defensins in plasma and bronchoalveolar lavage fluid of patients with diffuse panbronchiolitis**, *Thorax* 2003, 58:425-430
61. Hiratsuka T., Nakazato M., Date Y., Ashitani J., Minematsu T., Chino N., Matsukura S., **Identification of human β -defensin-2 in respiratory tract and plasma and its increase in bacterial pneumonia**, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1998, 28;249(3):943-947

62. Hohlfeld J.M., Ahlf K., Enhorning G., Balke K., Erpenbeck V.J., Petschallies J., Hoymann H.G., Fabel H., Krug N., **Dysfunction of pulmonary surfactant in asthmatics after segmental allergen challenge**, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1999, 159(6):1803-1809
63. Hovenberg H.W., Davies J.R., Carlstedt I., **Different mucins are produced by the surface epithelium and the submucosa in human trachea: identification of MUC5AC as a major mucin from the goblet cells**, *Biochem. J.* 1996, 318:319-324
64. Ishimoto H., Mukae H., Date Y., Shimbara T., Mondal M.S., Ashitani J., Hiratsuka T., Kubo S., Kohno S., Nakazato M., **Identification of hBD-3 in respiratory tract and serum: the increase in pneumonia**, *Eur. Respir. J.* 2006, 27(2):253-260
65. Janoff A., **Elastases and emphysema. Current assessment of the protease-antiprotease hypothesis**, *Am. Rev. Respir. Dis.* 1985, 132(2):417-433
66. Jeffery P., Zhu J., **Mucin-producing elements and inflammatory cells**, *Novartis Found Symp.* 2002, 248:51-68
67. Johansson J., Gudmundsson G.H., Rottenberg M.E., Berndt K.D., Agerberth B., **Conformation-dependent antibacterial activity of the naturally occurring human peptide LL-37**, *J. Biol. Chem.* 1998, 273(6):3718-3724
68. Jones D.E., Bevins C.L., **Defensin-6 mRNA in human Paneth cells: implications for antimicrobial peptides in host defense of the human bowel**, *FEBS Lett.* 1993, 315:187-192
69. Jones D.E., Bevins C.L., **Paneth cells of the human small intestine express an antimicrobial peptide gene**, *J. Biol. Chem.* 1992, 267:23216-23225
70. Kao C.-Y., Chen Y., Thai P., Wachi S., Huang F., Kim C., Harper R.W., Wu R., **IL-17 markedly up-regulates β -defensin-2 expression in human airway epithelium via JAK and NF- κ B signalling pathways**, *J. Immunol.* 2004, 173:3482-3491
71. Kerem B., Rommens J.M., Buchanan J.A., Markiewicz D., Cox T.K., Chakravarti A., Buchwald M., Tsui L.C., **Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis**, *Science* 1989, 245(4922):1073-1080
72. Kim S.T., Cha H.E., Kim D.Y., Han G.C., Chung Y.-S., Lee Y.J., Hwang Y.J., Lee H.-M., **Antimicrobial peptide LL-37 is upregulated in**

chronic nasal inflammatory disease, *Acta Otolaryngol.* 2003, 123(1):81-85

73. King M., **Experimental models for studying mucociliary clearance**, *Eur. Respir. J.* 1998, 11:222-228

74. Kirkham S., Sheehan J.K., Knight D., Richardson P.S., Thornton D.J., **Heterogeneity of airway mucus: variations in the amounts and glycoforms of the major oligomeric mucins MUC5AC and MUC5B**, *Biochem. J.* 2002, 361:537-546

75. Koczulla R., von Degenfeld G., Kupatt C., Krötz F., Zahler S., Gloe T., Issbrücker K., Unterberger P., Zaiou M., Lebherz C., Karl A., Raake P., Pfosser A., Boekstegers P., Welsch U., Hiemstra P.S., Vogelmeier C., Gallo R.L., Clauss M., Bals R., **An angiogenic role for the human peptide antibiotic LL-37/hCAP-18**, *J. Clin. Invest.* 2003, 111(11):1665-1672

76. Koo S.-P., Bayer A.S., Yeaman M.R., **Diversity in antistaphylococcal mechanisms among membrane-targeting antimicrobial peptides**, *Infect. Immun.* 2001, 69(8):4916-4922

77. Kuver R., Klingspoor J.H., Osborne W.R., Lee S.P., **Mucus granule exocytosis and CFTR expression in gallbladder epithelium**, *Glycobiology* 2000, 10(2):149-157

78. Lamblin G., Degroote S., Perini J.-M., Delmotte P., Scharfman A., Davril M., Lo-Guidice J.-M., Houdret N., Dumur V., Klein A., Roussel P., **Human airway mucin glycosylation: a combinatorial of carbohydrate determinants which vary in cystic fibrosis.**, *Glycoconj. J.* 2001, 18(9):661-684

79. Lee P., Gildea T.R., Stoller J.K., **Emphysema in nonsmokers: alpha-1-antitrypsin deficiency and other causes**, *Cleve. Clin. J. Med.* 2002, 69(12): 928-936

80. Lehrer R.I., Barton A., Daher K.A., Harwig S.S.L., Ganz T., Selsted M.E., **Interaction of human defensins with *Escherichia coli*. Mechanism of bactericidal activity**, *J. Clin. Invest.* 1989, 84(2):553-561

81. Lehrer R.I., Lichtenstein A.K., Ganz T., **Defensins: antimicrobial and cytotoxic peptides of mammalian cells**, *Annu. Rev. Immunol.* 1993, 11:105-128

82. Lillehoj E.P., Kim K.C., **Airway mucus: its components and function**, *Arch. Pharm. Res.* 2002, 25(6):770-780

83. Liu P.T., Stenger S., Li H., Wenzel L., Tan B.H., Krutzig S.R., Ochoa M.T., Schaubert J., Wu K., Meinken C., Kamen D.L., Wagner M., Bals R., Steinmeyer A., Zügel U., Gallo R.L., Eisenberg D., Hewison M., Hollis B.W., Adams J.S., Bloom B.R., Modlin R.L., **Toll-like receptor triggering of a vitamin D-mediated human antimicrobial response**, *Science* 2006, 311:1770-1773
84. Llewellyn-Jones C.G., Lomas D.A., Carrell R.W., Stockley R.A., **The effect of the Z mutation on the ability of α_1 -antitrypsin to prevent neutrophil mediated tissue damage**, *Biochim. Biophys. Acta* 1994, 1227(1): 155-160
85. Lomas D.A., **Antitrypsin deficiency, the serpinopathies, and chronic obstructive pulmonary disease**, *Proc. Am. Thorac. Soc.* 2006, 3:499-502
86. Lommatzsch M., Julius P., Kuepper M., Garn H., Bratke K., Irmscher S., Luttmann W., Renz H., Braun A., Virchow J.C., **The course of allergen-induced leukocyte infiltration in human and experimental asthma**, *J. Allergy Clin. Immunol.* 2006, 118(1):91-97
87. Lyczak J.B., Cannon C.L., Pier G.B., **Lung infections associated with cystic fibrosis**, *Clin. Microbiol. Rev.* 2002, 15(2):194-222
88. Maestrelli P., Saetta M., Mapp C.E., Fabbri L.M., **Remodeling in response to infection and injury. Airway inflammation and hypersecretion of mucus in smoking subjects with chronic obstructive pulmonary disease**, *Am. J. Crit. Care Med.* 2001, 164(2):76-80
89. Matsui H., Randell S.H., Peretti S.W., Davis C.W., Boucher R.C., **Coordinated clearance of periciliary liquid and mucus from airway surfaces**, *J. Clin. Invest.* 1998, 102(6):1125-1131
90. Moon S.-K., Lee H.-Y., Li J.-D., Nagura M., Kang S.-H., Chun Y.-M., Linthicum F.H., Ganz T., Andalibi A., Lim D.J., **Activation of a Src-dependent Raf-MEK1/2-ERK signaling pathway is required for IL-1 α -induced upregulation of β -defensin 2 in human middle ear epithelial cells**, *Biochim. Biophys. Acta.* 2002, 1590(1-3):41-51
91. **Mucin Database**, Mucin biology group, Göteborg University, <http://www.medkem.gu.se/mucinbiology/databases/>
92. Mulgrew A.T., Taggart C.C., Lawless M.W., Greene C.M., Brantly M.L., O'Neill S.J., McElvaney N.G., **Z α_1 -antitrypsin polymerizes in the**

lung and acts as a neutrophil chemoattractant, *Chest* 2004, 125(5):1952-1957

93. Nakayama K., Jia Y.X., Hirai H., Shinkawa M., Yamaya M., Sekizawa K., Sasaki H., **Acid stimulation reduces bactericidal activity of surface liquid in cultured human airway epithelial cells**, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 2002, 26:105-113

94. Nell M.J., Tjabringa G.S., Vonk M.J., Hiemstra P.S., Grote J.J., **Bacterial products increase expression of the human cathelicidin hCAP-18/LL-37 in cultured human sinus epithelial cells**, *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2004, 42(2):225-231

95. Nomura I., Goleva E., Howell M.D., Hamid Q.A., Ong P.Y., Hall C.F., Darst M.A., Gao B., Boguniewicz M., Travers J.B., Leung D.Y.M., **Cytokine milieu of atopic dermatitis, as compared to psoriasis, skin prevents induction of innate immune response genes**, *J. Immunol.* 2003, 171:3262-3269

96. O'Neil D.A., Porter E.M., Elewaut D., Anderson G.M., Eckmann L., Ganz T., Kagnoff M.F., **Expression and regulation of the human beta-defensins hBD-1 and hBD-2 in intestinal epithelium**, *J. Immunol.* 1999, 163(12):6718-6724

97. Ogushi F., Fells G.A., Hubbard R.C., Straus S.D., Crystal R.G., **Z-type α_1 -antitrypsin is less competent than M1-type α_1 -antitrypsin as an inhibitor of neutrophil elastase**, *J. Clin. Invest.* 1987, 80:1366-1374

98. Ong P.Y., Ohtake T., Brandt C., Strickland I., Boguniewicz M., Ganz T., Gallo R.L., Leung D.Y.M., **Endogenous antimicrobial peptides and skin infections in atopic dermatitis**, *N. Engl. J. Med.* 2002, 347(15):1151-1160

99. Oren Z., Lerman J.C., Gudmundsson G.H., Agerberth B., Shai Y., **Structure and organization of the human antimicrobial peptide LL-37 in phospholipid membranes: relevance to the molecular basis for its non-cell-selective activity**, *Biochem. J.* 1999, 341:501-513

100. Parfrey H., Mahadeva R., Lomas D.A., **α -antitrypsin deficiency, liver disease and emphysema**, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2003, 35(7):1009-1014

101. Parmar J.S., Mahadeva R., Reed B.J., Farahi N., Cadwallader K.A., Keogan M.T., Bilton D., Chilvers E.R., Lomas D.A., **Polymers of α_1 -antitrypsin are chemotactic for human neutrophils. A new**

paradigm for the pathogenesis of emphysema, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 2002, 26(6):723-730

102. Pilette C., Durham S.R., Vaerman J.-P., Sibille Y., **Mucosal immunity in asthma and chronic obstructive pulmonary disease: a role for immunoglobulin A?**, *Proc. Am. Thorac. Soc.* 2004, 1(2):125-135

103. Porchet N., Aubert J.-P., **MUC genes: mucin or not mucin? That is the question**, *Med. Sci. (Paris)* 2004, 20 :569-574

104. Riordan J.R., Rommens J.M., Kerem B., Alon N., Rozmahel R., Grzelczak Z., Zielenski J., Lok S., Plavsic N., Chou J.L., **Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA**, *Science* 1989, 245(4922):1066-1073

105. Rogan M.P., Geraghty P., Greene C.M., O'Neill S.J., Taggart C.C., McElvaney N.G., **Antimicrobial proteins and polypeptides in pulmonary innate defence**, *Respir. Res.* 2006, 7:29

106. Rogers D.F., **Airway goblet cells: responsive and adaptable front-line defenders**, *Eur. Respir. J.* 1994, 7(9):1690-1706

107. Rommens J.M., Ianuzzi M.C., Kerem B., Drumm M.L., Melmer G., Dean M., Rozmahel R., Cole J.L., Kennedy D., Hidaka N., **Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping**, *Science* 1989, 245(4922):1059-1067

108. Rosenfeld Y., Papo N., Shai Y., **Endotoxin (LPS) neutralization by innate immunity host-defense peptides: peptides' properties and plausible modes of action**, *J. Biochem.* 2006, 281(3):1636-1643

109. Schaller-Bals S., Schulze A., Bals R., **Increased levels of antimicrobial peptides in tracheal aspirates of newborn infants during infection**, *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* 2002, 165:992-995

110. Schittek B., Hipfel R., Sauer B., Bauer J., Kalbacher H., Stevanovic S., Schirle M., Schroeder K., Blin N., Meier F., Rassner G., Garbe C., **Dermicidin: a novel human antibiotic peptide secreted by sweat glands**, *Nat. Immunol.* 2001, 2(12):1133-1137

111. Schröder J.M., Harder J., **Antimicrobial skin peptides and proteins**, *Cell Mol. Life Sci.* 2006, 63(4):469-486

112. Schutte B.C., McCray P.B. Jr., **β -defensins in lung host defense**, *Annu. Rev. Physiol.* 2002, 64:709-748

113. Schutte B.C., Mitros J.P., Bartlett J.A., Walters J.D., Jia H.P., Welsh M.J., Casavant T.L., McCray P.B. Jr., **Discovery of five**

- conserved β -defensin gene clusters using a computational search strategy**, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2002, 99(4):2129-2133
114. Scott M.G., Davidson D.J., Gold M.R., Bowdish D., Hancock R.E.W., **The human antimicrobial peptide LL-37 is a multifunctional modulator of innate immune responses**, *J. Immunol.* 2002, 169:3883-3891
115. Selsted M.E., Harwig S.S.L., Ganz T., Schilling J.W., Lehrer R.I., **Primary structures of three human neutrophil defensins**, *J. Clin. Invest.* 1985, 76:1436-1439
116. Shai Y., Oren Z., **From “carpet” mechanism to de-novo designed diastereomeric cell-selective antimicrobial peptides**, *Peptides* 2001, 22:1629-1641
117. Shaykhiev R., Bals R., **Interactions between epithelial cells and leukocytes in immunity and tissue homeostasis**, *J. Leukoc. Biol.* 2007, 82(1):1-15
118. Sheehan J.K., Oates K., Carlstedt I., **Electron microscopy of cervical, gastric and bronchial mucus glycoproteins**, *Biochem. J.* 1986, 239:147-153
119. Singh P.K., Jia H.P., Wiles K., Hesselberth J., Liu L., Conway B.-A.D., Greenberg E.P., Valore E.V., Welsh M.J., Ganz T., Tack B.F., McCray P.B. Jr., **Production of β -defensins by human airway epithelia**, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1998, 95:14961-14966
120. Singh P.K., Tack B.F., McCray P.B. Jr., Welsh M.J., **Synergistic and additive killing by antimicrobial factors found in human airway surface liquid**, *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 2000, 279(5):L799-L805
121. Sorensen O.E., Follin P., Johnsen A.H., Calafat J., Tjabringa G.S., Hiemstra P.S., Borregaard N., **Human cathelicidin, hCAP-18, is processed to the antimicrobial peptide LL-37 by extracellular cleavage with proteinase 3**, *Blood* 2001, 97:3951-3959
122. Sorensen O.E., Thapa D.R., Rosenthal A., Liu L., Roberts A.A., Ganz T., **Differential regulation of β -defensin expression in human skin by microbial stimuli**, *J. Immunol.* 2005, 174:4870-4879
123. Sreerama N., **CDPro, A software package for analyzing protein CD spectra**, <http://lamar.colostate.edu/~sreeram/CDPro/>

124. Sreerama N., Venyaminov S.Y., Woody R.W., **Estimation of the number of α -helical and β -strand segments in proteins using circular dichroism spectroscopy**, *Protein Sci.* 1999, 8(2):370-380
125. Sreerama N., Woody R.W., **Computation and analysis of protein circular dichroism spectra**, *Methods Enzymol.* 2004, 383:318-351
126. Sreerama N., Woody R.W., **Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: Comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR methods with expanded reference set**, *Anal. Biochem.* 2000, 287(2):252-260
127. Stoller J.K., Aboussouan L.S., **α_1 -antitrypsin deficiency**, *Lancet* 2005, 365:2225-2236
128. Strandberg Y., Gray C., Vuocolo T., Donaldson L., Broadway M., Tellam R., **Lipopolysaccharide and lipoteichoic acid induce different innate immune responses in bovine mammary epithelial cells**, *Cytokine* 2005, 31(1):72-86
129. Tang J.X., Wen Q., Bennett A., Kim B., Sheils C.A., Bucki R., Janmey P.A., **Anionic polyaminoacids dissolve F-actin and DNA bundles, enhance DNase activity, and reduce the viscosity of cystic fibrosis sputum**, *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 2005, 289(4):L599-L605
130. Tang Y.-Q., Yuan J., Ösapay G., Ösapay K., Tran D., Miller C.J., Quелlette A.J., Selsted M.E., **A cyclic antimicrobial peptide produced in primate leukocytes by the ligation of two truncated α -defensins**, *Science* 1999, 286:498-502
131. Tarran R., Grubb B.R., Gatzky J.T., Davis C.W., Boucher R.C., **The relative roles of passive surface forces and active ion transport in the modulation of airway surface liquid volume and composition**, *J. Gen. Physiol.* 2001, 118(2):223-236
132. Thornton D.J., Sheehan J.K., **From mucins to mucus. Toward a more coherent understanding of this essential barrier**, *Proc. Am. Thorac. Soc.* 2004, 1(1):54-61
133. Thornton D.J., Davies J.R., Kraayenbrink M., Richardson P.S., Sheehan J.K., Carlstedt I., **Mucus glycoproteins from 'normal' human tracheobronchial secretion**, *Biochem. J.* 1990, 265:179-186
134. Thornton D.J., Howard M., Khan N., Sheehan J.K., **Identification of two glycoforms of the MUC5B mucin in human respiratory**

mucus. Evidence for a cysteine-rich sequence repeated within the molecule, *Biochem. J.* 1997, 272(14):9561-9566

135. Tomita T., Nagase T., Ohga E., Yamaguchi Y., Yoshizumi M., Ouchi Y., **Molecular mechanisms underlying human β -defensin-2 gene expression in a human airway cell line (LC2/ad)**, *Respirology* 2002, 7(4):305-310

136. Tsutsumi-Ishii Y., Nagaoka I., **NF- κ B-mediated transcriptional regulation of human beta-defensin-2 gene following lipopolysaccharide stimulation**, *J. Leukoc. Biol.* 2002, 71(1):154-62

137. **UniProtKB/Swiss-Prot/TrEMBL**, Protein knowledge base, <http://www.expasy.org/uniprot/>

138. Valore E.V., Park C.H., Quayle A.J., Wiles K.R., McCray P.B. Jr., Ganz T., **Human β -defensin-1: an antimicrobial peptide of urogenital tissues**, *J. Clin. Invest.* 1998, 101:1633-1642

139. Voynow J.A., Young L.R., Wang Y., Horger T., Rose M.C., Fischer B.M., **Neutrophil elastase increases *MUC5AC* mRNA and protein expression in respiratory epithelial cells**, *Am. J. Physiol.* 1999, 276:835-843

140. Weiner D.J., Bucki R., Janmey P.A., **The antimicrobial activity of the cathelicidin LL37 is inhibited by F-actin bundles and restored by gelsolin**, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 2003, 28:738-745

141. Whitsett J.A., **Intrinsic and innate defenses in the lung: intersections of pathways regulating lung morphogenesis, host defense, and repair**, *J. Clin. Invest.* 2002, 109:565-569

142. Wickström C., Davies J.R., Eriksen G.V., Veerman E.C.I., Carlstedt I., **MUC5B is a major gel-forming, oligomeric mucin from human salivary gland, respiratory tract and endocervix: identification of glycoforms and C-terminal cleavage**, *Biochem. J.* 1998, 334:685-693

143. Wilson R., Dowling R.B., Jackson A.D., **The biology of bacterial colonization and invasion of the respiratory mucosa**, *Eur. Respir. J.* 1996, 9:1523-1530

144. Wimley W.C., Selsted M.E., White S.H., **Interactions between human defensins and lipid bilayers: evidence for formation of multimeric pores**, *Protein Sci.* 1994, 3(9):1362-1373

145. Worlitzsch D., Tarran R., Ulrich M., Schwab U., Cekici A., Meyer K.C., Birrer P., Bellon G., Berger J., Weiss T., Botzenhart K., Yankaskas

- J.R., Randell S., Boucher R.C., Döring G., **Effects of reduced mucus oxygen concentration in airway *Pseudomonas* infections of cystic fibrosis patients**, *J. Clin. Invest.* 2002, 109:317-325
146. Xiao W., Hsu Y.-P., Ishikawa A., Kirikae T., Moss R.B., **Sputum cathelicidin, urokinase plasminogen activation system components, and cytokines discriminate cystic fibrosis, COPD, and asthma inflammation**, *Chest* 2005, 128(4):2316-2326
147. Yamaguchi Y., Nagase T., Makita R., Fukuhara S., Tomita T., Tominaga T., Kurihara H., Ouchi Y., **Identification of multiple novel epididymis-specific β -defensin isoforms in humans and mice**, *J. Immunol.* 2002, 169:2516-2523
148. Yang B.D., Chen Q., Schmidt A.P., Anderson G.M., Wang J.M., Wooters J., Oppenheim J.J., Chertov O., **LL-37, the neutrophil granule- and epithelial cell-derived cathelicidin, utilizes formyl peptide receptor-like 1 (FPRL1) as a receptor to chemoattract human peripheral blood neutrophils, monocytes, and T cells**, *J. Exp. Med.* 2000, 192(7):1069-1074
149. Yang D., Biragyn A., Kwak L.W., Oppenheim J.J., **Mammalian defensins in immunity: more than just microbicidal**, *Trends in Immunol.* 2002, 23(6):283-284
150. Yang D., Chertov O., Oppenheim J.J., **Participation of mammalian defensins and cathelicidins in antimicrobial immunity: receptors and activities in human defensins and cathelicidin (LL-37)**, *J. Leucoc. Biol.* 2001, 69 (5): 691-697
151. Yeaman M.R., Yount N.Y., **Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance**, *Pharmacol. Rev.* 2003, 55(1):27-55
152. Yuta A., Ali M., Sabol M., Gaumond E., Baranuk J.N., **Mucoglycoprotein hypersecretion in allergic rhinitis and cystic fibrosis**, *Am. J. Physiol.* 1997, 273:L1203-L1207
153. Zalacain R., Sobradillo V., Amilibia J., Barron J., Achotegui V., Pijoan J.I., Llorente J.L., **Predisposing factors to bacterial colonization in chronic obstructive pulmonary disease**, *Eur. Respir. J.* 1999, 13(2):343-348
154. Zanetti M., Gennaro R., Romeo D., **Cathelicidins: a novel family with a common proregion and a variable C-terminal antimicrobial domain**, *FEBS Lett.* 1995, 374(1):1-5

155. Zasloff M., **Antimicrobial peptides of multicellular organisms**,
Nature 2002, 415(6870):389-395

8. Anhang

8.1 Abkürzungsverzeichnis

AAT	α_1 -Antitrypsin
AMP	Antimikrobielle Peptide
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
BALF	Bronchoalveoläre Lavage Flüssigkeit
CD	Zirkulardichroismus (<i>en.</i> : Circular dichroism)
CF	Zystische Fibrose (<i>en.</i> : cystic fibrosis)
COPD	Chronisch obstruktive Lungenerkrankung (<i>en.</i> : chronic obstructive pulmonary disease)
ECL	<i>En.</i> : enhanced chemiluminescence
ELISA	Enzym-linked Immunosorbent Assay
ELLA	Enzym-linked Lektinsorbent Assay
FEV ₁	Forciertes expiratorisches Volumen
hBD-(1-3)	Humanes β -Defensin
hCAP-18	Humanes kationisches antimikrobielles Peptid 18 (<i>en.</i> : human cationic antimicrobial peptide)
HNP	Humanes neutrophiles Peptid
HRP	<i>En.</i> : horseradish peroxidase
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
KBE	Kolonie bildende Einheiten
LPS	Lipopolysaccharid
LTA	Lipoteichonsäure (<i>en.</i> : lipid teichoic acid)
MW	Mittelwert
MWCO	<i>En.</i> : molecular weight cut off
NMR	Magnetresonanzspektroskopie (<i>en.</i> : nuclear magnetic resonance)
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	<i>En.</i> : phosphate buffered saline
POD	Peroxidase
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>en.</i> : sodium dodecyl sulfate)

TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor- α
VDR	Vitamin-D-Rezeptor
WGA	Weizenkeimagglutinin (<i>en.</i> : wheat germ agglutinin)

8.2 Publikationen und Präsentationen

- 10/2005 K. Felgentreff, C.Beisswenger, M. Griese, R. Bals,
Mucosal antimicrobial peptides accumulate in airway mucus, Herbsttagung der Sektion Zellbiologie der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie 2005, Bonn, Deutschland
- 8/2006 Beisswenger C., Kändler K., Hess C., Garn H., Felgentreff K., Wegmann M., Renz H., Vogelmeier C., Bals R., **Allergic airway inflammation inhibits pulmonary antibacterial host defense**, *J. Immunol.* 2006, 177:1833-1837
- 12/2006 Felgentreff K., Beisswenger C., Griese M., Gulder T., Bringmann G., Bals R., **The antimicrobial peptide cathelicidin interacts with airway mucus**, *Peptides* 2006, 27(12):3100-3106

8.3 Akademische Lehrer

Meine akademischen Lehrer an den Universitäten Marburg und Gießen, Deutschland; Stellenbosch, Südafrika; Basel, Schweiz waren die Damen und Herren Professoren/Hochschuldozenten:

Apfelstädt, Aumüller, Bals, Basler, Baum, Baumann, Behr, Berger, Betalanfy, Beyer, Bien, Bolm, Bühner, Czubayko, Daut, Dettmeyer, Engenhardt-Cabillic, Gemsa, Görg, Gotzen, Gudermann, Hardcastle, Hasilik, Hofbauer, Höffgen, Hofmann, Holst, Hörle, Kalinowski, Kaluza, Kann, Klose, Koch, Kuhlmann, Löffler, Maier, Maisch, Mandrek, Moll, Moosdorf, Neubauer, Oertel, Renschmidt, Renz, Richter, Röhm, Rosenow, Rothmund, Ruchholz, Rudin, Schäfer H., Schäfer M., Schmitt,

Schnabel, Schneider, Schüffel, Schulz, Steininger, Vogelmeier, Voigt, Wagner, Warren, Weihe, Werner, Westermann, Wulf

8.4 Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Dr. R. Bals für die Bereitstellung des Themas, die sehr gute, fortwährende Betreuung meiner Arbeit und die Förderung meiner beruflichen Laufbahn.

Herrn Dr. C. Beisswenger danke ich ebenfalls für die intensive Betreuung, Etablierung der AMP-ELISAs, Einarbeitung in die Methoden und fortwährende technische Unterstützung während der Arbeit.

Frau Dr. K. Kändler, Herrn C. Herr, Herrn Dr. C. Hess, Frau Dr. J. von Haussen und Herrn T. Damm danke ich für die hilfsbereite Unterstützung in allen methodischen und technischen Fragen.

Den weiteren Mitgliedern der AG Bals danke ich für die nette Betreuung und Zusammenarbeit in den letzten dreieinhalb Jahren.

Herrn Prof. Dr. Dr. Bringmann danke ich für die Bereitstellung des Spektropolarimeters für die Zirkulardichroismussmessungen. Besonderer Dank gebührt Frau T. Gulder für die Einarbeitung an diesem Gerät und die Betreuung der Messungen.

Schließlich bedanke ich mich insbesondere bei meiner Familie für die private und finanzielle Unterstützung meines Studiums.

8.5 Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin der Universität Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel „Die Aktivität antimikrobieller Peptide wird durch die Interaktion mit Mukus der Atemwege moduliert“, in der Klinik für Innere Medizin, Schwerpunkt Pneumologie, des Universitätsklinikums Gießen und Marburg GmbH, Standort Marburg, unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Dr. Robert Bals mit Unterstützung durch die unten genannten Personen ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und keine anderen als die in der Dissertation aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher in keinem in- oder ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch diese oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Teile der Arbeit sind enthalten in der Publikation: Felgentreff K., Beisswenger C., Griese M., Gulder T., Bringmann G., Bals R., The antimicrobial peptide cathelicidin interacts with airway mucus, Peptides 2006, 27(12):3100-3106.

Die Durchführung der Arbeit wurde durch folgende Personen unterstützt:

Prof. Dr. Dr. Robert Bals:	Bereitstellung des Themas und fortwährende Betreuung
Dr. Christoph Beisswenger:	Etablierung der AMP-ELISAs und fortwährende Betreuung
Dr. Kerstin Kändler:	Etablierung des Muzin-ELLAs und technische Unterstützung
Christian Herr:	Technische Unterstützung beim Nachweis der Interaktion von LL-37 und Muzin
Thomas Damm:	Technische Unterstützung
Prof. Dr. Dr. Bringmann:	Zurverfügungstellung des Spektropolarimeters für die Durchführung der Zirkulardichroismusmessungen
Tanja Gulder:	Betreuung bei der Durchführung der Zirkulardichroismusmessungen

Ort, Datum, Unterschrift