





Aus dem Zentrum für Innere Medizin, Schwerpunkt Pneumologie  
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. C. Vogelmeier

des Fachbereichs Medizin Philipps-Universität Marburg

in Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Gießen und Mar-  
burg GmbH, Standort Marburg

# Antimikrobielle Peptide in den Atemwegssekreten von Patienten mit ambulant erworbener Pneumonie

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten  
Medizin

Dem Fachbereich Medizin der Philips-Universität Marburg vorgelegt

von

Ulrich Baur  
aus Starnberg  
Marburg, 2008

Angenommen durch den Fachbereich Medizin der Philipps-Universität am  
28. Mai 2009

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan:	Prof. Dr. med. M. Rothmund
Referent:	Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. R. Bals
Korreferent:	PD Dr. rer. nat. H. Garn

Für meine Eltern



# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Das angeborene Immunsystem .....</b>	<b>1</b>
1.1.1 Überblick über das angeborene Immunsystem.....	1
1.1.2 Die zellulären Bestandteile des angeborenen Immunsystems....	2
1.1.3 Struktur und Funktion von Toll-like Rezeptoren.....	3
1.1.4 MyD88-abhängige Signaltransduktion.....	4
1.1.5 MyD88-unabhängige Signaltransduktion.....	4
1.1.6 Die humoralen Bestandteile des angeborenen Immunsystems...	5
1.1.7 Das angeborene Immunsystem der Lunge.....	6
<b>1.2 Antimikrobielle Proteine.....</b>	<b>7</b>
1.2.1 Defensine.....	8
1.2.1.1 $\alpha$ -Defensine.....	9
1.2.1.2 $\beta$ -Defensine.....	9
1.2.2 Cathelizidine.....	10
1.2.3 Regulation der Expression von antimikrobiellen Proteinen.....	11
1.2.4 Wirkungsweisen.....	12
1.2.4.1 Die antimikrobielle Wirkung.....	12
1.2.4.2 Die Wirkung auf Entzündung, Angiogenese, Wundheilung und das erworbene Immunsystem.....	14
<b>1.3 Die Rolle antimikrobieller Proteine und des angeborenen Immunsystems bei Erkrankungen der Lunge .....</b>	<b>17</b>
1.3.1 Die ambulant erworbene Pneumonie (CAP).....	18
1.3.2 Die chronisch-obstruktive Lungenerkrankung (COPD) .....	19
1.3.3 Asthma bronchiale.....	19
<b>1.4 Kompetenznetzwerk ambulant erworbene Pneumonie (CAPNetz).....</b>	<b>20</b>
1.4.1 Ziele von CAPNetz.....	21
<b>1.5 Fragestellung.....</b>	<b>22</b>

<b>2. Material und Methoden.....</b>	<b>23</b>
<b>2.1 Patienten .....</b>	<b>23</b>
2.1.1 Patientenrekrutierung .....	23
2.1.2 Ein- und Ausschlusskriterien.....	23
2.1.3 CAPNetz-Proben.....	24
<b>2.2 Extraktion der Sputumproben.....</b>	<b>26</b>
<b>2.3 AMP-ELISAs.....</b>	<b>27</b>
2.3.1 hBD-2-ELISA.....	27
2.3.2 LL-37-ELISA.....	29
<b>2.4 LL-37 Western-Blot.....</b>	<b>30</b>
<b>2.5 hBD-2 Western-Blot.....</b>	<b>31</b>
<b>2.6 Statistische Analyse.....</b>	<b>32</b>
2.6.1 Korrelationsanalyse.....	32
2.6.2 Signifikanztest.....	32
<b>3. Ergebnisse.....</b>	<b>34</b>
<b>3.1 Der Nachweis von AMPs in Atemwegssekreten .....</b>	<b>34</b>
<b>3.2 Die Konzentration von AMPs in Atemwegssekreten .....</b>	<b>35</b>
<b>3.3 Die AMP-Konzentration bei CAP-Patienten ist im Ver-</b>	
<b>gleich zu Gesunden erhöht.....</b>	<b>36</b>
3.3.1 Der Vergleich zwischen BAL und Sputum.....	39
<b>3.4 Die AMP-Konzentrationen zeigen signifikante Korrelatio-</b>	
<b>nen mit klinischen und mikrobiologischen Parametern .....</b>	<b>41</b>
3.4.1 Der Einfluss des Keimspektrums auf die AMP-Konzentration...	41
3.4.2 Der Zusammenhang zwischen erhöhten LL-37- und CRP-	
Werten.....	42
3.4.3 Die Beziehung zwischen der AMP-Konzentration und der	
Leukozytenzahl.....	43
3.4.4 Die Relation zwischen der AMP-Konzentration und Tumorer-	
krankungen.....	45
3.4.5 Die AMP-Konzentration in Abhängigkeit vom Raucherstatus...	46
3.4.6 Die Eigenschaft der AMP-Konzentration als diagnostischer	
und prognostischer Marker.....	49



3.4.6.1	Die Beziehung zwischen der AMP-Konzentration und dem BGA-Befund.....	49
3.4.6.2	Die Eignung des AMP-Spiegels zur Abschätzung der Prognose.....	50
<b>4.</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>52</b>
	<b>AMPs können in Atemwegssekreten von CAP-Patienten in höheren     Konzentrationen nachgewiesen werden als bei Gesunden ...</b>	<b>52</b>
	<b>BAL und Sputum unterscheiden sich nicht in der Höhe Ihrer AMP-     Konzentration.....</b>	<b>56</b>
	<b>Zwischen der AMP-Konzentration und den Entzündungsparametern     bestehen signifikante Korrelationen .....</b>	<b>58</b>
	<b>Patienten mit einer Legionellenpneumonie zeigen erhöhte hBD2-     Konzentrationen .....</b>	<b>60</b>
	<b>Die LL-37-Konzentration als prognostischer Marker .....</b>	<b>61</b>
	<b>Die LL-37-Konzentration bei Patienten mit malignen Tumorerkrankungen     .....</b>	<b>63</b>
	<b>Die AMP-Konzentrationen von Rauchern mit CAP im Vergleich zu     Nicht-Rauchern mit CAP.....</b>	<b>63</b>
	<b>Schlussbemerkung .....</b>	<b>65</b>
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>66</b>
<b>6.</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>68</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Toll-like Rezeptor-Signaltransduktion.....	5
Abb. 2:	Das angeborene Immunsystem an der pulmonalen Oberfläche.....	7
Abb. 3:	Die antiinfektiöse Wirkungsweise der antimikrobiellen Proteine	16
Abb. 4:	Dokumentation über den Raucherstatus bei der Eingangsunter- suchung.....	25
Abb. 5:	Mikrobiologischer Untersuchungsbefund für Sputumproben.....	26
Abb. 6:	Das Prinzip des hBD2-ELISA.....	27
Abb. 7:	Das Prinzip des LL-37-ELISA.....	29
Abb. 8:	Nachweis von hCAP-18/LL-37 in Sputumproben.....	34
Abb. 9:	Nachweis von hBD2 in Sputumproben.....	35
Abb. 10	Durchschnittliche AMP-Konzentration bei CAP-Patienten.....	35
Abb. 11:	Vergleich der LL-37-Konzentration bei a) gesunden Menschen und b) Pneumoniepatienten.....	36
Abb. 12:	Vergleich der hBD2-Konzentration bei a) gesunden Menschen und b) Pneumoniepatienten.....	36
Abb. 13:	hCAP-18/LL-37 Western-Blot mit konzentrierten BAL gesunder Patienten.....	38
Abb. 14:	Graphische Darstellung der Ergebnisse aus dem spiking- Versuch mit den konzentrierten BAL gesunder Patienten.....	39
Abb. 15:	Vergleich der a) LL-37- und b) hBD2-Konzentration in BAL und Sputum von Pneumoniepatienten.....	40
Abb. 16:	Vergleich der a) LL-37- und b) hBD2-Konzentration in BAL und Sputum von gesunden Menschen.....	40
Abb. 17:	Vergleich zwischen BAL und Sputum (SP) im hCAP-18/LL-37 Western-Blot.....	41
Abb. 18:	Graphische Darstellung der a) LL-37- und b) hBD2- Konzentration bei Legionellen-Infektion und Nicht-Legionellen- Infektion.....	42
Abb. 19:	Graphische Darstellung des Zusammenhangs zwischen LL-37 und CRP.....	43

Abb. 20:	Graphische Darstellung des Zusammenhangs zwischen der LL37-Konzentration und der Anzahl stabkerniger Granulozyten	44
Abb. 21:	Graphische Darstellung der Beziehung zwischen der Leukozytenzahl und a) der LL-37- und b) der hBD2-Konzentration.....	44
Abb. 22:	Graphische Darstellung des Verhältnisses der Anzahl segmentkerniger Granulozyten zu a) hBD2 und b) LL-37.....	45
Abb. 23:	Graphische Darstellung der Relation zwischen AMP-Konzentration und Tumorerkrankung.....	45
Abb. 24:	Graphische Darstellung des Zusammenhangs zwischen der LL-37-Konzentration bei Patienten mit malignen Brusttumoren und Patienten mit Tumoren anderer Organe.....	46
Abb. 25:	Vergleich der AMP-Konzentration im Sputum bei Rauchern und Nicht-Rauchern für a) LL-37 und b) hBD2.....	47
Abb. 26:	Vergleich der AMP-Konzentration in BAL bei Rauchern und Nicht-Rauchern für a) LL-37 und b) hBD2.....	48
Abb. 27	Vergleich der AMP-Konzentrationen aufgeschlüsselt nach der Anzahl der packyears für a) LL-37 und b) hBD2 .....	49
Abb. 28:	Graphische Darstellung des Zusammenhangs zwischen der Hospitalisierungsdauer und der a) LL37- und b) hBD2-Konzentration.....	50
Abb. 29:	Graphische Darstellung der AMP-Konzentrationen geordnet nach CRB-65 für a) LL-37 und b) hBD2.....	51
Abb. 30:	Graphische Darstellung der systemischen und lokalen Auswirkungen einer Entzündung.....	59
Abb. 31:	Graphische Darstellung der Induktion des Anstieges der Konzentration von neutrophilen Granulozyten und LL-37.....	60



## 1. Einleitung

### 1.1 Das angeborene Immunsystem

#### 1.1.1 Überblick über das angeborene Immunsystem

Alle Organismen haben Abwehrmechanismen entwickelt, um einem Tod durch pathogene Keime zu entgehen. Diese Mechanismen werden durch das Immunsystem geleistet, wobei die primäre Immunantwort durch das angeborene Immunsystem (innate immune system, IIS) erfolgt. Zusätzlich verfügen die Vertebraten (zu denen auch der Mensch gehört) über ein erworbenes (adaptives) Immunsystem (AIS), das sich während der Evolution aus dem IIS entwickelt hat und das infolge einer Exposition gegenüber einem Pathogen eine spezifischere Immunantwort erzeugen kann als das IIS (19). Einen Überblick über die Unterschiede zwischen angeborenen und erworbenen Immunsystem gibt Tabelle 1:

Tab 1: Vergleich zwischen IIS und AIS

<b>Angeborenes Immunsystem (IIS)</b>	<b>Erworbenes Immunsystem (AIS)</b>
Unspezifische Immunantwort auf Pathogene Keine immunologischen Gedächtniszellen Immunantwort erfolgt schnell	Auf verschiedene Pathogene spezifische Immunantwort Ausbildung von immunologischen Gedächtniszellen (MC) zur schnellen Wiedererkennung Immunantwort bei Erstkontakt langsam, aufgrund MC beim Zweitkontakt schneller

Zur Erfüllung dieser Aufgabe stehen dem IIS zelluläre und humorale Komponenten zur Verfügung. Diese können jeweils in einen afferenten (sensing) und einen efferenten (effector) Schenkel unterteilt werden.

### 1.1.2 Die zellulären Bestandteile des angeborenen Immunsystems

Die zelluläre Komponente des IIS besteht aus einer Vielzahl an Zellen, die hauptsächlich aus der myeloischen Stammzellreihe stammen. Hauptvertreter sind die mononukleären Zellen (Makrophagen, dendritische Zellen), die polymorphkernigen Phagozyten (neutrophile Granulozyten), die natürlichen Killerzellen und die Mastzellen. Die Aufgabe der Zellen ist nicht nur das Abtöten und/oder Entfernen des Pathogens, sondern auch die Chemotaxis und die Antigenpräsentation (Verbindung zum AIS) (6).

Der afferente Teil der Immunantwort erfolgt über das Erkennen von spezifischen Molekülen auf der Oberfläche der Pathogene, welche auch als pathogen-associated molecular patterns (PAMP) bezeichnet werden. Das bekannteste Molekül, das auf diese Weise eine Immunantwort auslösen kann, ist Lipopolysaccharid, das in seiner biologischen Wirksamkeit erstmals vor über 100 Jahren beschrieben wurde (Pfeiffer, 1892) und für die klinischen Folgen und die Aufrechterhaltung der Infektion im Anfangsstadium verantwortlich ist (121). Andere erkannte Moleküle sind Peptidoglycan, Lipoteichonsäure und dsDNA. Bei allen erkannten Molekülen handelt es sich um hoch-konservierte Strukturen, die für das Überleben der Pathogene unabdingbar sind (86).

Verantwortlich für das Erkennen der pathogenen Moleküle sind die pattern recognition receptors (PRR). Beispiele für PRR sind Mannose-Rezeptoren, welche an terminale Mannose- oder Fucosereste auf der Zellwand von Mikroorganismen binden, und die Toll-like Rezeptoren, von denen zehn bekannt sind (30, 31, 42). Der Mensch exprimiert mindestens zehn TLR's (156), wobei die einzelnen Rezeptoren entweder einen einzigen (z.B. TLR4 => LPS (128)) oder mehrere Liganden erkennen. Auf diese Weise kann das IIS eine spezifische Immunantwort auf unterschiedliche Antigene generieren.

Neben TLR's gibt es noch weitere Rezeptorarten, z.B. den f-methionyl-leucylphenylalanyl (fMLP) Rezeptor, dessen Fehlen bei Mäusen die Empfindlichkeit für Infektionen mit *Listeria monocytogenes* erhöht (50).

Als intrazytoplasmatische Sensoren fungieren NOD 1 und 2 (nucleotide-binding oligomerization domain). NOD1 bindet spezifisch an Tripeptid-Strukturen von Gram-negativen Bakterien, was wiederum zu einer Aktivierung des NF- $\kappa$ B (nuclear factor  $\kappa$ B) Signalweges führt (52). NOD2 erkennt Peptidoglykan und aktiviert sowohl den NF- $\kappa$ B Signalweg (53) als auch verschiedene Caspasen (76).

### 1.1.3 Struktur und Funktion von Toll-like Rezeptoren

TLR's ähneln in Bezug auf ihren zytoplasmatischen Anteil den Interleukin-1 Rezeptoren (IL-1R), mit denen sie eine Superfamilie bilden. In ihren extrazellulären Anteilen unterscheiden sie sich jedoch. Während der TLR einen Abschnitt mit sich wiederholenden Leucin-Motiven besitzt, verfügt der IL-1R über Immunglobulin-Domänen (155). Sowohl TLR als auch IL-1R besitzen eine TIR-Domäne (Toll/IL-1 receptor/resistance motif), in der drei konservierte Bereiche mit Prolin-Resten (73, 127) für die Signaltransduktion verantwortlich sind. Die weitere Signaltransduktion erfolgt über fünf unterschiedliche zytoplasmatische AdapterPeptide: MyD88 (myeloid differentiation factor), MAL, TRIF, MyD88-4, MyD88-5. Diese besitzen ebenfalls eine TIR-Domäne.

Tab. 2: menschliche TLR mit Liganden und Signaltransduktion

Rezeptor	Ligand	Im Komplex mit	Signaltransduktion
TLR1	TriacetylloPeptid	TLR2	MyD88 abhängig
TLR2	Peptidoglycan, LipoPeptid, Zymosan		MyD88 abhängig
TLR3	ds-RNA, polyI:C		MyD88 unabhängig
TLR4	Lipopolysaccharid, RSV F Peptid		MyD88 abhängig MyD88 unabhängig
TLR5	Flagellin		MyD88 abhängig
TLR6	DiacetylloPeptid	TLR2	MyD88 abhängig
TLR7	Imidazoquinoline		MyD88 abhängig
TLR8	Imidazoquinoline		MyD88 abhängig (111)
TLR9	Bakterielle DNA Unmethylierte CpG-DNA		MyD88 abhängig
TLR10	unbekannt		MyD88 abhängig (60)

TLR werden auf unterschiedliche Weise in der Zelle bereitgestellt. Während sich TLR 1, 2, 4 auf der Zelloberfläche befinden, werden TLR 3, 7, 8, 9 in intrazellulären Kompartimenten wie z.B. dem endoplasmatischen Retikulum exprimiert und dann als Endosomen abgeschnürt (5, 62, 93, 108). Die auf der Zelloberfläche lokalisierten TLR wer-

den nach Kontakt mit ihrem Liganden als Phagosomen abgeschnürt, in denen die weitere Signalkaskade stattfindet (166).

Die Aktivierung der TLR-TIR-AdapterPeptidkaskade führt zu einer Aktivierung der Zelle. Dabei werden zwei Formen der Aktivierung unterschieden: MyD88-abhängig und MyD88-unabhängig (154). Gemeinsamer Effekt beider Aktivierungspfade ist die Translokation von NF- $\kappa$ B in den Zellkern und die vermehrte Transkription von proinflammatorischen Zytokinen (z. B. Tumor-Nekrose-Faktor  $\alpha$  (TNF  $\alpha$ )) (61).

### 1.1.4 MyD88-abhängige Signaltransduktion

Das Adaptermolekül MyD88 besitzt zwei entscheidende Domänen: die C-terminal TIR-Domäne, mit dem es an den TLR bindet, und die N-terminale death-Domäne, durch deren Stimulation mehrere Kinasen aktiviert werden (IL-1 receptor-associated kinase (IRAK) 1 + 4) (114, 181). Dies führt zur Aktivierung sowohl des AP-1 Transkriptionsfaktors als auch des I $\kappa$ B-Kinase-Komplexes, was letztendlich zu einer Translokation von NF- $\kappa$ B in den Zellkern führt (61, 157). Bis auf den dsDNA-Rezeptor TLR3 verwenden die meisten TLR diese Art der Signaltransduktion. Des Weiteren benutzen TLR2 und 4 ein weiteres AdapterPeptid (TIRAP), das ebenfalls für eine MyD88 abhängige Signaltransduktion verantwortlich ist (186).

### 1.1.5 MyD88-unabhängige Signaltransduktion

Verantwortlich für die MyD88-unabhängige Signaltransduktion sind die Adaptermoleküle TRIF und TRAM, welche beide eine TIR-Domäne besitzen (57, 180). Durch Bindung von LPS an diese Moleküle kommt es zu einer Erhöhung der NF- $\kappa$ B- und der IFN- $\beta$ -Konzentration.

Entscheidend für die vermehrte Produktion von NF- $\kappa$ B ist Phosphorylierung und Aktivierung von TAK1 im Zytosol, was eine Aktivierung von I $\kappa$ B-Kinase zur Folge hat (80). Für die Steigerung der IFN- $\beta$ -Expression ist eine Interaktion von TRIF mit TBK1 (TANK-binding-kinase1) und I $\kappa$ B-Kinase- $\epsilon$  (IKK $\epsilon$ ) (58) verantwortlich. Dadurch kommt es zur Phosphorylierung von IRF-3 (interferon regulatory factor), welcher zu



Dimeren zusammengelagert als Transkriptionsfaktor die IFN- $\beta$ -Synthese steigert (70, 185). Dieses kann wiederum über die Bindung an Interferon-Rezeptoren (IfnR) und einen STAT-Signalweg inflammatorische Prozesse regulieren.

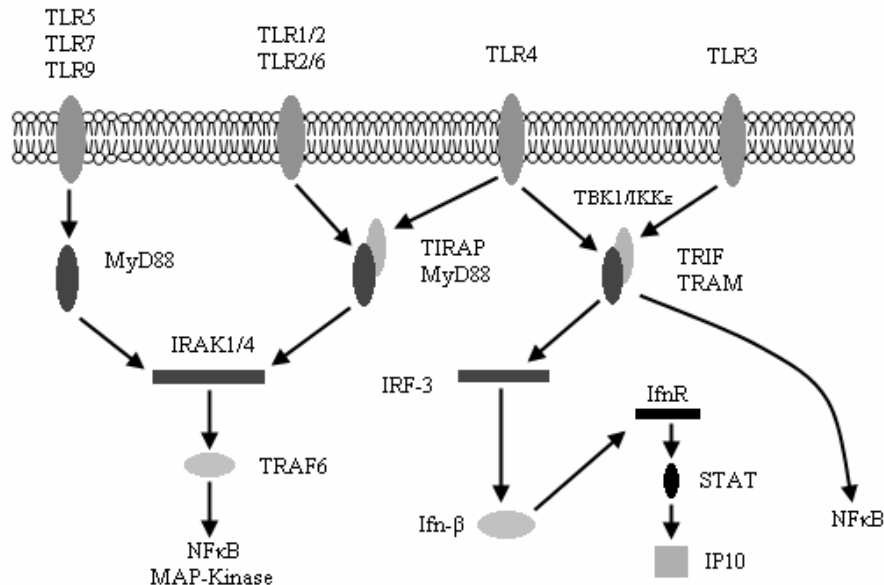


Abb. 1: Toll-like Rezeptor-Signaltransduktion

Bei der Signaltransduktion in der Zelle wird zwischen einem MyD88-abhängigen und einem MyD88-unabhängigen Weg unterschieden. Bei dem MyD88-abhängigen Weg kommt es zu einer Erhöhung der NF- $\kappa$ B-Konzentration durch IRAK-abhängige Aktivierung von TRAF6. Im MyD88-unabhängigen Weg wird über IRF-3 die IFN- $\beta$ -Konzentration erhöht. Dadurch kann über eine STAT-Signaltransduktion auch IP-10 erhöht werden. Zusätzlich kommt es hier auch zu einer NF- $\kappa$ B-Erhöhung. Dies geschieht allerdings wesentlich langsamer als beim MyD88-abhängigen Weg.

### 1.1.6 Die humoralen Bestandteile des angeborenen Immunsystems

Wie bei den zellulären Bestandteilen des IIS wird auch im humoralen Bereich zwischen afferenten und efferenten Prozessen unterschieden. Ein Beispiel für den afferenten Schenkel ist das mannose-binding Peptid (151), die Collectine, das lipopolysaccharide binding Peptid (LBP) (139) und CD14 (129).

Vertreter der humoralen Effektoren sind das Komplementsystem, Lysozym, Lactoferrin und antimikrobielle Peptide. Das Komplementsystem hat innerhalb der Immunantwort eine Vielzahl an Aufgaben, so z.B. die Detektierung der Pathogene, die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten, die Opsonierung und die direkte Lyse der Mikroorganismen. Es besteht aus mehr als 20 Serumpeptiden und Oberflächenrezeptoren, deren

Aktivierung eine Kaskade von Serum-Proteasen in Gang setzt, durch die es zur Bildung eines membrane attack complex (MAC) aus den Faktoren C5-C9 kommt. Die verbliebenen Komplementfragmente agieren als Entzündungsregulatoren und bewirken eine Chemotaxis. Die Aktivierung des Komplementsystems kann über drei Wege erfolgen. Während beim klassischen Weg das System über einen Antigen-Antikörper-Komplex stimuliert wird, findet beim alternativen und beim mannose-binding-lectin Weg eine direkte Anregung durch Bestandteile der mikrobiellen Zellwand statt.

### **1.1.7 Das angeborene Immunsystem der Lunge**

Zusätzlich zu den oben beschriebenen Bestandteilen beinhaltet der zelluläre Anteil der angeborenen Immunantwort die strukturellen Zellen der Atemwege. Ebenso wie die in Alveolen, Submukosa und perivaskulärem Raum lokalisierten neutrophilen Granulozyten und Makrophagen exprimieren Atemwegsepithelzellen TLR 1-10 (141).

Zusätzlich zu dem oral gerichteten Zilienschlag bewirkt das von den Epithelzellen und den submukösen Drüsen produzierte Atemwegssekret eine Begrenzung des Bakterienwachstums. Die Sekretion dieses Sekretes erfolgt entlang eines osmotischen Druckgradienten (23). Die Zusammensetzung des Atemwegssekretes ist komplex und bis jetzt nicht vollständig charakterisiert. Zwei-dimensionale Gelelektrophoresen zeigen eine vielschichtige Zusammensetzung aus mehreren hundert Peptiden, Peptiden und Fragmenten (u.a. Collectine, Lysozym und antimikrobielle Peptide) (101, 102, 177). Hauptvertreter der Collectine sind die surfactant Peptide SP-A und SP-D sowie MBL (Mannose-bindendes Lectin). Deren Aufgabe besteht in der Erkennung und Bindung von Mikroorganismen sowie der verbesserten Bindung und Phagozytose durch die Alveolarmakrophagen (66). Zusätzlich zu dieser Aufgabe besitzt SP-A noch immunmodulatorische (35) und antiinflammatorische Eigenschaften, z.B. durch Bindung von freier mikrobieller DNA, einem starken Initiator für eine Entzündungsreaktion (124). Die antimikrobielle Wirkung des ASL ist stark abhängig von der Ionen- und Salzkonzentration. Steigt diese an, nimmt die bakterizide Wirkung ab (161).

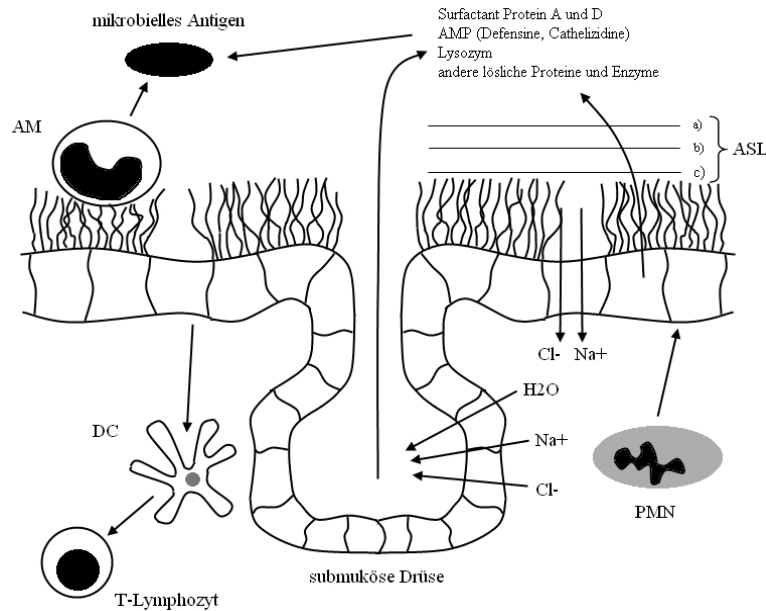


Abb. 2: Das angeborene Immunsystem an der pulmonalen Epitheloberfläche

Sowohl das Epithel als auch die submukösen Drüsen sezernieren antimikrobielle Bestandteile des Atemwegssekretes (ASL). Dies geschieht entlang eines osmotischen Gradienten, der durch aktiven Ionen-transport aufgebaut wird. Im Lumen greifen die sezernierten antimikrobiellen Bestandteile eingewanderte Mikroben an. Die ASL besteht aus drei Schichten: a) Mucus; b) Surfactant; c) perizilliäre Flüssigkeit. Die luminal, submukös und perivaskulär lokalisierten AM (Alveolarmakrophagen) und die einwandernden PMN (Polymorphkernigen Granulozyten) tragen durch Phagozytose zur Beseitigung bei. Durch Aufnahme in DC (dendritische Zellen) und Präsentation an T-Lymphozyten besteht eine Verbindung zum adaptiven Immunsystem.

## 1.2 Antimikrobielle Peptide

Unter antimikrobiellen Peptiden (AMP) versteht man im weiteren Sinne alle genkodierte Oligo- und Polypeptide, die das Wachstum von Mikroorganismen durch Lyse oder Interaktion mit den Zellwänden verhindern können (160). Insgesamt sind über 700 AMPs bekannt. Neben ihrer Eigenschaft als Effektorpeptide der angeborenen Immunität verfügen einige AMPs auch über immunmodulatorische (Chemotaxis, Zytokin-Ausschüttung) und regenerative (Angiogenese, Wundheilung) Eigenschaften (74). Dabei wirken viele AMPs oft nicht alleine, sondern bilden einen Synergismus mit anderen körpereigenen Abwehrsubstanzen, wie z.B. Lysozym, Lactoferrin, granulocyt-makrophage colony stimulating factor und IL-1 $\beta$  (11, 24). Außerdem spielen AMPs bei

der Pathogenese von vielen Erkrankungen vermutlich eine wichtige Rolle, wie z.B. bei der cystischen Fibrose und der chronisch-obstruktiven Lungenerkrankung (COPD).

AMPs können aufgrund der Art ihrer Synthese in ribosomal und nicht-ribosomal synthetisierte Peptide eingeteilt werden (194). Die letzteren werden hauptsächlich von Bakterien produziert. Wichtige Vertreter sind heute schon in klinischen Einsatz (Cyclosporin A, Polymyxin B, ACV als Vorstufe von Penicillin). Die ribosomal synthetisierten AMPs werden von allen Lebewesen gebildet.

Eine Einteilung in verschiedene Gruppen ist aufgrund der großen Unterschiede der einzelnen Moleküle schwierig. Dennoch werden AMPs aufgrund ihrer Größe, ihrer Konformation oder nach der vorherrschenden Aminosäure klassifiziert. Die am häufigsten verwendete Klassifikation teilt sie nach ihren homologen Strukturmotiven ein. So zeichnen sich z.B. Cathelizidine dadurch aus, dass unterschiedliche, reife Peptide in ihrer Form als Pro-Peptid eine konservierte Sequenz besitzen.

Die Hauptvertreter der AMPs im Respirationstrakt sind die genkodierte Defensine und Cathelizidine (10). Sie werden von verschiedenen Zellen produziert, wie z.B. dem Atemwegsepithel, serösen Zellen und myeloiden Zellen.

Tab. 3: Primärsequenz und Strukturklasse ausgewählter AMPs

Peptid	Quelle	Strukturklasse	Sequenz
CRAMP	Maus	$\alpha$ -helical	ISRLAGLLRKGGEKIGEKLLKIGQ-KIKNFFQKLVQPE
LL-37	Mensch	$\alpha$ -helical	LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLPRTES
hBD-1	Mensch	$\beta$ -Faltblatt	DHYNC1VSSGGQC2LYSAC3PIFTKIQTGTC2YRGKAKC1C3K
HNP-1	Mensch	$\beta$ -Faltblatt	AC1YC2RIPAC3IAGERRYGTC2IYQGRLWAF3C1
RTD-1	Rhesus Affe	$\beta$ -Faltblatt	Cyclic RC1IC3TRGFC1RC2LC3RRGVC2
Histatin I	Mensch	erweitert (Histitinreich)	DSHEERHHGRHGHKKYGRKFHEKHSHRGYRSNY-LYDN

### 1.2.1 Defensine

Bei Defensinen handelt es sich um 3,5 – 4,5 kDa schwere Peptide, welche sich durch drei charakteristische Disulfidbrücken auszeichnen (97). Je nach Anordnung der Cystein-Reste bilden sich die Brücken an unterschiedlichen Positionen, wonach die De-

fensine in  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\theta$ -Defensine eingeteilt werden können. Weitere Charakteristika sind die kationische Ladung, der Arginin-reiche Aufbau und die fehlende Glycosilierung.

### 1.2.1.1 $\alpha$ -Defensine

Von den bisher bekannten sechs  $\alpha$ -Defensinen wurden die ersten vier aus neutrophilen Granulozyten isoliert, in denen sie in den azurophilen Granula als funktionsfähige Peptide lokalisiert sind und damit zur Abtötung von phagozytierten Mikroorganismen beitragen. Dabei werden neben grampositive und gramnegative Bakterien und Pilzen auch bestimmte Viren abgetötet. Aus der Lokalisation in neutrophilen Granulozyten resultiert auch der Name human neutrophil peptides (HNP1-4). HNP1-4 sind auch im Atemwegssekret vorhanden, wo sie von neutrophilen Granulozyten produziert werden, die in die Atemwege und das Alveolarlumen eingewandert sind. Zusätzlich zu HNP1-4 wurden in den Panethschen Zellen des Dünndarms und im weiblichen Genitaltrakt (81, 130) noch zwei weitere  $\alpha$ -Defensine isoliert, die human defensins 5 und 6 (HD5+6). Diese werden im Gegensatz zu HNP1-4 als pro-Peptid gelagert (36). Die genetische Information für  $\alpha$ -Defensine liegt auf Chromosom 8p23. Die fertigen Proteine bestehen aus 29-35 Aminosäuren, wobei ihre Disulfidbrücken an den Positionen 1-6, 2-4 und 3-5 lokalisiert sind, was den Peptiden einen dreisträngige  $\beta$ -Faltblattstruktur mit einer kationisch geladenen  $\beta$ -Haarnadel verleiht.

### 1.2.1.2 $\beta$ -Defensine

Aufgrund der unterschiedlichen Anordnung der Disulfidbrücken wurden die erstmals 1991 aus den Atemwegsepithelzellen von Rindern isolierten Peptide (tracheal AMP, TAP) (41)  $\beta$ -Defensine genannt. In der Folge wurden 13 weitere  $\beta$ -Defensine aus neutrophilen Granulozyten von Rindern isoliert. Beim Menschen sind bis jetzt vier  $\beta$ -Defensine bekannt. Ihre antimikrobielle Wirkung richtet sich gegen grampositive und gramnegative Bakterien und gegen Pilze. Ihre Länge beträgt 36-42 Aminosäuren und ihre Disulfidbrücken sind an den Positionen 1-5, 2-4 und 3-6 lokalisiert. Das erste hu-

mane  $\beta$ -Defensin (hBD-1) wurde aus einem großen Volumen von Hämofiltrat gewonnen (18) und wird in den Epithelzellen des Harn- und Atemtraktes konstitutiv exprimiert (110, 167). Neben hBD-1 produzieren Monozyten, Makrophagen und dendritische Zellen zusätzlich hBD-2, welches auch in den Atemwegen und anderen Körperoberflächen vorkommt (10, 144, 150). Dort stellt es einen der ersten Abwehrmechanismen gegen einwandernde Mikroorganismen dar. Die Produktion von hBD-2 findet dabei in den Epithelzellen selber statt. Die genetische Information für hBD-1 liegt wie für  $\alpha$ -Defensine ebenfalls auf Chromosom 8p23, nur ca 100 – 150kb von dem Gen für HNP-1 entfernt, was darauf hinweist, dass beide Proteine einen gemeinsamen Ursprung besitzen. Der Abstand der Geninformationen von hBD-1 und hBD-2 ist mit 500 – 600kb etwas größer. Dies lässt vermuten, dass in dieser Region zukünftig noch mehr Defensin-Gene identifiziert werden können. Die Konzentration von hBD-1 und hBD-2 in Atemwegssekreten liegt im Bereich von einigen ng/ml (144). Erstmals konnte hBD-1 jedoch chromatographisch aus Hautproben von Patienten mit Psoriasis isoliert werden. hBD-3 und hBD-4 wurden entweder durch Bioscreening und/oder parallele Datenbankrecherchen entdeckt (79, 140) und sind in menschlicher Milch sowie in Atemwegssekreten vorhanden (7, 77). Insgesamt wurden durch Genomanalyse 28 neue  $\beta$ -Defensine nachgewiesen.

### 1.2.2 Cathelizidine

In der Familie die Cathelizidine werden verschiedene Peptide zusammengefasst, die alle eine ähnliche Signalsequenz und Proregion am N-terminalen Ende besitzen (193). Ihr Name resultiert aus der Ähnlichkeit der Proregion mit Cathelin, einem aus neutrophilen Granulozyten von Schweinen stammenden Inhibitor von Cathepsin L. Der eigentliche, 12-80 Aminosäuren lange (96, 193) antimikrobielle Anteil befindet sich am C-terminalen Ende und zeigt eine beachtliche Heterogenität. Cathelizidine wurden bis jetzt nur in Säugetieren nachgewiesen (Mensch, Mäuse, Ratte, Schwein, Hase). Während bei Schweinen, Rindern und Schafen mehrere Cathelizidine bekannt sind, konnte bei Menschen und Mäusen bis jetzt nur ein Vertreter identifiziert werden. Das einzige Cathelizidin des Menschen, LL-37/hCAP-18, wurde durch Klonierung im humanen Knochenmark entdeckt (3) und erhielt seinen Namen aufgrund des Beginns mit zwei Leucin-

Resten und der Länge von 37 Aminosäuren. Die Bezeichnung hCAP-18 bezieht sich auf die kationische Ladung und die Masse des Peptids vor der weiteren Prozessierung (18kDa) (33). Neben der Expression in Myeloidzellen und entzündeter Haut kann auch im Atemwegssekret LL-37/hCAP-18 nachgewiesen werden (11). Der strukturelle Aufbau von LL-37/hCAP-18 zeigt eine hydrophobe N-terminale Domäne und eine  $\alpha$ -helikale Konformation. Für die bakterizide Wirkung des Peptids bedarf es noch der proteolytischen Aktivierung durch Enzyme wie der neutrophile Elastase oder der Peptidase 3 (147). Dabei wird der namensgebende N-terminale Anteil Cathelin vom C-terminalen Anteil abgespalten. Mittlerweile ist bekannt, dass nicht nur der N-terminale Anteil, sondern auch das C-terminale Cathelin antimikrobiell wirksam sind (192).

### 1.2.3 Regulation der Expression von antimikrobiellen Peptiden

Im Bezug auf die Expression können AMPs in zwei Gruppen eingeteilt werden: konstitutiv exprimierte und induzierbare. Ein Beispiel für konstitutiv gebildete AMPs ist humanes  $\beta$ -Defensin-1 (hBD-1) (122, 144). In vitro und in vivo Tests haben gezeigt, dass die Produktion einiger AMPs durch Kontakt mit bakteriellen Produkten, wie z.B. LPS (16) oder bakterieller DNA (126) und Immunmodulatoren, wie z.B. TNF- $\alpha$  oder IL-1 (59), induzierbar ist. Beispiele hierfür sind hBD-2, hBD-3, hBD-4, LL-37 und einige andere AMPs (59, 153, 164). Studien, in denen die Genexpression sowohl von TAP als auch von hBD-2 untersucht wurden, zeigten große Übereinstimmung im Bezug auf Regulationselemente und Signaltransduktion. So wird zum Beispiel die LPS-induzierte Genexpression durch den LPS Co-Rezeptor CD14 und durch TLR1-9 (in Atemwegen besonders TLR2 (21)) vermittelt, in dessen Folge es zu einer gesteigerten Aktivität von NF- $\kappa$ B kommt (164). Zusätzlich befinden sich an den 5'-Enden von TAP und hBD-2 Bindungsstellen für NF- $\kappa$ B, nuclear factor Interleukin 6 (NF IL-6) und STAT's (39, 40). In einer Studie wurde bewiesen, dass für eine LPS-induzierte TAP-Expression sowohl die NF- $\kappa$ B- als auch die NF IL-6-Bindungsstelle nötig sind (40). Zusätzlich wurde in dieser Studie gezeigt, dass die NF- $\kappa$ B-Bindung LPS induzierbar ist, wohingegen die NF IL-6 Bindung konstitutiv ausgeführt wird. Der Transkriptionsfaktor MEF wirkt in Epithelzellen als NF- $\kappa$ B-unabhängiger hBD-2-Aktivator (104). In den Epithelien der Atemwege übernehmen zusätzlich intrazelluläres Calcium und AP-1 diese Aufgabe (159).

Ferner kann in Atemwegsepithelzellen eine Steigerung der hBD-2-Expression durch einen LPS-induzierten CD14 Mechanismus stattfinden, der durch Zytokine von aktivierten Makrophagen kontrolliert wird (163). Diese Expressionssteigerung kann auch durch neutrophile Elastase vermittelt werden (55).

Die Expression von LL-37/hCAP-18 wird ebenfalls durch Entzündungen oder Infektionen induziert (3, 33).

Die Gene der AMPs weisen keine Besonderheiten gegenüber anderen Enzymen auf. Sie besitzen ebenfalls eine Intron-Exon-Struktur und die Gene von strukturell ähnlichen Peptiden befinden sich im Genom in Clustern angeordnet (49). Das Propeptid wird häufig intrazellulär gespeichert und bei Bedarf durch intrazelluläre oder extrazelluläre ( $\alpha$ -Defensine im Dünndarm durch die MetalloPeptidase Matrylisin (182)) Abspaltung der Propeptidsequenz aktiviert.

Als Beispiele für eine Verringerung der AMP-Produktion können Patienten mit atopischen Erkrankungen aufgeführt werden. Bei diesen können in Epithelzellen Zytokine nachgewiesen werden, welche die Downregulation von AMPs fördern (123). Diese Beobachtung korreliert mit der erhöhten Anzahl an Hautinfektionen bei diesen Patienten. Im Gegensatz zur Aktivierung ist über die Inaktivierung sehr wenig bekannt. Der Abbau von hBD-2 und hBD-3 scheint durch elastolytische Cathepsine gefördert zu werden (152). Die Inaktivierung von LL-37 kann zum einen durch pathogene Keime selbst (138) oder in den Atemwegen durch Bündelung mit F-actin und DNA (178) oder Bindung an Mucin (46) oder bakterielle Polysaccharide erfolgen (65).

### **1.2.4 Wirkungsweisen**

#### **1.2.4.1 Die antimikrobielle Wirkung**

Die Eigenschaft von AMPs, Mikroorganismen zu töten, steht in engem Bezug zu ihrer kationischen Ladung und ihrer Struktur. Aufgrund ihrer kationischen Ladung werden die AMPs von den anionisch geladenen Bestandteilen auf der Zellmembran von Bakterien, Viren, Pilzen und Protozoen angezogen (83). Dies geschieht schon bei einer minimalen Hemmkonzentration (MIC) von 0,1 – 10  $\mu\text{g/ml}$ . Die initiale elektrostatische Anziehung führt zu einer Bindung der AMPs mit der Zielmembran, die jedoch sehr unspe-



zifisch ist. Der Aufbau von AMPs ist allerdings so strukturiert, dass zusätzlich hydrophobe Bestandteile vorhanden sind. Dieser amphipatische Aufbau ermöglicht den AMPs die Penetration in die Membran. Je nach Fähigkeit der einzelnen AMPs kommt es zur Bindung und zur Anhäufung in der Zielmembran, was mit einer Destabilisierung der Membranen und dem nachfolgenden Zelltod verbunden ist. Zur Unterbrechung der Membran stehen den AMPs unterschiedliche Mechanismen zur Verfügung:

- Die Bildung von Fass-ähnlichen Transmembrankanälen (22)
- Die Zusammenlagerung der Peptide in unstrukturierten Gruppen, welche die kurzfristige Bildung von Membranporen ermöglichen (183)
- Die Umhüllung der mikrobiellen Zellen mit AMPs, wodurch es zu einem Verlust der Membran-Integrität kommt (64)

Die fehlende Aktivität der AMPs gegenüber körpereigenen Zellen wird verursacht durch den unterschiedlichen Aufbau der Zellmembran. Im Gegensatz zu bakteriellen Membranen enthalten die eukaryotischen Membranen bei neutralem pH in erster Linie ungeladene Lipide, was die elektrostatische Interaktion verringert.

Zusätzlich zu den Membraneffekten verfügen AMPs über eine intrazelluläre Wirkung, indem sie fähig sind, die Zellmembran zu überwinden (125). So konnte gezeigt werden, dass HNP-1 und human platelet microbicidal Peptid 1 (hPMP-1) durch Interaktion mit intrazellulären Prozessen ihre bakterizide Wirkung ausüben (184). Folgerichtig wurden durch eine Vorbehandlung von *Staphylococcus aureus* mit einem DNA-Gyrasemmer (Novobiocin) oder einem Peptid-Synthesemmer (Azithromycin) die mikrobiziden Eigenschaften von HNP-1 und hPMP-1 deutlich reduziert (184).

Die mikrobizide Wirkung von AMPs wurde neben den *in vitro* Tests auch durch *in vivo* Experimente bestätigt. Ein Beispiel hierfür ist die verzögerte Beseitigung von *Haemophilus influenzae* aus der Lunge bei  $\beta$ -defensin-1-defizienten Mäusen (112). Cathelin-related antimicrobial peptide (CRAMP) knock-out Mäuse zeigten eine stärkere Entzündungsreaktion auf eine Beimpfung der Haut (120) oder des Urogenitaltraktes (29) mit Bakterien. Die Wirkung von AMPs bezieht sich auch auf Viren, sowohl auf umhüllte als auch auf nicht-umhüllte. Dabei wird die Effekt entweder durch direkten Kontakt mit dem Virion oder durch die Wirkung auf das angeborene oder erworbene Immunsystem vermittelt (87). Im Gegenzug kann in einem bronchialen Xenograft-Modell der Zystischen Fibrose und in einem murinen Modell für Pneumonie durch eine Verstärkung

der LL-37-Produktion infolge eines viralen Gentransfer die Aktivität des angeborenen Immunsystems gesteigert werden (10, 13).

Wie bei konventionellen Antibiotika besteht auch bei AMPs die Gefahr der Entwicklung einer Pathogenresistenz. Bis jetzt ist allerdings noch keine komplette Resistenz aufgetreten. Der Grund hierfür liegt wahrscheinlich in den relativ unspezifischen Mechanismen der AMPs, welche es den Mikroorganismen nicht erlauben, spezifische Abwehrmechanismen zu entwickeln. Zusätzlich handelt es sich bei den Zielstrukturen der AMPs um lebenswichtige Bestandteile der Mikroorganismen, welche nicht ohne weiteres ersetzt werden können. Einige Bakterien haben geschickte Wege entwickelt, um ihrer Zerstörung zumindest teilweise zu entgehen. So besitzen Gonokokken ein Energieabhängiges Efflux-System für Protegrin 1, LL-37 und andere AMPs (142). Infiziert sich ein Patient mit Zystischer Fibrose mit *Pseudomonas aeruginosa*, kann dieser seine LPS-Struktur derartig verändern, dass es zu einer verminderten Empfindlichkeit gegenüber AMPs kommt (43). Durch Infektionen und chronische Entzündungen scheint es zu einer Verringerung der Transkription der AMPs zu kommen, wie man an der verminderten LL-37-Produktion bei gastrointestinalen Shigelleninfektionen sieht (78).

### **1.2.4.2 Die Wirkung auf Entzündung, Angiogenese, Wundheilung und das erworbene Immunsystem**

Zusätzlich zu ihrer bakteriziden Aktivität verfügen AMPs über andere biologische Wirkungen, vornehmlich auf eukaryote Zellen.

AMPs besitzen die Eigenschaft, die Entzündungsreaktion zu modulieren. Zum einen induzieren sie die Produktion von Zytokinen und Chemokinen (z. B. IFN- $\gamma$ , IL-8), zum anderen agieren sie selbst als Chemokine von bestimmten Zellen (Monozyten, Neutrophile, Eosinophile) und beeinflussen die Zellreifung in dendritischen Zellen (37). Während HNP1-3 die Chemotaxis über einen G-Peptid-gekoppelten Rezeptor vermitteln (28, 190), binden hBD-1 und hBD-2 an den Chemokinrezeptor CCR6 (191), der auf unreifen dendritischen Zellen und auf Gedächtnis-T-Zellen exprimiert wird. Ferner können hBD-2 und LL-37 über einen G-Peptid-gekoppelten Rezeptor Mastzellen stimulieren, was zur Ausschüttung von Histamin führt. Dies geschieht in Abhängigkeit von Phospholipase C (117). Genauso wie hBD-2 kann LL-37 die mitogen-activated Peptid

kinase (MAP-Kinase) p38 und die extracellular-signal-regulated kinase-1/2 (ERK1/2) auf Mastzellen, Keratinozyten und Monozyten aktivieren (24, 27, 118).

Neben diesen aktivierenden Einflüssen auf die Entzündungsreaktion können AMPs die Immunantwort auch abschwächen. Durch die Bindung von LPS wird dessen Bindung an LPS-binding-Peptid oder an Entzündungszellen (z. B. Makrophagen) verhindert, wodurch diese nicht aktiviert werden (115). Zusätzlich kommt es nicht zu einer Produktion proinflammatorischer Enzyme (z. B. TNF- $\alpha$ ), wodurch die Immunantwort weiter unterdrückt wird. Durch diese Mechanismen wird eine überschießende Immunantwort verhindert. Gleichzeitig kann im Falle eines Endotoxinschocks das LPS gebunden werden und so als Auslöser des Schocks eliminiert werden.

Durch die Wirkung auf T-Zellen stellen die AMPs eine Verbindung zwischen angeborenen und erworbenen Immunsystem her. Diese Rolle wird durch eine Studie verdeutlicht, in der gezeigt wurde, dass ein synergistisches Arbeiten von Lymphozyten und AMPs eine gesteigerte Beseitigung von Mikroben bewirkte (56). Durch in vitro Studien konnte nachgewiesen werden, dass menschliche Defensine die Proliferation und die Zytokinantwort von CD4<sup>+</sup>T-Zellen verstärken. Dies geschieht entweder durch Induktion der IFN- $\gamma$ -, IL-10- oder IL-6-Produktion oder durch eine Veränderung in der Produktion von costimulierenden Faktoren (100). Die Bestätigung durch in vivo Tests erfolgte durch eine gesteigerte Produktion von Antigen-spezifischen Antikörpern in Mäusen nach Applikation von HNP oder hBD zusammen mit Ovalbumin (25). Gleichzeitig können humane  $\alpha$ -Defensine und  $\beta$ -Defensine von Mäusen die Bildung von Antigen-spezifischen zytotoxischen T-Zellen fördern, wodurch die Th1-abhängige Immunantwort und eine mögliche anti-Tumor-Immunität verstärkt wird (20, 100).

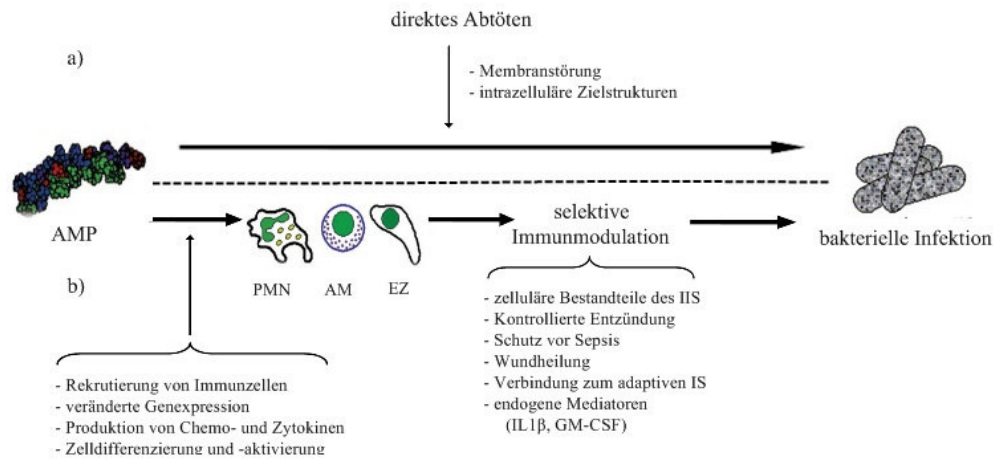


Abb. 3: Die antiinfektiöse Wirkungsweise der antimikrobiellen Peptide

AMPs können auf zwei Weisen ihre bakterizide Wirkung entfalten: a) der direkte Weg durch Destabilisierung der Zellmembran mit anschließender Lyse der Zelle oder durch das Binden an intrazelluläre Zielstrukturen; b) durch die Wirkung von AMPs kommt es zu einer Immunantwort der Monozyten, Epithelzellen und polymorphkernigen Leukozyten. Dabei kommt es zu einer veränderten Genexpression, Produktion von Zytokinen, Zellrekrutierung bzw. -aktivierung und einer Chemotaxis. Das Resultat ist die weitere Induzierung des IIS, was zu einem Schutz vor Infektionen und Sepsis, einer Regulierung der Immunantwort und einer Induzierung der Wundheilung führt. Zusätzlich wird auch das adaptive IS aktiviert

Des Weiteren spielen AMPs eine Rolle bei der Angiogenese. LL-37 vermittelt seine angiogene Aktivität über den G-Peptid-gekoppelten formyl-peptid receptor-like 1 (FPRL1), der auf Makrophagen, Neutrophilen, Lymphozyten, Keratinozyten, Epithel- und Endothelzellen vorkommt (88). Durch die Aktivierung der Endothelzellen und die Rekrutierung von Neutrophilen und Makrophagen kommt es zur Angiogenese (117). Auch der Vertreter der Cathelizidine beim Schwein, PR-39, kann sowohl in vivo als auch in vitro eine Angiogenese induzieren (98). Dabei bindet es an die  $\alpha$ 7-Untereinheit des 26S Proteasoms und beeinflusst dadurch den Ubiquitin-Proteasom-Weg ohne auf die Aktivität der Proteasomen im gesamten Einfluss zu nehmen (51). Zusätzlich blockiert PR-39 den Abbau von NF- $\kappa$ B durch relativ selektive Inhibierung der proteosomalen Degradierung von I $\kappa$ B $\alpha$  (51).

LL-37 übernimmt einen wichtigen Part im Wundheilungsprozess. Dabei fördert es die Proliferation und Migration von epidermalen Zellen durch die Aktivierung des epidermal growth factor receptor (EGFR) (117, 158). In den Atemwegen geschieht dies durch

eine gesteigerte Aktivität der MAP-Kinase ERK und gesteigerte Abgabe von IL-8 (1). Im Gegensatz dazu konnte gezeigt werden, dass die Reepithelialisierung von Hautwunden durch Antikörper gegen LL-37 verhindert werden kann (63).

### **1.3 Die Rolle antimikrobieller Peptide und des angeborenen Immunsystems bei Erkrankungen der Lunge**

Die Rolle der AMPs bei Lungenerkrankungen ist bis jetzt noch nicht vollständig geklärt. Es zeigt sich jedoch eine erhöhte Defensin-Konzentration im Plasma von Patienten mit einer idiopathischen Lungenfibrose (9). Gleichzeitig kann in den Atemwegssekreten von Patienten mit zystischer Fibrose, chronischer Bronchitis,  $\alpha$ -1-Antitrypsin-Mangel oder adult respiratory distress syndrom (ARDS) ein erhöhter Defensin-Spiegel beobachtet werden (8, 145, 148). Bei Patienten mit diffuser Panbronchiolitis steigt die Defensinkonzentration in der bronchioalveolären Lavage (BAL) (9). Den erhöhten AMP-Konzentrationen werden hauptsächlich regulatorische Funktionen zugeschrieben, da sie auf indirekte Weise die Produktion von TNF- $\alpha$  (171), IL-8, secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) und Mucin steigern (2, 172).

Bei einem  $\alpha$ -1-Antitrypsin-Mangel binden Defensine zusätzlich das restliche  $\alpha$ -1-Antitrypsin, worauf diese Peptide ihre Fähigkeit verlieren, neutrophile Elastase zu neutralisieren. Klinisch kann daraus ein Fortschreiten der Epithelschädigung und der Emphysembildung resultieren. Weiterhin trägt zum Fortschreiten der Epithelschäden bei, dass durch Defensine die Glutathion-Konzentration gesenkt wird, wodurch die Epithelzellen einem höheren oxidativen Stress ausgesetzt sind (99, 131).

Zusätzlich unterstützen AMPs die Kolonisierung der unteren Atemwege mit Bakterien, hauptsächlich *Haemophilus influenzae*. Bei Versuchen in der Zellkultur konnte ein verbessertes Anhaften von *H. influenzae* an Atemwegsepithelzellen unter dem Einfluß von Defensinen beobachtet werden (54). Ein möglicher Grund für diese Wirkung ist die Exposition der Keime gegenüber einer erhöhten Konzentration von anderen AMPs, wie z.B.  $\beta$ -Defensinen oder SLPI, die in den Epithelzellen produziert werden (67), wodurch die Abtötung der Mikroorganismen erfolgt.

Bei einer weiteren pulmonalen Erkrankung, der zystischen Fibrose, kommt es durch einen Defekt des CF transmembrane conductor regulator Gens (CFTR) zu erhöhten Cl-

Konzentration im Atemwegssekret. Dies führt zur Inaktivierung von Defensinen (12, 144), was sich klinisch in einer erhöhten Anzahl an pulmonalen Infekten äußert. Zusätzlich zu der verminderten Abwehrleistung haben hohe AMP-Konzentrationen einen proinflammatorischen Effekt und wirken zytotoxisch auf das Atemwegsepithel. Dadurch wird die Entzündung gefördert und die Lungenfunktion weiter geschwächt.

### 1.3.1 Die ambulant erworbene Pneumonie (CAP)

Obwohl eindringende Erreger einer Vielzahl von konstitutiv gebildeten Abwehrmechanismen ausgesetzt sind, ist für die Initiierung einer suffizienten Immunantwort die Interaktion der Pathogene mit pulmonalen Gewebezellen und klassischen Immunzellen von zentraler Bedeutung (68, 196). Dabei spielen die AM eine entscheidende Rolle. In der Frühphase sind sie hauptsächlich für direkte antimikrobielle Effekte, z. B. durch Phagozytose und für die Initiierung der Entzündung durch mikrobizide und chemotaktische Zytokine verantwortlich (47, 109). In der Spätphase phagozytieren AM eingewanderten neutrophilen Granulozyten nach deren Apoptose (34). Die polymorphkernigen Granulozyten sind als potente Phagozyten und als Produzenten von proinflammatorischen Mediatoren ein wichtiger Bestandteil des IIS, bei deren Fehlen die Resistenz gegenüber bakteriellen Infekten deutlich verringert ist (162). Als dritter zellulärer Bestandteil der Infektionsabwehr wirkt das Atemwegsepithel, das eben seiner Funktion als mechanische Barriere inhalierte Pathogene erfassen und mit einer erhöhten Produktion von humoralen Abwehrstoffen (AMP, SP-A, SP-D) reagieren kann.

Bereits frühzeitig im Verlauf einer Pneumonie kommt es zur Erhöhung von Zytokinen. Die erhöhten Spiegel von  $\text{TNF-}\alpha$  und  $\text{IL-1}\beta$  aktivieren Phagozyten, was zu einer erhöhten Phagozytose- und Oxidierungsrate und Peptidfreisetzung sowie zum Abtöten von Bakterien führt (94). Zusätzlich zu den Zytokinen produzieren AM auch viele Proteasen, wie z.B. Plasminogen Aktivator, Kollagenasen, Elastasen und Oxidantien. Neben deren Effekt auf die Pathogene kommt es zu einer Schädigung der physiologischen Lungenarchitektur. Auch Defensine können solche Epithelschäden verursachen (170). Das Resultat dieser Wirkung ist die Bildung von Lungenödemen und Emphyseblasen. Sowohl für Tiere als auch für Menschen gibt es Beweise, dass durch erniedrigte Zytokinpiegel eine Infektion gefördert wird.  $\text{IFN}\gamma$  KO-Mäuse bei einer Infektion mit Kleb-

siella pneumoniae eine verminderte IL-6 und IL-1-Produktion in der frühen Infektionsphase, eine erhöhten Bakterienzahl und ein verringertes Überleben (122). Vergleichbare Studien gibt es auch für Menschen. In diesen wird klar, dass neben der gesteigerten Empfindsamkeit für Infektionen bei niedrigen Zytokinspiegeln die Gefahr für eine überschiessende Immunantwort mit septischen Schock bei zu hohen Zytokinspiegeln besteht. So zeigen Patienten mit dem TNF- $\alpha$ -308A und dem TNF- $\alpha$ -238A Polymorphismus einen erhöhten Schweregrad der CAP mit der Gefahr des respiratorischen Versagens und des septischen Schock (45, 176).

### **1.3.2 Die chronisch-obstruktive Lungenerkrankung (COPD)**

Neben der in der Atmosphäre vorkommenden Verschmutzung ist vor allem langwieriger Tabakkonsum ein Hauptrisikofaktor für die Entwicklung einer COPD. Durch die Exposition mit Zigarettenrauch kommt es zu einem Zusammenbruch der Epithelbarriere (82) und der Initiierung einer akuten Entzündungsreaktion, sowohl pulmonal (71) als auch systemisch (4, 38). Neben den residenten bzw. einwandernden Immunzellen (AM, PMN, Mastzellen, NK) und Epithelzellen spielen vor allem TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  durch Initiierung der Immunantwort eine wichtige Rolle.

Zusätzlich entsteht durch die Einatmung von Zigarettenrauch ein Ungleichgewicht zwischen Oxidantien und Antioxidantien zugunsten eines erhöhten oxidativen Stresses (113, 165). Zusammen mit anderen Veränderungen in der Regulation proinflammatorischer Peptide trägt dies zur verstärkten Entzündung bei Rauchern bei.

Wie bei der Pneumonie kommt es auch bei der COPD zu einer Zerstörung der Organstruktur durch Peptidasen und damit zu Emphysembildung. Verantwortlich hierfür sind vor allem die neutrophile Elastase aus neutrophilen Granulozyten, aber auch epitheliale Peptidasen wie MetalloPeptidase 1 (MMP-1) (75)

### **1.3.3 Asthma bronchiale**

Bei der Pathogenese des Asthmas sind sowohl das angeborene als auch das erworbene Immunsystem beteiligt. Beim allergischen Asthma handelt es sich um eine IgE-

vermittelte Reaktionen vom Soforttyp. Durch die anschließende Einwanderung von eosinophilen Granulozyten und Th2-Zellen kommt es zur chronischen Entzündung. Dendritische Zellen (DC) als Vertreter des IIS durchlaufen nach Allergenbindung und –prozessierung einen Reifungsprozess. Durch vermehrte Bildung des Chemokinrezeptors 7 (CCR7) (134) induzieren sie in die mediastinalen Lymphknoten eine T-Zell Antwort (14, 57).

Auch AMPs spielen bei der Asthma-Pathogenese eine Rolle. Bei Patienten mit einer Asthma-Exazerbation kommt es zu einer verstärkten Migration von neutrophilen Granulozyten ins Atemwegssekret und in die Wände der Atemwege (44). Dadurch kommt es zu erhöhten AMP-Spiegeln, was die Reagibilität gegenüber Allergenen noch weiter erhöht. Weiterhin fördern Defensine die Histaminfreisetzung aus Mastzellen (169) und die Reagibilität der Trachea auf Histamin (168).

### **1.4 Kompetenznetzwerk ambulant erworbene Pneumonie (CAPNetz)**

Mit ungefähr 2-3 Millionen Fällen allein in den USA und damit verbundenen 10 Mio. Hausarztkontakten sowie 500.000 Krankenhauseinweisungen ist die ambulant erworbene Pneumonie die häufigste Infektionskrankheit in der westlichen Welt (103). Die anfallenden Kosten zur Behandlung betragen in den USA 8 Mrd. US-\$. Im Bericht des statistischen Bundesamtes für 2006 sind für Deutschland 20.434 Fälle von Grippe oder Pneumonien aufgeführt, wobei ein Großteil im Alter > 65 Jahren auftritt. In diesem Alter treten auch die meisten Todesfälle der CAP auf, bei einer Gesamtmortalität von 6-8%. Bei 19.713 Patienten konnte kein Erreger festgestellt werden. Außerdem kann aus diesen Zahlen keine Differenzierung zwischen einer ambulant oder einer nosokomial erworbenen Pneumonie erfolgen. Anhand dieser Beispiele wird die schlechte Datenlage über die CAP im Bezug auf Erregerspektren, Resistenzen, Verlauf und Kosten deutlich. Ausgehend von dieser Situation fördert das Bundesministerium für Bildung und Forschung (BmBF) seit 2001 das Kompetenznetzwerk ambulant erworbene Pneumonie (CAPNetz). Im Jahr 2007 wurde die CAPNetz-Stiftung gegründet, um auch nach dem Auslaufen der Förderung durch das BmBF die Arbeit fortsetzen zu können



### 1.4.1 Ziele von CAPNetz

CAPNetz ist ein interdisziplinäres Netzwerk, bei der verschiedenste medizinische, aber auch soziologische und betriebswirtschaftliche Abteilungen zusammenarbeiten. Die gesammelten Daten werden in zentralen Datenbanken gespeichert und stehen zur weiteren Bearbeitung den verschiedenen Projekten zur Verfügung.

Das langfristige Ziel von CAPNetz ist die Verbesserung der Versorgungsqualität von betroffenen Patienten. Dafür sind u.a. folgende Maßnahmen nötig (180):

- Sammeln und Interpretation von klinischen und mikrobiologischen Daten
- Evaluierung von Therapieempfehlungen
- Verbesserung der Prävention durch Evaluierung von Impfprogrammen
- Aufbau von Datenbanken über Erreger, Stämme und Resistenzen
- Verbesserung von ökonomischen Einsatz und Therapieerfolg

Ein besonderes Augenmerk liegt auf der Integration von klinischer Forschung und Grundlagenwissenschaft. Durch eine steigende Anzahl an Resistenzen gewinnen neue Therapieansätze auf der Ebene der initialen Pathogenerkennung und der anschließenden Signalkaskade zunehmend an Bedeutung.

### 1.5 Fragestellung

AMPs sind Effektormoleküle der angeborenen Immunantwort. Sie haben sowohl antimikrobielle als auch immunmodulatorische und regenerative Funktionen. Es ist bekannt, dass AMPs bei Infektionen der Lunge vermehrt in das Atemwegssekret abgegeben werden. Allerdings gibt es bis jetzt keine Daten über die Rolle und die Konzentration der AMPs bei der ambulant erworbenen Pneumonie.

Das Ziel der Arbeit ist es deswegen, AMPs in den Atemwegssekreten von Patienten mit ambulant erworbener Pneumonie nachzuweisen. Gleichzeitig soll durch die Konzentrationsmessung gezeigt werden, dass die AMP-Expression bei diesen Patienten gegenüber gesunden Menschen gesteigert ist. Da hier unterschiedliches Untersuchungsgut zur Verfügung stand (Sputum, BAL), ist es zusätzlich die Absicht, die Eignung der verschiedenen Materialien für die Messung der AMP-Konzentration zu bewerten.

Zusätzlich zu der rein deskriptiven Analyse der AMP-Konzentration sollen mit Hilfe der Anamnese- und Untersuchungsbefunde (Mikrobiologie, klinische Chemie) aus der CAPNetz-Studie eine Korrelationsanalyse durchgeführt werden. Dabei sollen folgende Fragen analysiert werden:

- zeigen Raucher eine niedrigere Konzentration von AMPs und sind dadurch empfänglicher für eine Pneumonie.
- gibt es Zusammenhänge zwischen der Höhe der AMP-Konzentration und der Konzentration von Entzündungsparametern (z.B. CRP, Leukozyten) im Blut.
- Charakterisierung des Zusammenhangs zwischen den mikrobiologischen Untersuchungsergebnissen und den AMP-Spiegeln.
- Eignet sich die AMP-Konzentration als diagnostischer oder prognostischer Marker für die ambulant erworbene Pneumonie.

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Patienten**

#### **2.1.1 Patientenrekrutierung**

Das verwendete Patientenmaterial wurde vom Kompetenznetzwerk ambulante Pneumonie (CAPNetz) zur Verfügung gestellt. Die initiale Rekrutierung und Datenerfassung fand durch insgesamt 670 niedergelassene Ärzte und 30 Krankenhäuser statt (179). Diese wurden von insgesamt neun lokalen klinischen Zentren (LCC) koordiniert. Ziel war es, einen Patientenpool von ca. 5000 Patienten aufzubauen. Falls ein Patient die Einschlusskriterien erfüllte bzw. Ausschlusskriterien nicht erfüllte, wurde der Patient von einem CAPNetz-Arzt in die Studie eingeschleust und untersucht. Zusätzlich wurden verschiedene Untersuchungsmaterialien (Blut, Sputum, Urin) für die Routinediagnostik und die einzelnen CAPNetz-Projekte gewonnen und mikrobiologisch aufgearbeitet. In die weitere Therapie griff die CAPNetz-Studie nicht ein. Es fand lediglich eine Dokumentation der Therapie und eine Verlaufskontrolle nach vier Wochen und sechs Monaten statt.

#### **2.1.2 Ein- und Ausschlusskriterien für CAPNetz**

Um in die CAPNetz-Studie aufgenommen zu werden mussten die Patienten neben einer unterschriebenen Einverständniserklärung mindestens ein Kriterium aus den folgenden Bereichen erfüllen:

- Alter  $\geq 18$
- Infiltrat im Röntgen-Thorax, bei Nichtvorliegen Fieber  $\geq 38,3^{\circ}\text{C}$  (rektal) oder  $\geq 37,8^{\circ}\text{C}$  (axillar/oral/aurikulär)
- Husten, purulentes Sputum, positiver Auskultationsbefund

Ausschlusskriterien für eine Aufnahme waren:

- Stationärer Krankenhausaufenthalt in den letzten 28 Tagen
- Zytostatikatherapie in den letzten 28 Tagen bzw. Neutropenie mit Neutrophilen  $<1000/\mu\text{l}$
- Immunsuppressive oder Steroidtherapie
- HIV-Infektion oder floride Tuberkulose

### 2.1.3 CAPNetz-Proben

Zur Messung der AMP-Konzentrationen standen insgesamt 104 Sputumproben und 11 Bronchiallavagen (BAL) von Patienten aus der CAPNetz-Studie zur Verfügung. Das Durchschnittsalter der Patienten betrug 64, der jüngste Patient war 18 und der älteste 96 Jahre alt. Bei den Sputumproben handelte es sich um spontanes Morgensputum und nicht um Sammel- oder induziertes Sputum. Eine Bronchiallavage fand vorwiegend bei klinisch schwereren Erkrankungen und bei hospitalisierten Patienten statt, wobei die Beurteilung des Schweregrades nach dem CRB-65 erfolgte. Dabei werden für den Blutdruck (syst.  $< 90$ ), die Atemfrequenz ( $>30$ ), den mentalen Zustand (Verwirrung) und das Alter ( $> 65$ ) jeweils 1 Punkt vergeben. Ab insgesamt 2 Punkten ist eine Krankenhauseinweisung sinnvoll.

BAL und Sputum unterscheiden sich hauptsächlich durch ihren Ursprungsort. Während das Sputum aus den proximalen, eher zentral gelegenen Lungenabschnitten stammt, stellt die BAL eine Probe aus den weiter peripheren Lungenbereichen dar. Des Weiteren unterscheiden sie sich bei gesunden Menschen in ihrer Zellzusammensetzung. Während im Sputum hauptsächlich neutrophile Granulozyten gefunden werden, sind in der BAL vorwiegend Lymphozyten und Makrophagen zu finden (106). Dem Vorteil der BAL, dass keine Kontamination durch Speichelflüssigkeit erfolgt, stehen die mögliche Verdünnung der Probe und die Lavage von nicht betroffenen Arealen gegenüber.

Bei der Probengewinnung wurde ein Mindestvolumen von mindestens 1 ml gefordert, besser waren 5 ml. Das gewonnene Patientenmaterial wurde bei  $-80^{\circ}\text{C}$  tiefgefroren und unter Einhaltung der Kühlkette an eine zentrale Serviceeinheit geliefert. Dort wurden die Proben aliquotiert und sowohl eine Routine- als auch eine Zusatzdiagnostik durch-

geführt. Ein Teil des Materials wurde dann an die verschiedenen CAPNetz-Projekte versendet. Die zur Verfügung stehenden Proben hatten ein Volumen von ca. 300-500 µl. Dabei waren die Spututproben in ihrer Konsistenz sehr inhomogen, z.T. flüssig, aber teilweise auch mit Schleim- und Eiterflocken. Die BAL waren alle flüssig und ohne Trübung.

Zusätzlich zu den Proben standen noch anamnestische und klinische Datensätze aus der zentralen CAPNetz-Datenbank zur Verfügung. Diese wurden später für die statistische Auswertung der Laborergebnisse genutzt. Die anamnestischen Daten umfassten Angaben:

- zu klinischen Symptomen
- zur Krankengeschichte: Begleiterkrankungen, Raucherstatus, Tumorerkrankungen, sonstige chronische Erkrankungen
- zur Medikamentenanamnese, v.a. Antibiotika
- zum Impfstatus

Zusätzlich lag ein körperlicher Untersuchungsbefund vor.

Das verwendete Patientenmaterial wurde klinisch-chemisch und mikrobiologisch aufgearbeitet. Dabei wurden zytologische und kulturelle Untersuchungen und eine Speziesidentifikation und Resistenzbestimmung bei Erregernachweis durchgeführt.

## Eingangsuntersuchung

**Untersuchungsdatum**                         .    .

**Begleiterkrankungen und besondere Risikofaktoren**

**Patient kommt aus Pflegeheim**     ja                       nein

**In den letzten 12 Monaten geraucht**  ja                       nein

**Packyears**                                     

Packyears = durchschnittl. Anzahl gerauchter Zigaretten in Packungen (20 Zig/Pack) pro Tag x Anzahl Jahre

Abb. 4: Dokumentation über den Raucherstatus bei der Eingangsuntersuchung

**Mikrobiologie**

Entnahme vor erster oder mind. 36 h nach letzter Antibiotikagabe  ja  nein

Sputum  ja  nein

Wenn Sputum „ja“, dann bitte weiter mit „Zytologie respiratorischer Sekrete (10fache Vergrößerung)“.

**Zytologie respiratorischer Sekrete (Objekt 10, Okular 10x)**

Leukozyten  <10 pro GF  ≥10 ≤25 pro GF  >25 pro GF  Not done

Epithelien  <10 pro GF  ≥10 ≤25 pro GF  >25 pro GF  Not done

**Kulturelle Untersuchung**

Erreger gefunden  ja  nein

Haupterreger: \_\_\_\_\_

Keimzahl: \_\_\_\_\_

<input type="checkbox"/>	- entspricht $\leq 10^2$ KBE/ml
<input type="checkbox"/>	(+) entspricht $10^3$ KBE/ml
<input type="checkbox"/>	+ entspricht $10^4$ KBE/ml
<input type="checkbox"/>	++ entspricht $10^5$ KBE/ml
<input type="checkbox"/>	+++ entspricht $\geq 10^6$ KBE/ml

Abb. 5: Mikrobiologischer Untersuchungsbefund für Sputumproben

## 2.2 Extraktion der Sputumproben

Die im gelieferten Sputumproben enthaltenen Bestandteile (Schleim, Eiter, Blut) verhindern durch Bindung der antimikrobiellen Peptide die korrekte Messung der Peptide. Um diese Bindung zu lösen und damit die Gesamtkonzentration messen zu können, wurden die Proben extrahiert.

Hierfür wurde in jede Proben das jeweils 1,5 fachen Volumen Acetonitril (T195, Roth, Karlsruhe) pipetiert und zusätzlich mit 1% des dabei entstehenden Gesamtvolumens Essigsäure versetzt. Anschließend folgte die Inkubation der Proben bei 37°C für eine Stunde. Für die folgenden Arbeitsschritte wurde neben der 100%igen Acetonitrillösung noch eine 20%ige Acetonitrillösung hergestellt. Zunächst wurde eine Extraktionssäule (WAT051910, Waters, Milford, USA) mit der 100%igen Lösung befeuchtet und dann mit der 20%igen Lösung konditioniert. Anschließend erfolgte die Ladung der Säule mit der Probe, welche vorher noch mit Wasser verdünnt wurde. Im Anschluss daran folgte ein Waschschriff mit 20%igem Acetonitril, um die störenden Fremdstoffe aus der Probe herauszuwaschen. Zuletzt wurde mit 100%iger Lösung das die restliche Probe aus der Säule ausgewaschen und in einem Glasröhrchen aufgefangen. Als letzter Arbeitsschritt

folgte die Eindampfung des Eluats mit Hilfe einer Speed-Vac (Bachofer, Reutlingen) und die anschließende Lösung des entstandenen Pellets in dem gleichen Volumen Wasser wie in der Originalvorlage.

## 2.3 AMP-ELISAs

### 2.3.1 hBD2-ELISA

Für den hBD2 ELISA wurde ein Sandwich-Verfahren benutzt. Dabei wird eine bestimmte Menge Antikörper an einen festen Träger gebunden. An diesen lässt man das unbekannte Antigen und eine Reihe von Standardlösungen binden. Nachdem ungebundene Anteile gewaschen wurden, kann mit Hilfe eines Enzym-gekoppelten Indikatorantikörpers die Antigenkonzentration bestimmt werden. Je höher die Antigenkonzentration war, desto stärker sind die Antikörperbindung und damit das Signal.

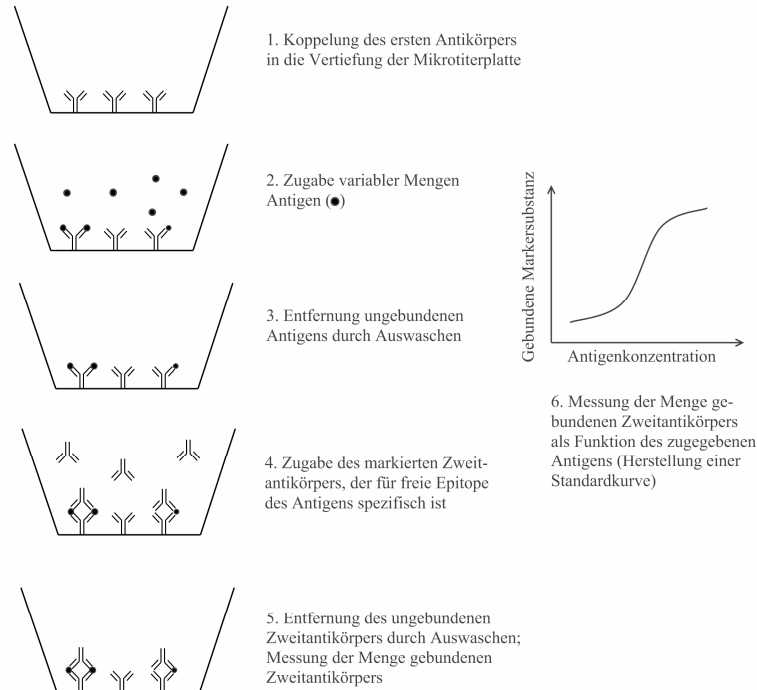


Abb. 6: Das Prinzip des hBD2-ELISA

Die Durchführung des hBD2-ELISAs dauerte drei Tage. Zu Beginn erfolgte die Beschichtung einer 96-well-ELISA-Platte (439454, Nunc, Wiesbaden) mit jeweils 100 µl eines capture Antikörpers (eigener Antikörper). Hierfür wurden 48 µl in 12ml Beschichtungspuffer (0,42 NaHCO<sub>3</sub> in 100 ml H<sub>2</sub>O, pH 9,6) gelöst. Es folgte eine Inkubation der beschichteten Platte über Nacht bei 4°C im Kühlschrank.

Am folgenden Tag wurde nach dreimaligen Waschen mit Waschpuffer (1 Liter PBS + 1g Tween 20 (9172, Roth, Karlsruhe) die Platte für 3 Stunden bei 37°C geblockt (3ml Gelatine-Hydrolysat (Cat.-Nr. 11112589001, Roche Diagnostics) auf 30 ml H<sub>2</sub>O => 300 µl / well). Es folgte wieder ein dreimaliger Waschvorgang. Im folgenden Arbeitsschritt wurde eine Standardreihe hergestellt. Hierfür wurden die wells B1+2 bis H1+2 mit 100 µl Diluent (1g BSA (A3059, Sigma-Aldrich, München) auf 100 ml PBS) und anschließend A1+2 und B1+2 mit 100 µl einer hBD2 Lösung (12,5 ng / ml) befüllt. Dem schloss sich die Durchmischung von B1+2, die Entnahme von 100 µl und deren Befüllung in C1+2 an. Dieser Vorgang wurde bis G1+2 wiederholt. H1+2 war der Leerwert. So enthielt die Standardreihe Konzentrationen von 12,5 ng / ml bis 0,15 ng / ml. In die wells A3+4 bis H11+12 wurden nun die Proben jeweils als Doppelwert gefüllt. Anschließend fand wieder eine Inkubation der Platten über Nacht bei 4°C statt.

Zur Detektion wurden 100µl/well eines Antikörpers aus Ziegen verwendet (AB9871, Abcam, Cambridge, UK) (12 µl in 12 ml Diluent). Nach einer Inkubationszeit von 1h bei Raumtemperatur (RT) wurde wieder dreimal gewaschen. Als Sekundärantikörper wurde ein HRP-gekoppelter anti-Ziege Antikörper verwendet (0,5 µl / 20ml Diluent; 100 µl / well) und wieder eine Stunde bei RT auf dem Schüttler inkubiert. Als Substrat für die HRP wurde anschließend TMB (Tetramethylbenzidine) (CL07, Calbiochem, San Diego, USA) zugegeben und 8 Min. in Alufolie lichtdicht verschlossen. Anschließend wird der Substratumsatz mit 100 µl H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> / well gestoppt und die OD bei 490 nm im ELISA-Reader (Ultra 384, Tecan, Schweiz) gemessen.



### 2.3.2 LL-37 ELISA

Das Prinzip und die Reihenfolge der einzelnen Arbeitsschritte des LL-37 ELISA entsprechen denen eines antibody-capture-assay. Der Unterschied besteht darin, dass nicht nach Antikörper- sondern nach Antigenkonzentrationen gemessen wird.

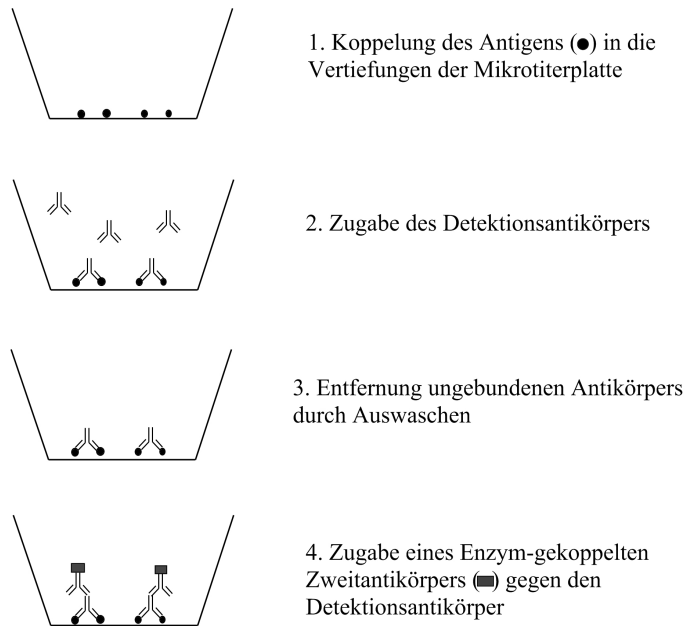


Abb. 7: Das Prinzip des LL-37-ELISA

Der LL-37-ELISA dauert insgesamt zwei Tage. Am Beginn stand die Herstellung einer Standard-Verdünnungsreihe. Hierfür lag synthetisches LL-37 als Lösung mit 1mg/ml aus der Charité in Berlin vor. Dieses wurde dann mit Diluent auf eine Konzentration von 1 µg / ml verdünnt. Wie für den hBD2-ELISA fanden auch hier 96-well-Platten Anwendung. In die wells B1+2 bis H1+2 wurden nun 100 µl Diluent pipetiert. Danach erfolgte die Befüllung der wells A1+2 und B1+2 100µl mit der vorher hergestellten Standardlösung. Die 200 µl in B1+2 wurden nun durchmischt, 100 µl entnommen und in C1+2 gefüllt. Dieser Vorgang wurde wiederholt bis H1+2. G1+2 war der Leerwert. Dadurch erhält man eine Verdünnungsreihe von 1µg/ml bis 15,625 ng / ml. Nun wurden die einzelnen Proben mit Diluent 1:1 verdünnt und jeweils als Doppelwert in die wells

A3+4 bis H11+12 eingefüllt. Anschließend wurde die Platte mit einer Folie versiegelt und über Nacht bei 4°C in den Kühlschrank gestellt.

Zu Beginn des zweiten Tages stand das dreimalige Waschen mit Waschpuffer. Anschließend wurden die Platten mit Blockingreagent für 2h bei 37°C (mit Folie) geblockt, um danach wieder dreimal gewaschen zu werden. Zur Detektion wurden jeweils 100 µl eines Mausantikörper gegen LL-37 mit einer Konzentration von 8 µg / ml (100 µl / 12ml Diluent) verwendet. Dieser wurde für eine Stunde auf einem Schüttler inkubiert. Nach dem folgenden dreimaligen Waschen wurden die Platten mit je 100 µl eines HRP-konjugierten Antikörpers gegen Maus-Ig (2 µl auf 12 ml Diluent) (1858413, Pierce, Rockford, USA) für eine Stunde auf einem Schüttler inkubiert. Nach einem letzten Waschvorgang werden 100 µl TMB/well als Substrat für die HRP eingefüllt und für 8 min. mit Alufolie umwickelt inkubiert. Anschließend wurde der Substratumsatz mit 100 µl H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/ well gestoppt und die OD bei 490 nm im ELISA-Reader (Ultra 384, Tecan, Schweiz) gemessen.

### **2.4 LL-37 Western-Blot**

Zur Vorbereitung des Western-Blots wurden 10µl der extrahierten Sputumproben zusammen mit 10 µl Laemmli-Puffer (25 ml 4xTris/HCl, pH 6,8 (0,1M), 20 ml Glycerol (20% (w/v)) (K929, Roth, Karlsruhe) für 10 min bei 96°C gekocht. Die Vorbereitung der Positivkontrolle erfolgte auf gleiche Weise, nämlich aus 20 µl LL-37-Verdünnung (1µg/ml), 10 µl Laemmli-Puffer und 10 µl PBS. Anschließend wurden sowohl die vorbereiteten Proben und Standard als auch 10 µl Marker (LC5925, In vitrogen, Karlsruhe) in jeweils eine Tasche eines SDS-Gels (10-15% Tris-HCl Polyacrylamid Gel, Biorad, München) gefüllt. Der für die Elektrophorese verwendete Puffer war ein SDS-Laufpuffer und bestand aus Tris, Tricin und SDS. Zu Beginn lag dem Gel eine Spannung von 60 V an, nach 30 Minuten erfolgte die Erhöhung auf 100 V. Nach 2<sup>3</sup>/<sub>4</sub> – 3 Stunden wurde das Gel entnommen und auf eine Nitrozellulosemembran (BioRad, München, Deutschland) geblottet. Dies geschah bei 30 V in einem Blotpuffer (6,06 g Tris, 28,8 g Glycin, 1600 ml H<sub>2</sub>O, 400 ml Methanol) für ca. 3 Stunden. Anschließend wurde die nun geblottete Nitrozellulosemembran über Nacht in 10%iger Milch (T145, Roth, Karlsruhe) bei 4°C geblockt.

Am nächsten Tag erfolgte die Detektion mit einem Antikörper gegen LL-37 (Sanbio, Beutelsbach), von dem 16 µl in 12 ml 5%iger Milch gelöst wurden. Dazu wurde die Blotfolie in Folie eingeschweißt und mit dem Antikörper bei RT für 2h inkubiert. Vor der anschließenden Inkubation mit einem Zweitantikörper musste der Blot für ca. 20 Minuten in PBS gewaschen werden. Der Zweitantikörper war ein HRP-gekoppelter Antikörper gegen Maus (1858413, Pierce, Rockford, USA), von dem 12 µl in 12 ml 5%iger Milch gelöst wurden. Nach der 1 stündigen Inkubation fand wiederum ein großvolumiger Waschvorgang mit PBS, ebenfalls für 1h, statt. Anschließend folgte für 6 Minuten die Inkubation mit einem HRP-Substrat (Super-Signal West Femto Kit, Pierce, Rockford, USA). Danach wurde dieser wieder von der Folie entfernt. Die weiteren Arbeitsschritte fanden in einer Dunkelkammer statt. Auf den Blot wurde für 3-5 Minuten eine Fotofilm gelegt (CAT8688681, Kodak, Rochester, USA), welcher anschließend in einem Entwickler (G138i, Agfa, Mortsel, Belgien) und Fixierbad (G334i, Agfa, Mortsel, Belgien) entwickelt wurde.

### **2.5 hBD-2 Western-Blot**

Die Probenvorbereitung für den hBD2 Western-Blot erfolgte analog zum LL-37 Western-Blot mit Laemmli-Puffer und 10 minütigem Aufkochen. Als Positivkontrolle wurden 20 µl rekombinantes hBD2 (ab9872, abcam, Cambridge, UK) (1mg/ml) verwendet. Laufzeit, Spannung und Puffer für die Elektrophorese waren identisch mit denen für LL-37. Nach dem Blocken mit 10%iger Milch über Nacht bei 4°C fand am nächsten Tag die Detektion mit einem Antikörper gegen hBD2 (eigene Produktion, hergestellt in Hasen) (24 µl / 12 ml 5%ige Milch) statt. Es folgte eine zweistündige Inkubation mit anschließendem Waschen in PBS. Im folgenden Arbeitsschritt wurde der Blot mit einem HRP-gekoppelten Sekundäantikörper inkubiert (A4174, Sigma-Aldrich, München) (12 µl / 12 ml 5%ige Milch). Diesem schlossen sich ein Waschvorgang, die Zugabe von HRP-Substrat, die Belichtung eines Fotofilms und die Entwicklung im Entwicklerbad entsprechend dem LL-37 Western-Blot an.

## 2.6 Statistische Analyse

Für die statistische Auswertung der Ergebnisse wurden verschiedene Tests mit Hilfe von SPSS 15.0 (Statistical Package for Social Sciences) (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA) durchgeführt.

### 2.6.1 Korrelationsanalyse

Die Korrelationsanalyse erfolgte mit Hilfe des Spearmanschen Rang-Korrelationskoeffizienten  $r_s$ . Dieser erlaubt eine Korrelation, auch wenn die Variablen  $x$  und  $y$  nicht aus einer normalverteilten Grundgesamtheit entstammen. Dies macht  $r_s$  weniger anfällig für eine Inhomogenitätskorrelation (durch Ausreißer bedingt).

Die Berechnung erfolgt nach folgender Formel:

$$r_s = 1 - \frac{6 \sum D_i^2}{n^3 - n}$$

$r_s$  = Spearmanscher Rangkorrelationskoeffizient

$D_i$  = Rangdifferenz der einzelnen Wertepaare

$n$  = Anzahl der Wertepaare

### 2.6.2 Signifikanztest

Zur Überprüfung der Signifikanz der Übereinstimmung zweier Verteilungen wurden zwei statistische Tests verwendet:

- Der Mann-Whitney-U-Test
- Der Kruskal-Wallis-Test

Bei beiden Tests handelt es sich um parameterfreie statistische Tests, d.h. Art und Anzahl der Parameter ist flexibel und nicht von vornherein festgelegt. Dadurch sind diese Tests auch anwendbar, wenn bestimmte Voraussetzungen wie z. B. eine Normalvertei-

lung nicht erfüllt sind. Der Unterschied zwischen den beiden Tests ist, dass der Kruskal-Wallis-Test auch dann angewendet werden kann, wenn mehr als zwei Gruppen verglichen werden müssen (z.B. intervallskalierte Variable (Leukozytenanzahl, Packyears, Temperatur)). Bei beiden Tests wird jeweils eine Nullhypothese  $H_0$  (der beobachtete Effekt ist durch zufallsbedingte Streuung bedingt) und eine Alternativhypothese  $H_1$  (der beobachtete Effekt ist auch in der Grundgesamtheit vorhanden) formuliert. Ergibt sich als Ergebnis der anschließenden Wahrscheinlichkeitsberechnung, dass  $H_0$  nur mit sehr geringer Wahrscheinlichkeit eintritt, so wird  $H_0$  verworfen und das Ergebnis als schwachsignifikant, signifikant oder hochsignifikant bezeichnet.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1.1 Der Nachweis von AMPs in Atemwegssekreten

AMPs sind Effektormoleküle der angeborenen Immunantwort. Sie werden von verschiedenen Zellen produziert und wirken bei Infektionen bakterizid, chemotaktisch und immunmodulatorisch. Diese Rolle übernehmen sie auch bei pulmonalen Infektionen. Dabei werden sie von neutrophilen Granulozyten und Epithelzellen in das Atemwegssekret abgegeben.

Zu Beginn der Versuche stand der Nachweis von LL-37 und hBD2 in Atemwegssekreten von Pneumoniepatienten mit Hilfe einer SDS-Page-Gelelektrophorese und anschließender Western-Blot-Analyse. Dies gelang sowohl in den extrahierten Sputumproben als auch in den BAL.

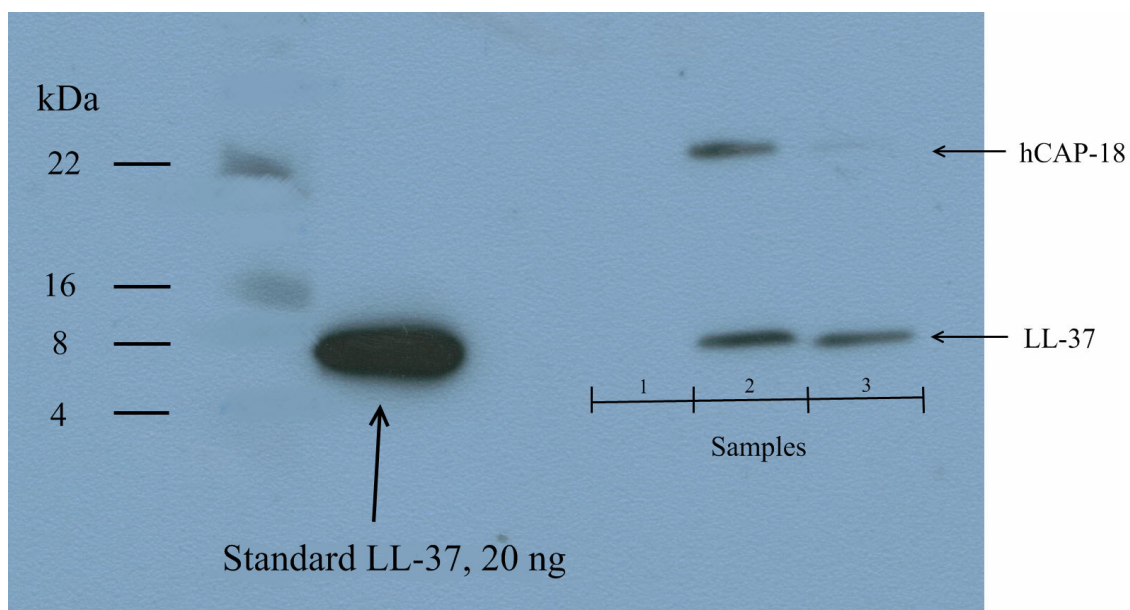


Abb. 8: Nachweis von hCAP-18/LL-37 in Sputumproben

LL-37 hat eine relativ geringe molekulare Masse von 4,5 kDa, was auch deutlich durch die Position der Standard- und der beiden Probenbanden zwischen der 4 und 8kDa-Bande zu sehen ist. Insgesamt sind drei Proben aufgetragen, eine mit niedriger, eine mit mittlerer und eine mit hoher LL-37-Konzentration im ELISA. Zu sehen sind nur die Proben mit mittlerer und hoher LL-37 Konzentration. Bei den beiden Banden zwischen 16 und 22 kDa handelt es sich um das inaktive Vorläuferpeptid von LL-37 hCAP-18 (Molekulare Masse 18 kDa).

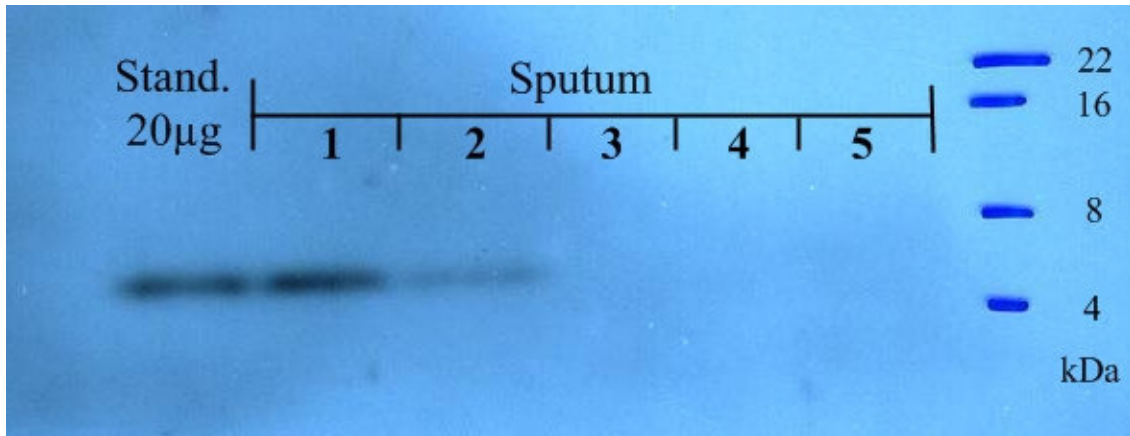


Abb. 9: Nachweis von hBD2 in Sputumproben

hBD2 hat eine molekulare Masse von 4kDa. Aufgetragen sind eine Kontrolleprobe und fünf Sputumproben- Die Banden für Standard und Sputumproben laufen im Bereich von hBD2.

### 3.2 Die Konzentration von AMPs in Atemwegssekreten

Zusätzlich zu dem AMP-Nachweis sollte auch noch deren Konzentration in den Atemwegssekreten von Patienten mit einer ambulant erworbenen Pneumonie bestimmt werden. Dies erfolgte mit Hilfe von ELISAs. Die AMP-Konzentrationen zeigten dabei zum Teil sehr große Abweichungen vom Mittelwert, was eine große Standardabweichung zur Folge hatte. Die LL-37 Konzentrationen lagen zwischen 21 – 14283 ng/ml, die von hBD2 zwischen 0 – 249 ng/ml.

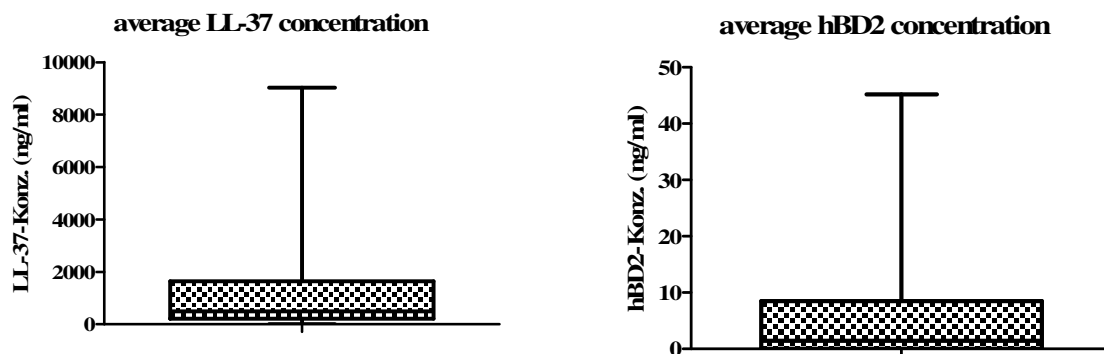


Abb. 10: Durchschnittliche AMP-Konzentration bei CAP-Patienten

### 3.3 Die AMP-Konzentration von CAP-Patienten ist im Vergleich zu Gesunden erhöht

Ein Ziel der Versuche war die Beantwortung der Frage, wie sich die AMP-Spiegel bei Pneumoniepatienten im Vergleich zu Patienten ohne Lungeninfektion verhalten. Hierfür wurden zusätzlich zu den Messungen in Atemwegssekreten von Pneumoniepatienten auch noch die AMP-Konzentrationen in Sputumproben gesunder Menschen ( $n = 5$ ) und in BALs von Patienten ( $n = 9$ ) gemessen, die wegen einer anderen, nicht-infektiösen Lungenerkrankung lavagiert wurden. Dies waren V.a. und Kontrollen bei Sarkoidose, Patienten mit Lungenfibrose und mit V.a. Asthma bronchiale.

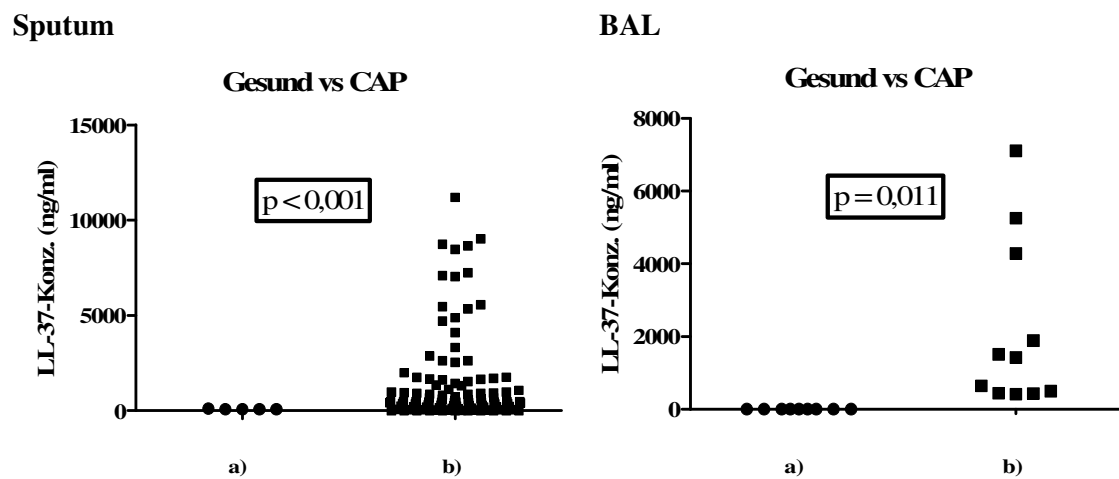


Abb. 11: Vergleich der LL-37-Konzentration bei a) gesunden Menschen und b) Pneumoniepatienten; a = LL-37 im Sputum; b = LL-37 in BAL

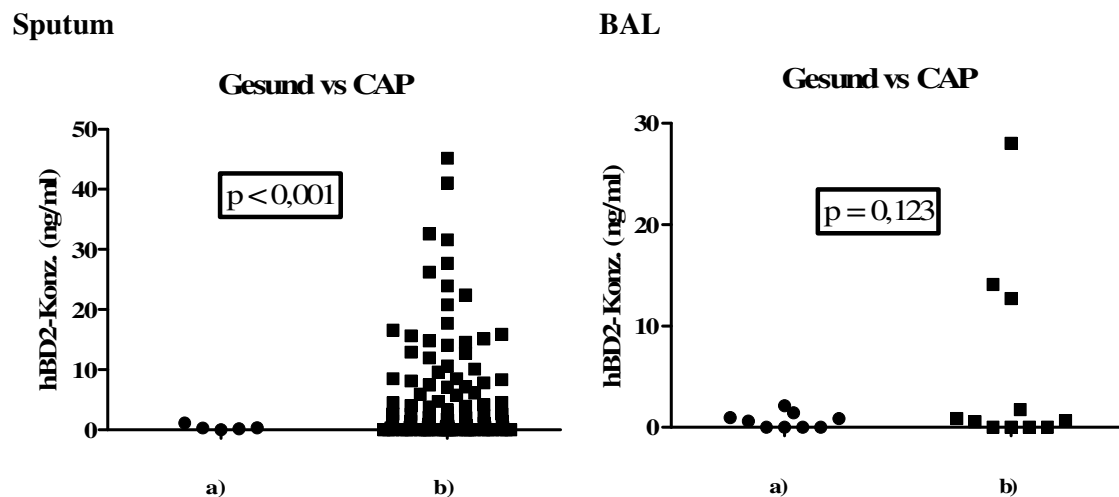


Abb. 12: Vergleich der hBD2-Konzentration bei a) gesunden Menschen und b) Pneumoniepatienten



Vergleicht man die durchschnittlichen AMP-Konzentrationen von Gesunden (Tab. 4.4) und von Pneumoniepatienten (Tab. 4.2) im Sputum, so kann eine signifikant höhere LL-37-Konzentration bei Pneumoniepatienten festgestellt werden ( $p < 0,001$ ). Auch der hBD2-Spiegel liegt bei Pneumoniepatienten signifikant höher als bei Gesunden ( $p < 0,001$ )

Bei Betrachtung der AMP-Konzentrationen in den bronchioalveolären Lavagen fällt vor allem die niedrige LL-37-Konzentration in der BAL von Gesunden auf. Bei der statistischen Auswertung konnte auch hier ein signifikanter Anstieg der LL-37-Konzentration in den BAL von Pneumoniepatienten festgestellt werden ( $p = 0,011$ ). Bei der Analyse der hBD2-Konzentration in den BAL konnte allerdings keine signifikant höhere hBD2-Konzentration festgestellt werden ( $p = 0,123$ ).

Tab. 4: Signifikanz des Anstiegs der AMP-Konzentration bei CAP-Patienten

	<b>LL-37</b>	<b>hBD2</b>
Sputum	<0,001	<0,001
BAL	0,011	0,123

Aufgrund der niedrigen LL-37-Konzentrationen in BAL-Proben wurden diese zur Verifizierung der Messwerte konzentriert. Hierfür wurden je 5ml der Probe in der Speed-Vac eingedampft, in 500µl H<sub>2</sub>O resuspendiert und der pH auf 6-7 eingestellt. Dies ergab eine Konzentrierung der Proben um den Faktor 1:10. Anschließend wurde mit diesen Proben ein LL-37 Western-Blot durchgeführt, bei dem in einigen BAL hCAP-18-Banden sichtbar wurden (siehe Abb. 13). Hierdurch konnte die Existenz von LL-37 auch in der BAL von Nicht-CAP-Patienten nachgewiesen werden. Die Tatsache, dass bei gesunden Menschen LL-37 in der Atemwegsflüssigkeit nur in geringen Konzentrationen und als Vorläuferpeptid vorhanden ist stimmt mit der Vorstellung überein, dass es sich bei LL-37 um ein induzierbares Peptid handelt, das im Entzündungsfall vermehrt sezerniert wird.

Zur Beurteilung dieses Ergebnisses sollte zusätzlich noch die Analyse des Zellbildes in der BAL herangezogen werden. Hierbei hatten alle Patienten bis auf Nr. 4 ein normales Differenzialzellbild mit einem Großteil an AM und nur wenigen neutrophilen Granulozyten. Patient 4 zeigte hingegen 94% neutrophile Granulozyten, was u.a. für eine Infek-

tion, eine Schocklunge (ARDS) oder eine Kollagenose sprechen kann. Da neutrophile Granulozyten eine Quelle von AMPs darstellen, würde man in diesem Fall eine eventuell erhöhte AMP-Konzentration erwarten. Dieser Unterschied in der Zellzusammensetzung wirkt sich aber weder im ELISA noch im LL-37 Western-Blot als Unterschied aus.

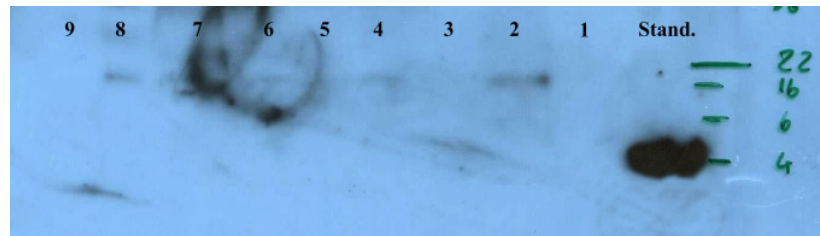


Abb. 13: hCAP-18/LL-37 Western-Blot mit konzentrierten BAL gesunder Patienten  
Als Standard wurden 20 ng verwendet. Zwischen den Banden 16 und 22 kDa sind für die BAL 2-8 leichte Banden zu erkennen. Diese entsprechen wieder dem Vorläuferpeptid von LL-37 hCAP-18.

Bei Betrachtung der hBD2-Konzentrationen von Gesunden fielen ebenfalls Werte auf, die teilweise nicht messbar waren und im Durchschnitt unter dem AMP-Niveau von CAP-Patienten lagen. Zur weiteren Analyse wurde deswegen der hBD2-ELISA mit den 1:10 konzentrierten BAL wiederholt. Zusätzlich dazu wurden jeweils 10µl der konzentrierten BAL von Gesunden mit 90µl synthetischen hBD2 unterschiedlicher Konzentration (1,56 ng/ml und 6,25 ng/ml) versetzt (spiking) und erneut gemessen.

Dabei konnte gezeigt werden, dass auch in den BAL, in denen der hBD2-Spiegel in der unkonzentrierten Form unter der Nachweisgrenze lag, eine geringe Konzentration von hBD2 messbar war. Die durchschnittliche Konzentration der fünf gemessenen BAL lag bei 0,728 ng/ml. Die gemessenen Konzentrationen der gespikten Proben entsprachen den erwarteten Werten bei unterschiedlich großen Fehlerkoeffizienten.

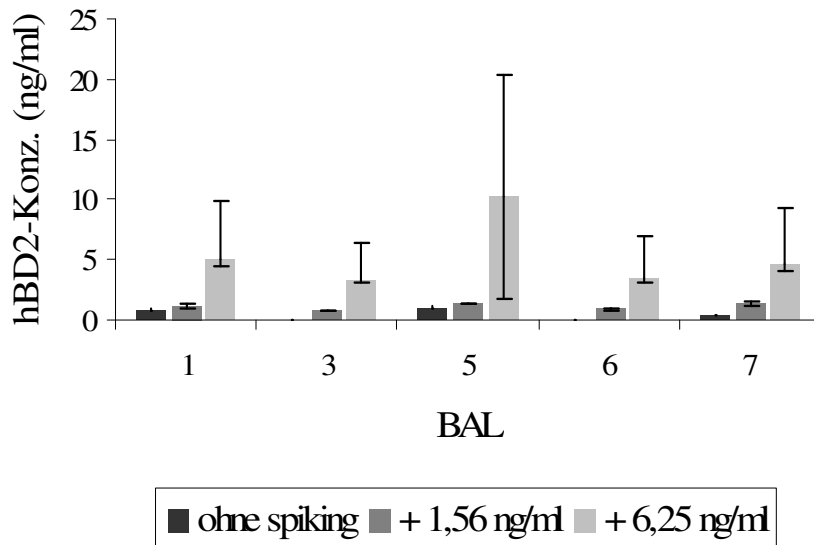


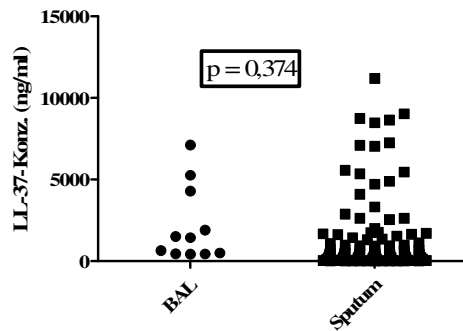
Abb. 14: Graphische Darstellung der Ergebnisse aus dem spiking-Versuch mit den konzentrierten BAL gesunder Patienten.

### 3.3.1 Der Vergleich zwischen BAL und Sputum

In den Versuchen standen zwei unterschiedliche Probenmaterialien zur Verfügung: BALs und Sputum. Diese unterscheiden sich nicht nur durch den Ort ihrer Produktion, sondern auch durch die Art ihrer Gewinnung. Für beide Materialarten gilt, dass die Qualität der Probe von verschiedenen Faktoren wie der Patientencompliance, dem Untersucher, dem Ort der Lavage und dem Verdünnungsfaktor abhängt.

Mit Blick auf den Produktionsort stellte sich nun die Frage, ob es einen Unterschied in der AMP-Konzentration gab, je nachdem welches Atemwegsmaterial zur Verfügung stand. Beim Vergleich der LL-37-Konzentration mit der hBD-2 Konzentration jeweils in Sputum und in BAL von Pneumoniepatienten konnte kein statistisch signifikanter Unterschied in der Peptidkonzentration festgestellt werden ( $p(\text{LL-37}) = 0,374$ ;  $p(\text{hBD2}) = 0,608$ ) (siehe Abb. 15). Vergleicht man hingegen bei gesunden Menschen die LL-37-Konzentration in BAL und Sputum, so zeigt sich eine signifikant höhere Konzentration in Sputumproben ( $p < 0,001$ ). Bei der hBD2-Konzentration zeigt sich kein Unterschied (siehe Abb. 16).

a) LL-37



b) hBD2

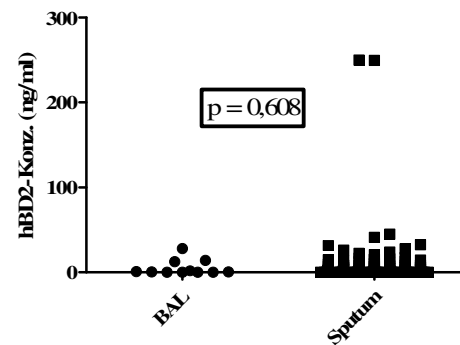
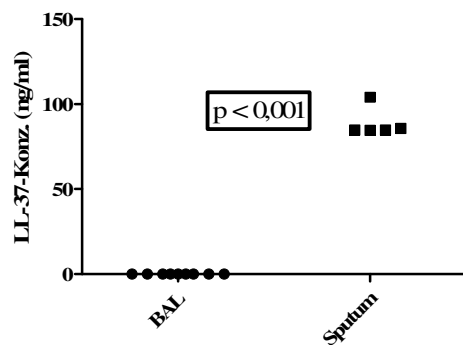


Abb. 15: Vergleich der a) LL-37- und b) hBD2-Konzentrationen in BAL und Sputum von Pneumoniepatienten

a) LL-37



b) hBD2

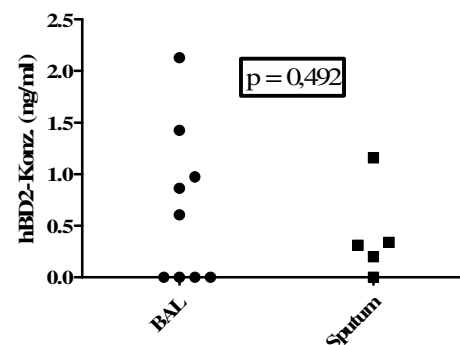


Abb. 16: Vergleich der a) LL-37- und b) hBD2-Konzentration in BAL und Sputum von gesunden Menschen

Vergleicht man die Signalstärke von BAL und Sputum im hCAP-18/LL-37 Western-Blot, wird das Ergebnis aus der statistischen Analyse bestätigt. Beim Vergleich von BAL und Sputumproben von Pneumoniepatienten kann kein Unterschied in der Intensität der Signalbanden festgestellt werden (siehe Abb. 17).

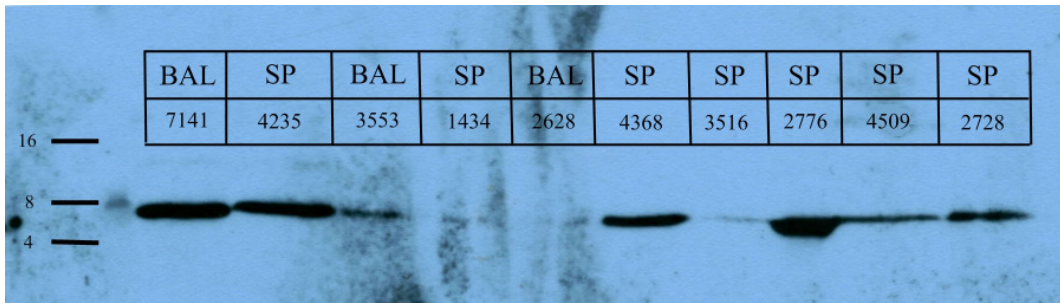


Abb. 17: Vergleich zwischen BAL und Sputum (SP) von Pneumoniepateinten im hCAP-18/LL-37 Western-Blot

Es sind die LL-37 Banden für verschiedene BAL- und Sputumproben und die im ELISA gemessenen Peptidkonzentrationen in ng/ml dargestellt (5 Min. Belichtung). Ein wesentlicher Unterschied zwischen BAL und Sputum ist nicht sichtbar.

### 3.4 Die AMP-Konzentrationen zeigen signifikante Korrelationen mit klinischen und mikrobiologischen Parametern

#### 3.4.1 Der Einfluss des Keimpektrums auf die AMP-Konzentration

Ein Ziel der Korrelationsanalyse war es herauszufinden, ob ein Zusammenhang zwischen der Art des Pathogens und der Höhe der AMP-Konzentration besteht. Bei 13 der 81 mikrobiologisch untersuchten Patientenproben konnte ein Nachweis einer Legionelleninfektion geführt werden. Damit stellte die durch Legionellen verursachte Pneumonie die größte Gruppe unter den untersuchten Patienten dar. Auch bei den restlichen Patienten wurde eine mikrobiologische Analyse durchgeführt, hauptsächlich aus Serumproben oder aus Nasenabstrichen. Diese ergab allerdings nur bei 36 Patienten einen Keimnachweis.

Obwohl die durchschnittliche Konzentration sowohl für LL-37 als auch für hBD2 bei Legionellenpatienten höher ist als bei Nicht-Legionellenpatienten, zeigt sich im Mann-Whitney-U-Test nur für hBD2 ein signifikanter Unterschied ( $p = 0,029$ ). Für LL-37 besteht keine signifikante Differenz ( $p = 0,411$ ).

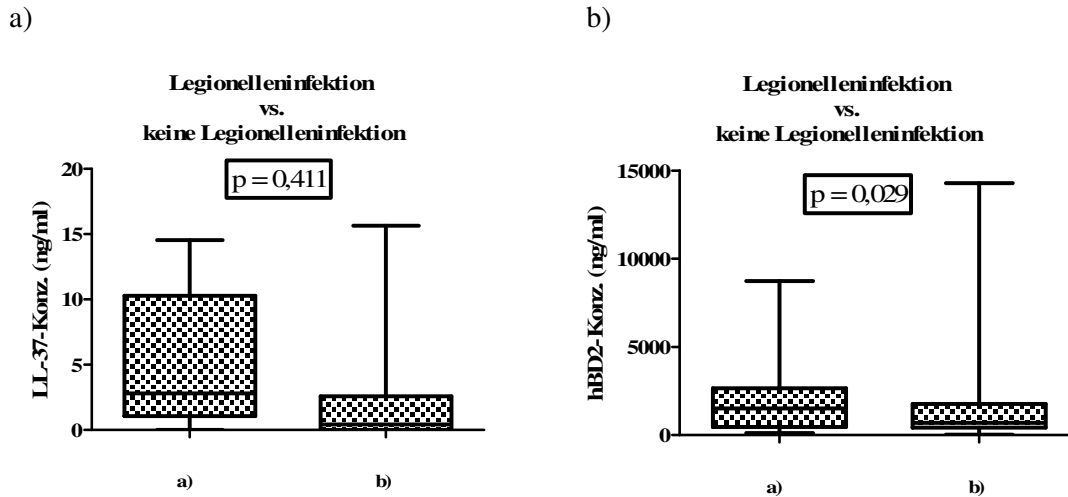


Abb. 18: Graphische Darstellung der a) LL-37- und b) hBD2-Konzentrationen bei Legionellen-Infektionen und Nicht-Legionellen-Infektionen

### 3.4.2 Der Zusammenhang zwischen erhöhten LL-37- und CRP-Werten

Im Verlauf einer Infektion lassen sich im Serum von Patienten verschiedene Moleküle bestimmen, die während einer akuten Entzündungsreaktion produziert werden und zum koordinierten Ablauf benötigt werden. Diese werden als Akute-Phase-Peptide bezeichnet. Wichtigster Vertreter ist das C-reaktive Peptid (CRP). Sein Betrag korreliert gut mit dem Ausmaß und dem Schweregrad der Entzündung. Das Ziel der Korrelationsanalyse war die Beantwortung der Frage, ob es einen Zusammenhang zwischen der Höhe der CRP-Werte und der Höhe der AMP-Konzentration gibt. Dabei zeigte sich, dass in den Atemwegssekreten von 108 Patienten, bei denen Angaben zum CRP-Spiegel vorlagen, eine erhöhte Konzentration an LL-37 mit einem erhöhten CRP-Wert einherging ( $r_s = 0,281$ ,  $p = 0,005$ ). Für hBD2 konnte keine signifikante Korrelation zwischen der Höhe der AMP-Konzentration und des CRP-Spiegels festgestellt werden ( $r_s = -0,044$ ;  $p = 0,661$ ).

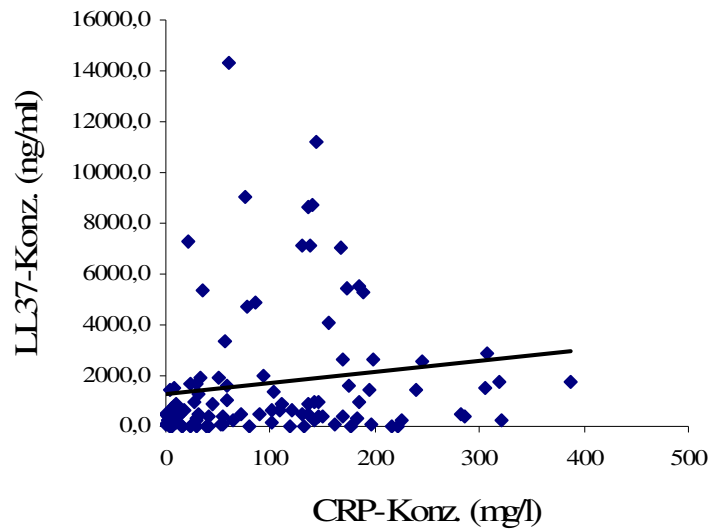


Abb. 19: Graphische Darstellung des Zusammenhangs zwischen LL-37 und CRP

### 3.4.3 Die Beziehung zwischen der AMP-Konzentration und der Leukozytenzahl

Neben den Akute-Phase-Peptiden ist während einer Entzündung die Leukozytenzahl einer der wichtigsten diagnostischen Parameter mit guter Sensitivität. Bei einer akuten Entzündung findet eine Verschiebung der im Blut messbaren Leukozytenpopulationen hin zu jungen, stabkernigen Leukozyten statt. Diese systemische Reaktion findet auch bei einem entzündlichen Geschehen statt, das auf ein Organ beschränkt (z.B. bei einer Pneumonie). Dies verdeutlicht den Zusammenhang zwischen systemischer und lokaler Entzündung. Bei insgesamt 17 Patienten, bei denen stabkernige Leukozyten gezählt wurden, konnte mit Zunahme der Anzahl Stabkerniger auch eine Zunahme des LL-37-Spiegels in den Atemwegssekreten beobachtet werden ( $r_s = 0,851$ ;  $p = 0,000$ ). Dies verdeutlicht die Rolle von LL-37 als Bestandteil der angeborenen Immunantwort auf ein akutes Entzündungsgeschehen.

Eine Bestätigung der positiven Korrelation zwischen LL-37 und den Entzündungszellen hat auch bei der Betrachtung des Verhältnisses der LL-37-Konzentration zur Gesamtleukozytenzahl herausgestellt. Bei insgesamt 108 Patienten wurde die Gesamtleukozytenzahl bestimmt, wobei mit  $r_s = 0,239$  und  $p = 0,018$  eine positive und signifikante

Korrelation besteht. Bei der Betrachtung der Beziehung von hBD2 und Gesamtleukozyten konnte kein Zusammenhang festgestellt werden ( $r_s = -0,025$ ,  $p = 0,046$ )

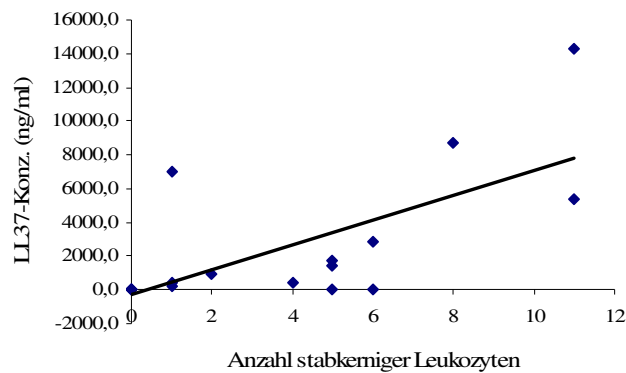


Abb. 20: Graphische Darstellung des Zusammenhanges zwischen der LL-37-Konzentration und der Anzahl stabkerniger Granulozyten ( $r_s = 0,851$ ;  $p = 0,000$ )

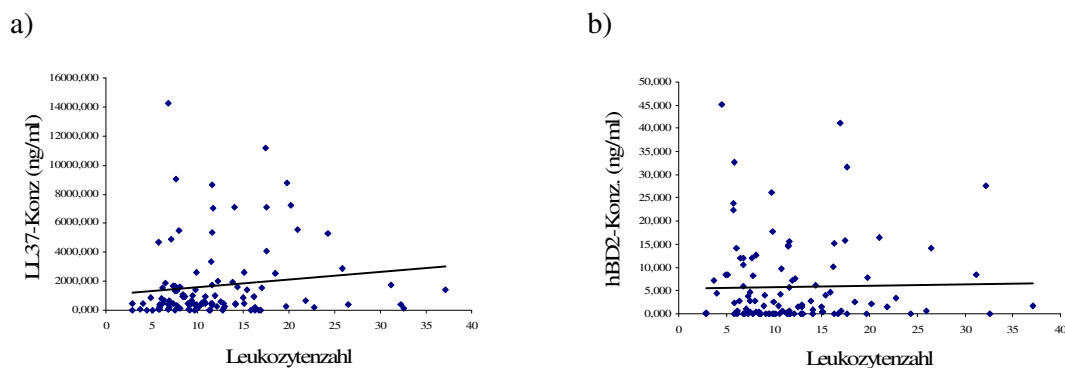


Abb. 21: Graphische Darstellung der Beziehung zwischen der Leukozytenzahl und a) der LL-37- und b) der hBD2-Konzentration

Bei einer Betrachtung des Verhältnisses der Anzahl der segmentkernigen Granulozyten zu der AMP-Konzentration konnte man beobachten, dass eine negative Korrelation zwischen der Höhe des hBD2-Spiegels und der Anzahl segmentkerniger Granulozyten bestand ( $r_s = -0,334$ ,  $p = 0,046$ ). Dies galt allerdings nicht für das Verhältnis zwischen den segmentkernigen Granulozyten und der LL-37-Konzentration ( $r_s = 0,285$ ,  $p = 0,107$ ).



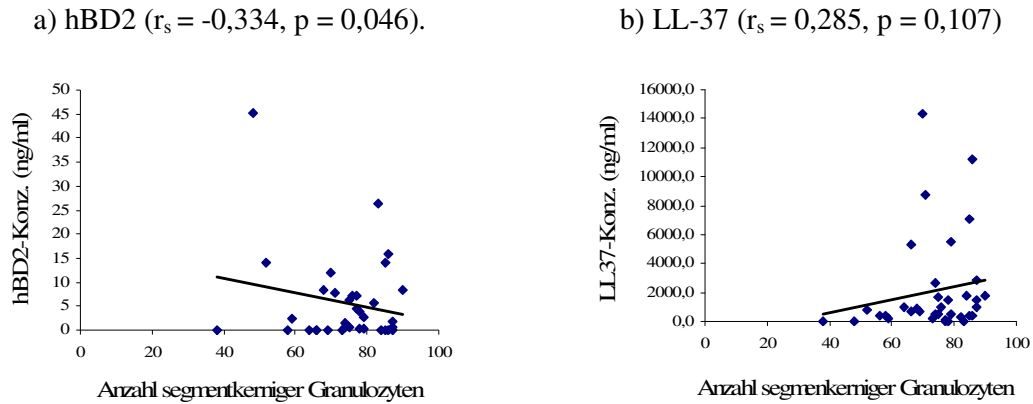


Abb. 22: Graphische Darstellung des Verhältnisses der Anzahl der segmentkernigen Granulozyten zu a) hBD2 und b) LL-37

### 3.4.4 Die Relation zwischen der AMP-Konzentration und Tumorerkrankungen

Bei insgesamt sechs Personen bestand zum Zeitpunkt der Aufnahme in die CAPNetz-Studie eine maligne Tumorerkrankung. Beim Vergleich der LL-37-Konzentrationen von Tumorpatienten ( $n = 6$ ) mit Nicht-Tumorpatienten ( $n = 92$ ) fällt ein signifikanter Unterschied auf ( $p = 0,009$ ). Auch hier konnte dieser Zusammenhang für hBD2 nicht bestätigt werden ( $p = 0,274$ ).

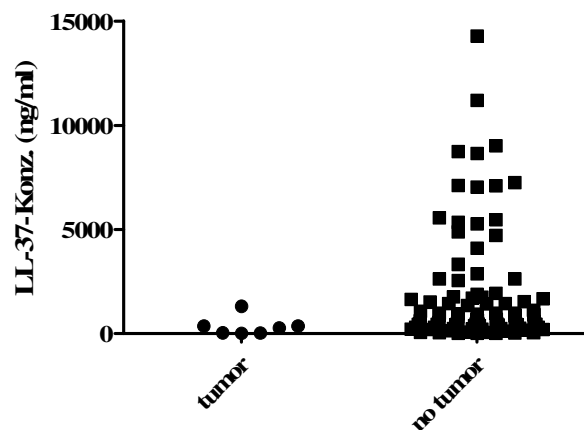


Abb. 23: Graphische Darstellung der Relation zwischen AMP-Konzentration und Tumorerkrankung

Bei einer weiteren Differenzierung der Tumorerkrankung nach dem betroffenen Organsystem und dem anschließenden Vergleich der LL-37-Konzentration fällt auf, dass Patienten mit einem malignen Brusttumor signifikant niedrigere LL-37-Spiegel haben als Patienten mit anderen Tumoren ( $p = 0,035$ ). Auch diese Relation trifft nur für LL-37 zu, nicht für hBD2 ( $p = 0,266$ ). Bei der Auswertung dieser Korrelation muss weiter beachtet werden, dass die Gruppe der Patienten mit Brusttumor nur aus drei Personen bestand, was die Bewertung des Ergebnisses aus der Korrelationsanalyse deutlich erschwert.

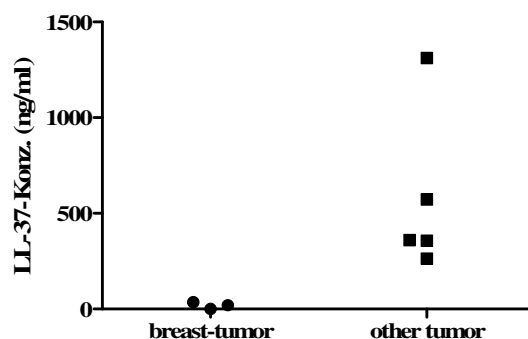


Abb. 24: Graphische Darstellung des Zusammenhangs zwischen der LL-37-Konzentration bei Patienten mit malignen Brusttumoren und Patienten mit Tumoren anderer Organe

### 3.4.5 Die AMP-Konzentration in Abhängigkeit vom Raucherstatus

Es ist bekannt, dass neben endogenen Faktoren, wie z. B. ein Mangel an  $\alpha$ -1-Antitrypsin oder die Sarkoidose, der inhalative Zigarettenmissbrauch als Vertreter exogener Ursachen einer der Hauptverursacher einer chronischen Bronchitis und COPD ist. Die im Rauch enthaltenen Noxen führen zu einer Hemmung des Zilienschlags der Epithelzellen. Zusätzlich kommt es zu einer Degeneration und Metaplasie der Epithelauskleidung. Folge davon ist die Ansammlung von mukösem Schleim in den Bronchien und ein vermindertes Abhusten. Dies fördert neben der Bildung eines Emphysems oder von Atelektasen auch die Infektion der Lunge. Da das Atemwegsepithel auch eine Quelle der

antimikrobiellen Peptide ist, stellte sich die Frage, ob sich der Defekt der Epithelauskleidung auch in einer Veränderung der AMP-Konzentration widerspiegelt und damit zur erhöhten Infektionsgefahr beiträgt. Hierfür wurden die gemessenen Konzentrationen mit dem Raucherstatus korreliert.

Insgesamt machten 96 Patienten Angaben zu ihrem Rauchverhalten. Darunter waren 25 Raucher und 81 Nicht-Raucher. Bei der statistischen Analyse wurde wieder zwischen Sputum- und BAL-Proben unterschieden. Beim Vergleich der Peptidkonzentrationen konnte weder für LL-37 noch für hBD2 ein signifikanter Unterschied zwischen Rauchern und Nicht-Rauchern festgestellt werden. Dies galt sowohl für Sputum- als auch für BAL-Proben.

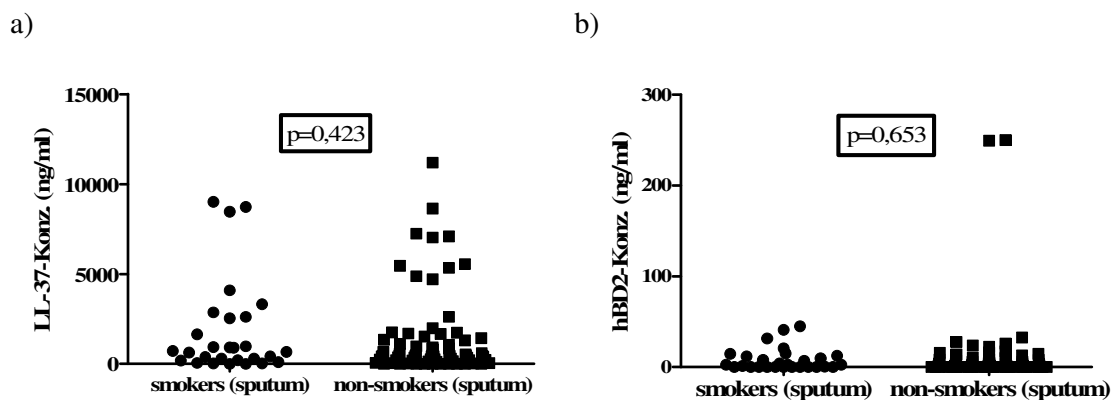


Abb. 25: Vergleich der AMP-Konzentration im Sputum bei Rauchern und Nicht-Rauchern für a) LL-37 und b) hBD2

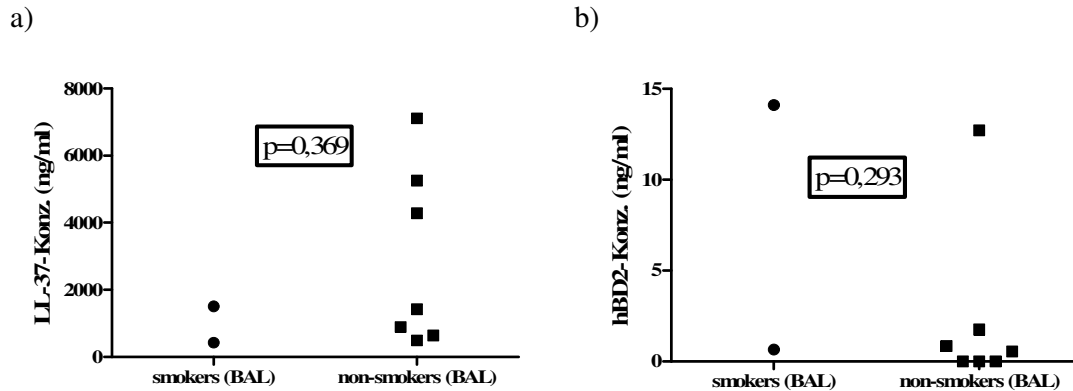


Abb. 26: Vergleich der AMP-Konzentration in BAL bei Rauchern und Nicht-Rauchern für a) LL-37 und b) hBD2

Die Stärke des inhalativen Zigarettenkonsums wird anamnestisch mit Hilfe der Packyears (py) quantifiziert (Anzahl der am Tag verbrauchten Zigarettenpäckchen  $\times$  Anzahl der Konsumjahre). Ziel war es, herauszufinden, ob es innerhalb der Raucherkohorte einen Unterschied in der AMP-Konzentration gibt, der von der Menge der inhalierten Noxe abhängt. Hierfür wurden drei Gruppen gebildet:  $x < 20$  py ( $n = 8$ ),  $20\text{py} < x < 40\text{py}$  ( $n = 5$ ),  $x > 40\text{py}$  ( $n = 10$ ). Bei der anschließenden Korrelationsanalyse konnte weder für LL-37 noch für hBD2 ein signifikanter Zusammenhang zwischen der AMP-Konzentration und der Stärke des Zigarettenkonsums festgestellt werden ( $p(\text{LL-37}) = 0,332$ ;  $p(\text{hBD2}) = 0,673$ ).

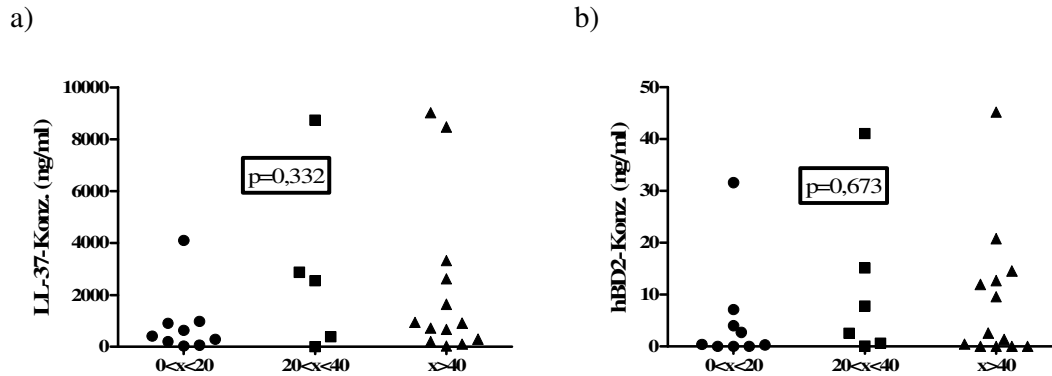


Abb. 27: Vergleich der AMP-Konzentrationen aufgeschlüsselt nach der Anzahl der packyears für a) LL-37 und b) hBD2

### 3.4.6 Die Eigenschaft der AMP-Konzentration als diagnostischer und prognostischer Marker

#### 3.4.6.1 Die Beziehung zwischen der AMP-Konzentration und dem BGA-Befund

Neben dem klinisch-anamnestischen (Atemnot, Fieber, Rasselgeräusche, Dämpfung) und dem radiologischen Untersuchungsbefund (Infiltrat) stellt die laborchemische Befundung von Patientenmaterial die wichtigste diagnostische Maßnahme bei der Pneumonie dar. Neben Differentialblutbild und CRP ist der Befund der arteriellen Blutgasanalyse (BGA) der Parameter mit der größten Relevanz. Es war das Ziel, herauszufinden, ob ein Zusammenhang zwischen dem Befund der BGA und der Höhe der AMP-Konzentration bestand und damit der AMP-Spiegel als diagnostischer Parameter geeignet ist.

Bei der Korrelation der  $pO_2$ - (LL-37:  $r_s = 0,064$ ;  $p = 0,651$ ; hBD2:  $r_s = 0,023$ ;  $p = 0,865$ ) bzw.  $pCO_2$ -Werte (LL-37:  $r_s = 0,136$ ;  $p = 0,332$ ; hBD2:  $r_s = -0,2$ ;  $p = 0,139$ ) der Patienten mit ihren AMP-Konzentrationen konnte weder für LL-37 noch für hBD2 ein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

### 3.4.6.2 Die Eignung des AMP-Spiegels zur Abschätzung der Prognose

Bei einer Betrachtung des klinischen Verlaufs der CAP-Patienten wurde sichtbar, dass insgesamt 61 Patienten im Verlauf der Erkrankung für eine unterschiedliche Dauer hospitalisiert werden mussten. Bei 43 dieser Patienten verschlechterte sich die respiratorische Situation so stark, dass sie während des Krankenhausaufenthalts Sauerstoff erhielten. Um die Frage zu beantworten, ob die Höhe der AMP-Konzentration in einem Zusammenhang mit der Dauer der Hospitalisierung und dem Bedarf an Sauerstoff stand und damit eine Aussage über die Prognose des einzelnen Patienten zuließ, wurden die entsprechenden Daten korreliert. Da diese Analyse nur die hospitalisierten Patienten betraf, wurde zur Abschätzung der Prognose zusätzlich noch die Dauer der Antibiotikatherapie mit der AMP-Konzentration korreliert. Dadurch wurden auch die ambulant behandelten Patienten miterfasst.

Für die LL-37-Konzentration und die Dauer der Hospitalisierung bestand ein signifikanter Zusammenhang ( $r_s = 0,291$  und  $p = 0,031$  nach Kruskal-Wallis). Dies galt nicht für hBD2 ( $r_s = 0,042$  und  $p = 0,754$ ). Bei Betrachtung der AMP-Konzentration und dem Bedarf an Sauerstoff konnte weder für LL-37 noch für hBD2 eine signifikante Korrelation festgestellt werden. Gleiches galt auch für den Zusammenhang zwischen der AMP-Konzentration und der Dauer der Antibiotikatherapie ( $p(\text{LL-37}) = 0,694$ ;  $p(\text{hBD2}) = 0,330$ ).

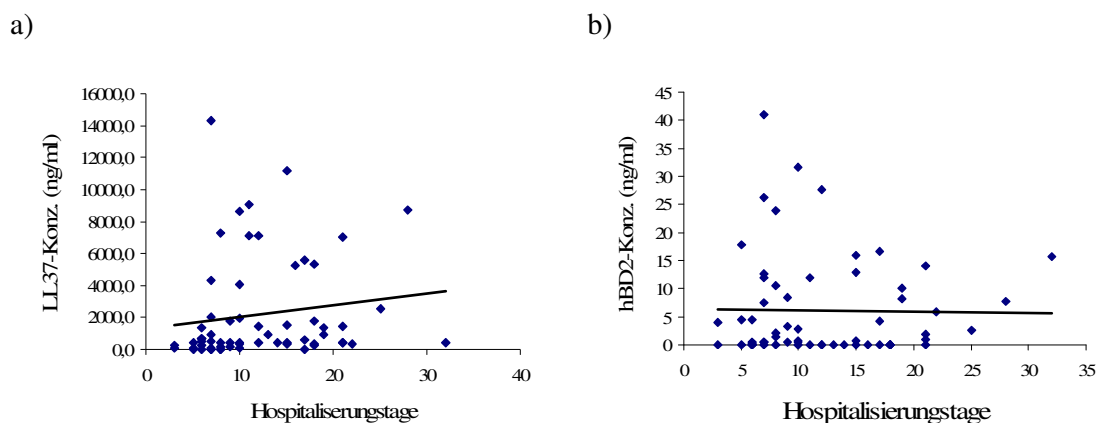


Abb. 28: Graphische Darstellung des Zusammenhangs Zwischen der Hospitalisierungsdauer und der a) LL-37- und b) hBD2-Konzentration

Zur Abschätzung des Schweregrades der Pneumonie und dem damit verbundenen Sterblichkeitsrisiko werden verschiedene Risikoscores verwendet. Ein Beispiel hierfür ist der CRB-65, bei dem aus mehreren klinischen Befunden eine Einteilung in Risikogruppen stattfindet.

Patientenmerkmale CRB-65 (jeweils 1 Punkt)	Mental Confusion Respiratory Rate Blood Pressure Age $\geq 65$
Niedriges Risiko	0 Punkte
Mittleres Risiko	1-2 Punkte
Hohes Risiko	3-4 Punkte

Vergleicht man nun die AMP-Konzentrationen der einzelnen Risikogruppen, so zeigt sich weder für LL-37 noch für hBD2 ein signifikanter Unterschied in der Peptidkonzentration.

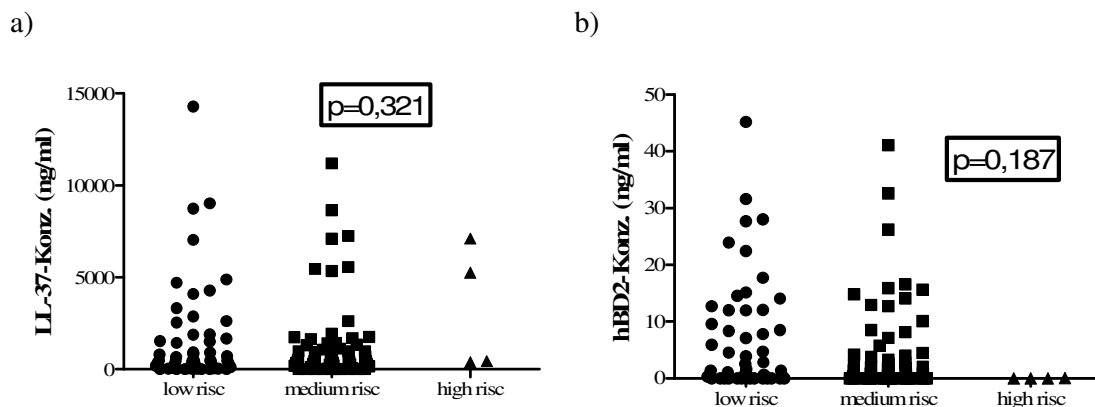


Abb. 29: Graphische Darstellung der AMP-Konzentrationen geordnet nach CRB-65 für  
a) LL-37 und b) hBD2

#### 4. Diskussion

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, AMPs in den Atemwegssekreten von Pneumoniepatienten nachzuweisen und anschließend Zusammenhänge mit klinischen Befunden anhand eines klinischen Datensatzes in einer Multivarianzanalyse herauszuarbeiten. Dabei zeigte sich, dass sowohl in Spututmpuben als auch in Bronchiallavagen von CAP-Patienten höhere AMP-Konzentrationen als bei Gesunden zu finden sind. Durch die Korrelationsanalyse konnten signifikante Zusammenhänge zwischen der AMP-Konzentration und den klinisch-anamnestischen und mikrobiologischen Daten aufgezeigt werden.

##### **AMPs können in Atemwegssekreten von CAP-Patienten in höheren Konzentrationen nachgewiesen werden als bei Gesunden**

Durch die Messung der AMP-Konzentration in Bronchiallavagen und Sputum von Pneumoniepatienten konnten AMPs in Atemwegssekreten nachgewiesen werden. Zusätzlich zum reinen Nachweis der AMPs sollte aber auch eine erhöhte Konzentration bei Patienten mit einer ambulanten Pneumonie im Vergleich zu Gesunden gezeigt werden. Der Anstieg der AMP-Konzentration bei einer pulmonalen Infektion wird deutlich, wenn man die Werte von gesunden Patienten mit den AMP-Konzentrationen von Pneumoniepatienten vergleicht. Die durchschnittliche Konzentration von hBD2 in Sputum und BAL steigt dabei um ca das 100fache, die LL-37-Konzentration sogar um mehr als das 200fache an. Bei der statistischen Auswertung der LL-37-Konzentration in Sputum und in BAL konnte ein signifikanter Anstieg bei Pneumoniepatienten ermittelt werden ( $p$  (LL-37 in BAL) = 0,011;  $p$  (LL-37 in Sputum) < 0,001). Im Bezug auf hBD2 war der Anstieg der AMP-Konzentration nur im Sputum signifikant ( $p$  < 0,001). Die Konzentration von hBD2 in der BAL von Pneumoniepatienten war dagegen nicht signifikant höher als bei gesunden Menschen ( $p$  = 0,123). Zusätzlich konnte durch die Western-Blot Analyse gezeigt werden, dass bei gesunden Menschen hauptsächlich das Vorläuferpeptid von LL-37 vorliegt. Erst bei einer Pneumonie findet die Aktivierung von hCAP-18 zum wirksamen LL-37 statt. Dies steht im Einklang mit der bereits bekannten



Tatsache, dass LL-37 in seiner Vorläuferform in spezifischen Granula in neutrophilen Granulozyten gespeichert. Kommt es zu einem Sekretionsreiz durch Entzündungsmediatoren, wie z.B. bei der Pneumonie, wird hCAP-18 durch die extrazellulär lokalisierte Proteinase 3 in die aktive Form LL-37 gespalten (147). Trotz dieser Spaltung kann bei Pneumoniepatienten immer noch hCAP-18 nachgewiesen werden (siehe Abb. 8). Dies ist bereits in Plasmaproben beobachtet worden, in denen relativ hohe Konzentrationen von hCAP-18 gemessen werden konnten. Dort ist hCAP-18 an Lipoproteine gebunden und fungiert als eine Art Reserve für LL-37 (146).

Die Tatsache, dass bei pulmonalen Infektionen die AMP-Konzentration erhöht ist und damit zur Infektabwehr und Entzündungskontrolle beiträgt, wurde bereits in einigen Studien belegt (17, 69, 137). Diese beschäftigten sich aber mit den speziellen Fällen der Infektion bei Neugeborenen und bei Asthma oder der Pneumonie im Allgemeinen. Auch für die von *Staphylococcus aureus* verursachte Pneumonie, welche hauptsächlich im Krankenhaus erworben wird (HAP), gibt es seit kurzem Daten über erhöhte AMP-Konzentrationen in Atemwegssekreten (173). Für den speziellen Fall der ambulant erworbenen Pneumonie gibt es bis jetzt keinerlei vergleichbaren Daten über erhöhte AMP-Konzentrationen während der Infektion. Dies konnte durch die vorliegende Arbeit gezeigt werden.

Die in der Arbeit gemessenen AMP-Konzentrationen entsprechen auch den in der Literatur veröffentlichten Werten. Yanagi et al. konnten zeigen, dass die Konzentration von hBD2 bei Patienten mit einem chronischen Infekt der unteren Atemwege zwischen 0 und ca. 11 ng/ml lag (189). Singh et al. konnten ebenfalls für chronische Lungenerkrankungen mit Entzündungen erhöhte AMP-Konzentrationen feststellen, die im Bereich von 10-100 ng/ml lagen, so dass mit der vorliegenden Arbeit vergleichbare Werte erreicht wurden. Abgesehen von der Erkenntnis, dass es bei pulmonalen Infekten zu einer verstärkten Transkription von LL-37-mRNA (144) kommt, gibt es keine genauen Angaben über die LL-37-Konzentration bei pulmonalen Entzündungen.

Vergleicht man die hBD2-Konzentration im Sputum von Gesunden (0,501 ng/ml) mit der von Pneumoniepatienten (8,79 ng/ml), so wird eine weitere wesentliche Eigenschaft der Regulation der Defensinsekretion deutlich. Während beta-Defensin 1 (hBD1) in der Lunge konstitutiv produziert wird und damit auch im Atemwegssekret von gesunden Menschen nachweisbar ist, wird die hBD2-Produktion durch proinflammatorische Zy-

tokine induziert. Diese Erkenntnis ist bereits sowohl durch in vitro-Tests, bei denen nach Stimulierung von Atemwegsepithelzellen mit IL-1 $\beta$  ein Anstieg der Peptidkonzentration zu beobachten war (144), als auch durch in vivo-Versuche bestätigt. Hierbei konnte in den BAL von CF- und von Pneumoniepatienten erhöhte hBD2-Spiegel gemessen werden, nicht jedoch bei Gesunden (197). Auch in der aktuellen Literatur gibt es Beweise für die Induktion von hBD2-Sekretion bei Lungeninfektionen. In einer Studie konnte gezeigt werden, dass durch die Infizierung humaner Atemwegszellen mit *Mycobacterium tuberculosis* die hBD2-Produktion induziert werden kann (133). Die Signaltransduktion in den Atemwegsepithelzellen erfolgt dabei über TLR2 (175).

Vergleicht man die hBD2-Konzentrationen in den BAL von Gesunden und Erkrankten ist dieser Effekt weniger deutlich ausgeprägt. Bei der Beurteilung dieser Beobachtung sollten die Art der Probengewinnung bei der Bronchiallavage und hier besonders die Variabilität des recovery berücksichtigt werden. Bei der Durchführung der BAL findet durch die Spülung mit steriler Kochsalzlösung und der anschließenden Absaugung der Patientenprobe ein Verdünnungseffekt statt (135), welcher die gemessenen AMP-Konzentrationen niedriger erscheinen lässt. Für die Lösung dieses methodischen Problems wurden mehrere Lösungen erarbeitet. Rennard et al. konnten den Verdünnungsgrad der Lavageprobe ermitteln, indem sie die Konzentration von Harnstoff als endogener Marker in Lavage- und Serumproben verglichen (132). Grundlage dieser Methode ist die Erkenntnis, dass Harnstoff ungehindert in die ELF diffundiert und damit Serum und Lavagekonzentration gleich sind. Bei der Bewertung dieser Methode in Hinblick auf die vorliegende Arbeit muss allerdings bedacht werden, dass Rennard et al. ihre Versuche an gesunden Patienten durchführten. Zedtwitz-Liebenstein et al. konnten allerdings auch für Pneumoniepatienten zeigen, dass der Vergleich der Harnstoffkonzentration in BAL- und Serumproben eine Quantifizierung der Verdünnung zulässt (195). Zusätzlich sollte bedacht werden, dass bei der Lavage von verschiedenen Atemwegsabschnitten verschiedene Konzentrationen gemessen werden können. Wird bei der Bronchoskopie nun nicht der infiltrierte Bereich lavagiert, sind die Konzentrationen dementsprechend niedrig. Diese Schwierigkeiten bei der Probenentnahme durch Bronchoskopie und Bronchiallavage gelten sowohl für hBD2 als auch für LL-37.

Im Bezug auf ihre mikrobizide Wirkung kann für AMPs eine minimale Hemmkonzentration (MHC) ermittelt werden. Dies geschieht durch Behandlung von Bakterienkultu-

ren mit gereinigten AMPs. Allerdings liegt die tatsächliche MHC in vivo deutlich unter diesem theoretischen Wert, da durch den Synergismus mit anderen antimikrobiellen Substanzen (Lactoferrin etc.) auch bei geringeren Konzentrationen Pathogene abgetötet werden. Die MHC ist weiterhin abhängig von dem Keim und der Salzkonzentration. Bei einem niedrigen Salzgehalt liegt sie für hBD2 zwischen 0,8 - 250 µg/ml und für LL-37 zwischen 1,7 - 15,6 µg/ml (149). Die gemessenen AMP-Konzentrationen liegen zum Teil deutlich über dieser MHC. Der Grund hierfür liegt wahrscheinlich darin, dass durch die erhöhten Konzentrationen die zusätzlichen Eigenschaften der antimikrobiellen Peptide gefördert werden. Eine dieser Eigenschaften ist die Fähigkeit zur Immunmodulation. Dies konnte bereits sowohl für die IL-6-, IL-10- und IP-10-Induktion in menschlichen Keratinozyten (119) als auch für die IL-8-Induktion in menschlichen Atemwegsepithelzellen durch Defensine und Cathelicidine gezeigt werden (170, 198). Dadurch kommt es zur Aufrechterhaltung der Entzündungsantwort. Für LL-37 konnte zusätzlich gezeigt werden, dass seine Aufgabe bei pulmonalen Infekten neben der bakteriziden Wirkung auch in der Immunmodulation als Inhibitor der Aktivierung dendritischer Zellen durch TLR-Liganden besteht (85).

Die einzelnen Werte für die gemessenen AMP-Konzentrationen zeigen zum Teil sehr große Schwankungen um über das 10fache um den Mittelwert und sehr große Standardabweichungen (SD). Verantwortlich für die große Spannbreite kann die Tatsache sein, dass AMPs zu einem unterschiedlich großen Anteil an andere Moleküle gebunden sind. Ein Grund hierfür liegt in ihrer kationischen Ladung, wodurch es zu einer elektrostatischen Bindung mit negativ geladenen Strukturen kommt, wie die Bindung von LL-37 an Mucine zeigt (46). Dabei konnte auch gezeigt werden, dass durch diese Bindung die antimikrobielle Wirkung von LL-37 gegenüber *Pseudomonas aeruginosa* und *Streptococcus pneumoniae* abnimmt. Ob und in welcher Weise LL-37 mit den anderen Komponenten von Speichel (Immunglobuline, GlycoPeptide, Zytokine) und Atemwegsekret (Lipide, Proteasen, GlycoPeptide) reagiert, ist bis jetzt noch nicht bekannt.

Ein weiterer Grund für die große Schwankungsbreite der AMP-Konzentrationen liegt wahrscheinlich darin, dass die Gene für  $\alpha$ - und  $\beta$ -Defensine in Clustern auf Chromosom 8 angeordnet sind. Dabei kann auf einem Gen eine unterschiedliche Anzahl an Kopien für ein Peptid vorliegen. Die Höhe der AMP-Konzentration ist demnach unter anderem abhängig von der Anzahl der Genkopien (72).

Des Weiteren muss bei der Beurteilung der Messwerte die Art der Probe berücksichtigt werden. Für die BAL gelten die oben beschriebenen Schwierigkeiten. Im Bezug auf die Sputumproben ergeben sich hauptsächlich Probleme durch die kommensalische Besiedelung der Mundhöhle durch Bakterien. Bei der Gewinnung der respiratorischen Probe Sputum kommt es zur Kontaminierung des Materials mit Speichelflüssigkeit. In dieser Speichelflüssigkeit sind unterschiedliche Mengen an AMPs vorhanden. Von den bis zu 600 Keimen in der Mundhöhle gehören nur ca. 50% zur physiologischen Standortflora. Viele dieser Keime wirken sich unterschiedlich auf die Aktivierung des angeborenen Immunsystems in der Mundhöhle aus, was eine Differenzierung zwischen pathogenen Keimen und physiologischer Standortflora schwierig macht. Zum einen können bestimmte Keime durch unterschiedliche Mechanismen die epitheliale Immunantwort unterdrücken, wie z. B. für avirulente Salmonellenstämme gezeigt werden konnte (116). Andere Keime, wie z. B. *Fusobacterium nucleatum*, haben wiederum die Eigenschaft, in der Mundhöhle die Produktion von Defensinen zu induzieren (89). Auch *Porphyromonas gingivalis*, ein pathogener Keim, der für die Entstehung von Parodontitis verantwortlich ist, kann die hBD2-Produktion induzieren (90). Diese Erkenntnisse zeigen, dass der AMP-Spiegel im Sputum unter anderem von der Art der Mundflora und deren Immunogenität abhängt und somit auch bei nicht-infektiösen Patienten eine geringe hBD2-Konzentration im Sputum nachweisbar sein kann. Dies zeigte sich auch bei unseren Kontrollpatienten, bei denen im Sputum geringe Mengen von hBD2 zu finden waren. Für LL-37 gilt diese Erkenntnis genauso, da es aufgrund eines Entzündungsreizes durch Bakterien der Mundflora zu einer Infiltration der Mukosa mit neutrophilen Granulozyten kommt, welche für die Produktion von LL-37 verantwortlich sind. Die LL-37-Konzentrationen bei gesunden Patienten fallen aber deutlich geringer aus als bei einer pulmonalen Infektion.

### **BAL und Sputum unterscheiden sich nicht in der Höhe Ihrer AMP-Konzentration**

Vor der Auswertung der Ergebnisse des Vergleichs zwischen den AMP-Konzentrationen in BAL- und Sputumproben sollte die Zellzusammensetzung der verschiedenen Probenarten betrachtet werden. Vergleicht man Sputum- und BAL-Proben von Asthma-Patienten, so kann in Sputumproben eine höhere Anzahl an neutrophilen

Granulozyten gefunden werden, wohingegen in BALs vermehrt Makrophagen und Lymphozyten zu finden sind (107). Neben der Zellzusammensetzung unterscheiden sich die Probenarten in ihrem Ursprungsort. Während Sputum aus den proximalen, eher zentral gelegenen Lungenbereichen stammt, werden BALs in den weiter peripher gelegenen Abschnitten gewonnen. In beiden Bereichen stellt neben den Entzündungszellen das Atemwegsepithel eine weitere Quelle von AMPs dar.

Beim Vergleich der AMP-Konzentrationen in BAL und Sputum von Pneumoniepatienten konnte weder für hBD2 noch für LL-37 ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Probenarten festgestellt werden. Somit werden Konzentrationsunterschiede, wie sie bei Gesunden zum Beispiel für LL-37 bestehen, im Entzündungsfall ausgeglichen. Im Zuge einer Entzündungsreaktion kommt es zu einer starken Migration von Entzündungszellen in das entsprechende Gebiet, wodurch die lokalen Unterschiede in der Zellzusammensetzung aufgehoben werden. Desweiteren stellen Lungeninfektionen einen starken Induktionsreiz für die Produktion von AMPs dar, so dass in diesem Fall sowohl in der BAL als auch im Sputum ein Anstieg des AMP-Spiegels zu erwarten ist. Durch diese Aktivierung des Entzündungsgeschehens kommt es zu einer Angleichung der AMP-Konzentrationen in BAL und Sputum, so wie es in dieser Arbeit gezeigt werden konnte.

Die Bewertung der AMP-Konzentration in Sputumproben ist durch die kommensalische Besiedelung der Mundhöhle und der damit verbundenen Kontamination der Probe mit oralen AMPs schwierig. Zwei Gründe sprechen allerdings dafür, dass trotz dieser Kontamination die Aussagekraft der Ergebnisse nicht wesentlich beeinträchtigt wird. Zum einen ist die Induzierbarkeit der oralen hBD2-Produktion im Vergleich zur trachealen Produktion wesentlich geringer. Auf LPS-Reize kommt es in der Speichelflüssigkeit nur zu einer geringgradigen hBD2-Erhöhung (40). Dies ist sinnvoll in Hinblick auf die Vermeidung von überschießenden Entzündungsreaktionen aufgrund des ständigen Sekretionsreizes in der Mundhöhle. Zum anderen beträgt der AMP-Spiegel im Sputum von gesunden Menschen nur einen geringen Anteil des AMP-Niveaus bei Pneumoniepatienten und trägt damit nur einen sehr geringen prozentualen Anteil zur Gesamtkonzentration bei Pneumoniepatienten bei.

### **Zwischen der AMP-Konzentration und den Entzündungsparametern bestehen signifikante Korrelationen**

Bei der Korrelationsanalyse der AMP-Konzentrationen mit den klinisch-chemischen Daten der Pneumonie-Patienten fallen signifikante Zusammenhänge mit verschiedenen Entzündungsparametern auf. Vergleicht man die LL-37-Konzentrationen der einzelnen Patienten mit ihren CRP-Werten, so zeigt sich ein signifikant positiver Zusammenhang. Dieser zeigt sich jedoch nicht für hBD2. Ein Zusammenhang zwischen der beta-Defensin-Konzentration und den CRP-Werten wurde aktuell in einer Studie veröffentlicht (187). Dabei korreliert der CRP-Wert von Patienten mit einer chronischen Infektion mit *Pseudomonas aeruginosa* negativ mit dem hBD1-Spiegel und positiv mit dem hBD2- und hBD4-Konzentration. Die Patienten in der vorliegenden Arbeit litten hingegen an einem akuten Entzündungsgeschehen. Für diesen Fall konnte der Zusammenhang zwischen dem CRP-Wert und der hBD2-Konzentration nicht bestätigt werden.

Die Produktion von CRP in den Hepatozyten wird von den Zytokinen IL-1 $\beta$  und IL-6 kontrolliert (92). IL-1 $\beta$  ist ein Zytokin, das in einer Vielzahl von Zellen produziert wird, unter anderem Makrophagen, Endo- und Epithelzellen. IL-6 wird hauptsächlich in aktivierten Monozyten und in Makrophagen produziert. Wie die AMP-Produktion wird die IL-1 $\beta$ -Produktion u.a. auch durch Bakterien und LPS reguliert. Gleichzeitig kann ein erhöhter IL-1 $\beta$ -Spiegel die AMP-Konzentration, z.B. von hBD2 steigern (59). Der Zusammenhang zwischen der Höhe der LL-37-Konzentration und des CRP-Wertes scheint daher eher durch die gleichen Mechanismen in der Peptidregulation als durch direkte Kausalität bedingt zu sein. Die positive Korrelation zeigt aber auch die Verbindung zwischen einem lokalen Entzündungsgeschehen und der systemischen Immunantwort. Die Induktion der IL-1 $\beta$ -Produktion durch mikrobielle Pathogenitätsfaktoren, z.B. LPS, in der Lunge führt zum einen zu einer lokalen Immunantwort, nämlich der Erhöhung der LL-37-Konzentration, und zum anderen zu einer systemischen Antwort, die sich in einer erhöhten CRP-Konzentration darstellt.

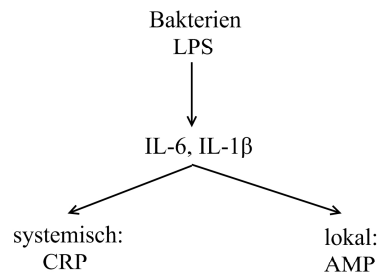


Abb. 30: Graphische Darstellung der systemischen und lokalen Auswirkungen einer Entzündung

Obwohl die hBD2-Produktion genauso durch IL-1 $\beta$  induzierbar ist und obwohl der CRP-Wert bei der chronischen Entzündung niedriger ist als bei der akuten, konnte kein Zusammenhang zwischen der hBD2-Konzentration und dem CRP-Wert festgestellt werden, wie es Yanagi et al. gelungen ist (188). Dies legt nahe, dass bei akuten und chronischen Entzündungen weitere, bislang unbekannte Regulatoren Einfluss auf die hBD2- und CRP-Konzentration nehmen.

Das von aktivierten Makrophagen und neutrophilen Granulozyten produzierte Zytokinmuster (IL-1, IL-6, IL-8 und TNF- $\alpha$ ) ist auch für die vermehrte Mobilisierung von neutrophilen Granulozyten aus Knochenmark und Endothel verantwortlich. Dies spiegelt sich in der klinisch-chemischen Diagnostik als Leukozytose (>11.300/ $\mu$ l) und ein vermehrtes Auftreten von jungen, stabkernigen Granulozyten wieder. In der vorliegenden Arbeit konnte demonstriert werden, dass es zwischen der Anzahl der Leukozyten und der LL-37-Konzentration einen signifikanten Zusammenhang gibt. Noch deutlicher zeigt sich die Linksverschiebung der Granulozytenpopulation. Der Zusammenhang zwischen der LL-37-Konzentration und dem prozentualen Anteil stabkerniger Granulozyten ist hoch signifikant.

Neben den pulmonalen Epithelzellen sind die neutrophilen Granulozyten der Hauptproduzent von LL-37 in der Lunge. Gleichzeitig muss auch hier wieder beachtet werden, dass die gleichen Zytokine, die für die Veränderungen in der Granulozytenzahl und –population verantwortlich sind, auch die Expression von AMPs steigern (59). Gleichzei-

tig sind die gleichen Moleküle, die in Makrophagen die Zytokinexpression steigern, Liganden für TLRs auf Epithelzellen und neutrophilen Granulozyten und erhöhen dadurch die AMP-Konzentration unabhängig von den Zytokinen. Unter diesem Gesichtspunkt können die LL-37-Konzentration und die Leukozytenzahl als voneinander unabhängig betrachtet werden, da sie aufgrund der gleichen Sekretions- bzw. Mobilisationsreize gemeinsam als Teil der angeborenen Immunantwort auftreten. Es muss aber weiterhin beachtet werden, dass AMPs durch ihre immunmodulatorische Eigenschaft selbst als Chemokin wirken und fähig sind, Leukozyten an den Ort der Entzündung zu rekrutieren (84). Das Ergebnis, dass erhöhte LL-37-Werte mit einer gesteigerten Leukozytenanzahl einhergehen, bestätigt diese Eigenschaft der AMPs.

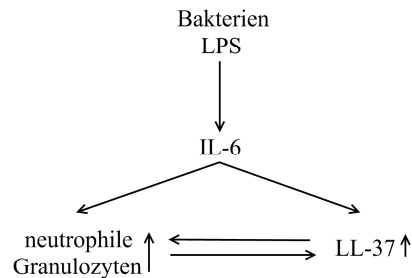


Abb. 31: Graphische Darstellung der Induktion des Anstieges der Konzentration von neutrophilen Granulozyten und LL-37: Die Konzentration von neutrophilen Granulozyten und von LL-37 wird dabei von IL-6 und untereinander stimuliert

Im Gegensatz zu LL-37 gibt es keinen Zusammenhang zwischen der hBD2-Konzentration und der Höhe der Leukozytenanzahl oder der Linksverschiebung. Es besteht lediglich ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem hBD2-Spiegel und dem prozentualen Anteil segmentkerniger, also reifer Leukozyten.

### Patienten mit einer Legionellenpneumonie zeigen erhöhte hBD2-Konzentrationen

Ein Vertreter der Erreger einer atypischen Pneumonie ist *Legionella pneumophila*. Bei insgesamt 13 Patienten aus dem zur Verfügung stehenden Probandenpool konnte dieser



Erreger diagnostiziert werden. Chang et al. konnten zeigen, dass die Infektion von Atemwegszellen mit *L. pneumophila* eine vermehrte Sekretion von IL-8, IL-6 und TNF- $\alpha$  auslöst (26). Die Erkennung des Pathogens erfolgt dabei auch über TLR2 (48). Dieser Rezeptor befindet sich sowohl auf neutrophilen Granulozyten auch auf Atemwegsepithelzellen und vermittelt dort über einen MyD88-abhängigen Signalweg eine Erhöhung der NF- $\kappa$ B-Konzentration. Dies bewirkt wiederum eine vermehrte Bindung dieses Transkriptionsfaktors an seine Bindungsstellen, welche u.a. an der Promoterregion des hBD2-Gens liegt und damit eine Steigerung der hBD2-Genexpression hervorruft. Die vermehrte Sekretion von hBD2 bei Legionelleninfektionen konnte auch bei den 13 Patienten aus der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. Die durchschnittliche hBD2-Konzentration lag signifikant höher als bei Patienten mit anderen Pneumonieerregern. Da die Aktivierung der AMP-Sekretion bei Legionellen und den übrigen Keimen über die gleichen PAMP und PRR stattfindet, stellt sich nun die Frage, wodurch es zu den höheren hBD2-Konzentrationen bei Legionellen-Infektionen kommt. Der Hauptunterschied zu den anderen Pneumonieerregern ist die intrazelluläre Lebensweise von Legionellen, wodurch sie in den Zellen eine viel größere Konzentration erreichen als extrazellulär lebende Keime. Dadurch steigt natürlich auch die Fähigkeit, über intrazellulär lokalisierte PRR (wie z. B. TLR9) eine Immunantwort auszulösen.

### **Die LL-37-Konzentration als prognostischer Marker**

Bei der Behandlung von Infektionskrankheiten ist es von großem Interesse, wie die prognostischen Aussichten der Erkrankung sind, um die Art und Intensität der Therapie danach auszurichten. Für die Pneumonie stehen hierfür verschiedene klinische (Körpertemperatur), klinisch-chemische (CRP, BGA), radiologische (Röntgen-Thorax) und mikrobiologische (Erregerdiagnostik) Daten zur Verfügung. Es war das Ziel der statistischen Analyse, herauszufinden, ob diese prognostischen Marker in Einklang mit der Aktivierung des Immunsystems stehen und damit auch durch Messung der Immunantwort eine Aussage über die Aktivität der Erkrankung gemacht werden kann.

Beim Vergleich der Peptidkonzentrationen mit den einzelnen Werten des CRB65-Scores konnte weder für hBD2 noch für LL-37 ein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Leveln festgestellt werden. Der CRB-65-Score ist ein anerkannter Index

zur Abschätzung der Mortalität bei CAP und der damit verbundenen Indikation zur entsprechenden Therapie (z.B. ambulant/stationär) (15). Mittlerweile gibt es für den CRB-65 mehrere zusätzliche Parameter, die eine noch bessere Risikostratifizierung erlauben. Dabei handelt es sich hauptsächlich um Proteine, die während der akuten Phase der Entzündung auftreten. Einer dieser Parameter ist das Procalcitonin, dessen Konzentration analog mit den CRB-65 Risikoklassen ansteigt (91). Für LL-37 und hBD2 konnte eine solche Eigenschaft nicht festgestellt werden.

Betrachtet man die LL-37-Konzentrationen der 61 Patienten, die im Verlauf der Pneumonie hospitalisiert werden mussten, so fällt auf, dass Patienten mit hohen LL-37-Spiegeln signifikant länger im Krankenhaus bleiben müssen. Mit dieser Erkenntnis lässt sich aber noch keine Aussage über die prognostische Aussagekraft der initialen LL-37-Konzentration machen, zumal weder der Sauerstoffbedarf noch die Dauer der Antibiotikatherapie in gleicher Weise mit dem LL-37-Spiegel korrelieren. Gleichzeitig besteht auch kein signifikanter Unterschied in den AMP-Konzentrationen von hospitalisierten und nicht-hospitalisierten Patienten.

Die Analyse der Hospitalisierungsdauer zeigt aber, dass eine starke Induktion der Immunantwort mit einem längeren und schwereren klinischen Verlauf verbunden ist. Gleichzeitig ist bekannt, dass es Keime gibt, die aufgrund verschiedener Pathogenitätsfaktoren schwerere und langwierigere Infektionen verursachen. Zusammenfassend stellt sich daraus die Frage, ob sich die Pathogenität der Keime auch in den induzierten LL-37-Konzentrationen widerspiegelt. Zur Beantwortung dieser Frage müssten die Pneumoniepatienten nach verursachenden Keim gruppiert werden und dann die LL-37-Konzentrationen miteinander verglichen werden. Gelingt ein Nachweis für den Zusammenhang zwischen dem verursachendem Keim und der LL-37-Konzentration, kann auch bei fehlendem Keimnachweis eine prognostische Aussage aufgrund des AMP-Spiegels gemacht werden. Zwar wurde bei allen Patienten auch eine mikrobiologische Diagnostik durchgeführt, allerdings ergab diese nur bei 36 Patienten einen serologischen oder andersartigen Keimnachweis. Das Keimspektrum war zudem breit gefächert. Während Legionellen insgesamt elfmal nachgewiesen werden konnten, betrug die Anzahl der anderen Keime maximal vier (*Streptococcus pneumoniae*). Diese geringe Anzahl lässt keine aussagekräftige Analyse zu.

### **Die LL-37-Konzentration bei Patienten mit malignen Tumorerkrankungen**

Neben den mikrobiziden Eigenschaften besitzen AMPs zahlreiche andere Eigenschaften. Dazu gehört auch die Förderung der Proliferation von Epithelzellen und der Wundheilung (143). Sowohl für hBD2 (136) als auch für LL-37 (32, 174) konnte in Studien eine prokarzinogene Wirkung nachgewiesen werden. Die Produktion der antimikrobiellen Peptide erfolgt dabei durch die Tumorzellen selbst, wobei LL-37 bei in vivo-Versuchen seine proliferative Wirkung schon bei sehr geringen Konzentrationen (5 ng/ml) entfaltet. Das Tumorwachstum wird durch direkte Aktivierung von Tumorzellen, der Initialisierung der Angiogenese und der Rekrutierung von Immunzellen gefördert.

Unter den zur Verfügung stehenden Patienten hatten sechs Personen zum Zeitpunkt der Infektion zusätzlich eine maligne Erkrankung. Vergleicht man die LL-37-Konzentrationen von Tumorpatienten mit den Werten von Gesunden, so zeigt sich bei Tumorpatienten eine signifikant niedrigere LL-37-Konzentration. Dies ist allerdings kein Gegenbeweis für die proliferationsfördernde Eigenschaft von LL-37. Der Grund hierfür liegt in der Art der verwendeten Proben. Diese sind alle im Status der akuten Entzündung abgenommen worden. Dies verfälscht das Ergebnis insofern, da dadurch auch bei Nicht-Tumor Patienten eine erhöhte LL-37-Konzentration möglich ist. Um ein diskussionsfähiges Ergebnis zu erhalten, müsste man die Proben nach der Genesung der Patienten abnehmen. Auch die Erkenntnis, dass Pneumoniepatienten mit Tumoren eine signifikant niedrigere LL-37-Konzentration als Pneumoniepatienten ohne Tumor ist aufgrund der Interferenz des Entzündungsgeschehens nicht auswertbar.

### **Die AMP-Konzentrationen von Rauchern mit CAP im Vergleich zu Nicht-Rauchern mit CAP**

Der inhalative Zigarettenkonsum beeinflusst auf vielfältige Art und Weise das pulmonale Abwehrsystem, was neben einem Emphysem und Atelektasenbildung in einer gesteigerten Prädisposition für Infektionen resultiert. Da Zigarettenrauch (CS) ein äußerst heterogenes Gemisch aus mehreren tausend Substanzen darstellt, ist es bis jetzt nur für einzelne Inhaltstoffe gelungen, die Auswirkung auf das pulmonale Immunsystem nachzuweisen. Nach einer aktuellen Studie steht allerdings fest, dass Acrolein, einer der

Hauptbestandteile im CS, die IL-8- und hBD2-Produktion in sinonasalen Epithelzellen auch im nicht-entzündeten Zustand verringert (95). Wie sich CS bei Patienten mit einer COPD auf die hBD2-Konzentration auswirkt, hängt offensichtlich vom Schweregrad der Erkrankung ab. Während es bei leichten bis mittelschweren Fällen zu einer Hochregulierung der TLR4- und hBD2-Produktion kommt, zeigen Patienten mit einer schweren COPD eine Downregulierung von TLR4 und hBD2 (105).

Von dieser Erkenntnis ausgehend war es ein Ziel der Arbeit, den Unterschied in der AMP-Konzentration zwischen den Rauchern und den Nicht-Rauchern zu quantifizieren. Bei der Korrelation der gemessenen Konzentrationen mit dem Raucherstatus konnte allerdings weder für hBD2 noch für LL-37 ein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Um die Theorie zu überprüfen, dass die AMP-Produktion vom Stadium der COPD abhängt, wurden die echten Raucher (Raucher zum aktuellen Untersuchungszeitraum) nach ihren konsumierten Zigaretten eingeteilt (packyears). Auch diese Analyse brachte keinen signifikanten Unterschied in den AMP-Konzentrationen. Der Grund für den fehlenden Nachweis der Unterdrückung der AMP-Produktion durch Zigarettenrauch liegt wahrscheinlich in Heterogenität der Patientengruppe. Um die Problemstellung genau analysieren zu können, müsste der Patientenpool nach Raucher-Nichtraucher, echter-falscher Nicht-Raucher, nach den packyears und nach dem Schweregrad der COPD gematcht werden.

### **Schlussbemerkung**

In der vorliegenden Arbeit wurden mit Hilfe von ELISA und Western-Blot die Konzentration von hBD2 und LL-37 in Sputum- und BAL-Proben von CAP-Patienten gemessen. Die Konzentration lag dabei für hBD2 zwischen 0 – 249 ng/ml und für LL-37 zwischen 21 – 14283 ng/ml.

Die Ergebnisse zeigen deutlich, dass AMPs an der Infektionsabwehr in der Lunge beteiligt sind. Diese Erkenntnis gilt bereits für den allgemeinen Fall einer Lungeninfektion und ist nun auch für den speziellen Fall einer ambulant-erworbenen Pneumonie belegt. LL-37 zeigt dabei im Vergleich zu gesunden Menschen einen signifikanten Anstieg der Konzentration sowohl in Sputum als auch in BAL. Für hBD2 gilt dies nur für Sputumproben. Im Falle einer Infektion kommt es zu einer starken Induktion der Peptidsekretion in der gesamten Lunge, was durch die Angleichung der AMP-Spiegel in BAL- und Sputum-Proben, die aus verschiedenen Lungenbereichen stammen, deutlich wurde.

Die erhöhten AMP-Konzentrationen gehen einher mit erhöhten Entzündungswerten (CRP, Leukozyten) im Blut der Patienten. Dies hat einen kausalen Grund, der in der chemotaktischen Wirkung von AMPs auf Entzündungszellen liegt. Zum anderen sind die verschiedenen Parameter voneinander unabhängig, da ihre Produktion von den gleichen Zytokinen induziert wird. Dies verdeutlicht die komplexe Regulation der Immunantwort und die vielfältige Vernetzung der einzelnen Komponenten.

## 5. Zusammenfassung

Die menschliche Lunge ist durch das Einatmen von Luft einer ständigen Konfrontation mit Mikroorganismen (Bakterien, Viren, Pilze) ausgesetzt. Zur Bekämpfung dieser Pathogene verfügt die Lunge über vielfältige Abwehrmechanismen. Als Teil des angeborenen Immunsystems sind die antimikrobiellen Peptide an diesen Abwehrmaßnahmen beteiligt. Hauptvertreter dieser Peptide in der Lunge sind das Cathelicidin LL-37 und das humane beta-Defensin 2 (hBD-2). Die Produktion der Peptide findet in Epithelzellen und in neutrophilen Granulozyten statt und ist durch mikrobielle Produkte und proinflammatorische Zytokine induzierbar. Ziel der Studie war es, nachzuweisen, dass im speziellen Fall der ambulant erworbenen Pneumonie antimikrobiellen Peptide in erhöhte Konzentrationen in der Lunge vorkommen.

Hierfür wurden im experimentellen Teil der Arbeit mit Hilfe von Western-Blot-Analyse antimikrobielle Peptide nachgewiesen und deren Konzentrationen in Atemwegssekreten von Pneumoniepatienten und von gesunden Menschen durch einen ELISA gemessen. Das verwendete Patientenmaterial bestand sowohl aus Sputumproben als auch aus bronchioalveoläre Lavagen, welche durch das Kompetenznetzwerk ambulant erworbene Pneumonie (CAPNetz) zur Verfügung gestellt wurden. Bei der anschließenden statistischen Auswertung wurden die Ergebnisse der Konzentrationsmessungen mit Befunden aus einem klinischen Datensatzes korreliert.

Dabei konnte zum ersten Mal festgestellt werden, dass bei Patienten mit ambulant erworbener Pneumonie die Konzentration der antimikrobiellen Peptide in der Lunge im Vergleich zu gesunden Menschen signifikant erhöht ist. LL-37 war dabei sowohl in Sputum als auch in der Bronchiallavage gesteigert, hBD2 nur im Sputum. Dies bestätigt zum einen die Bedeutung der antimikrobiellen Peptide bei der Abwehr von pathogenen Keimen als auch deren induzierbare Produktion. Für die großen Schwankungen der Messwerte um den Mittelwert werden die schlechte Standardisierbarkeit und Störfaktoren bei der Probenentnahme verantwortlich gemacht. Unterschiede in der Peptidkonzentration in BALs und Sputum, die bei gesunden Menschen bestehen, gleichen sich im Fall einer Entzündung an. Dies liegt an der vermehrten Produktion durch einwandernde Entzündungszellen und die Induktion der Peptidsekretion durch pathogene Entzündungsmediatoren (z.B. LPS). Auch der verursachende Keim beeinflusst die Konzentra-

tion der antimikrobiellen Peptide. Für Patienten mit einer Legionellenpneumonie konnten höhere Peptid-Spiegel nachgewiesen werden als für andere Keime.

Ein Bestandteil der Immunantwort auf eindringende Keime ist die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen, die neben der Konzentration von antimikrobiellen Peptiden auch die CRP-Konzentration steigern. Bei der Korrelationsanalyse konnte ein signifikant positiver Zusammenhang zwischen erhöhten LL-37-Werten und der CRP-Konzentration aufgezeigt werden. Gleiches gilt für die Anzahl der stabkernigen Leukozyten, welche bei Patienten mit erhöhten LL-37-Werten in größerer Anzahl festgestellt wurden.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass bei der ambulant erworbenen Pneumonie die antimikrobiellen Peptide als induzierbarer Abwehrmechanismus an der Infektionsbekämpfung teilnehmen. Die Konzentrationssteigerung geht dabei mit signifikanten Veränderungen von klinisch-chemischen, mikrobiologischen und anamnestischen Befunden einher.

## 6. Anhang

### Abkürzungen

AM	Alveolarmakrophagen
AMP	Antimikrobielle Peptide
ARDS	Adult-Respiratory-Distress-Syndrom
BAL	Bronchioalveoläre Lavage
BGA	Blutgasanalyse
BmBF	Bundesministerium für Bildung und Forschung
CAP	engl. community-acquired pneumonia; deutsch: ambulant erworbene Pneumonie
CAPNetz	Kompetenznetzwerk Community Acquired Pneumonia
CF	Zystische Fibrose
COPD	chronisch obstructive Lungenerkrankung
CRAMP	cathelin-related antimicrobial peptide
CRP	C-reaktives Peptid
DC	Dendritische Zellen
HAP	engl.: Hospital-acquired pneumonia; deutsch: im Krankenhaus erworbene Pneumonie
IIS	innate immune system
IL	Interleukin
kDa	kilo-Dalton
LPS	Lipopolysaccharid
MC	Memory Cells (Gedächtniszellen)
MHC	minimale Hemmkonzentration
ml	Milliliter
MW	Mittelwert
ng	Nanogramm
OD	optische Dichte
PAMP	pathogen-associated molecular pattern
PMN	Polymorphkerniger Granulozyten



PRR	pattern recognition receptor
py	packyears
$r_s$	Spearman'scher Rangkorrelationskoeffizient
RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung
TLR	toll-like receptor
TNF- $\alpha$	Tumor-Nekrose-Faktor $\alpha$

## Literaturverzeichnis

1. Aarbiou J, Ertmann M, Van WS, van NP, Rook D, Rabe KF, Litvinov SV, van Krieken JH, de Boer WI, Hiemstra PS 2002 Human neutrophil defensins induce lung epithelial cell proliferation in vitro. *J Leukoc Biol* 72:167-174
2. Aarbiou J, Verhoosel RM, Van WS, de Boer WI, van Krieken JH, Litvinov SV, Rabe KF, Hiemstra PS 2004 Neutrophil defensins enhance lung epithelial wound closure and mucin gene expression in vitro. *Am J Respir Cell Mol Biol* 30:193-201
3. Agerberth B, Gunne H, Odeberg J, Kogner P, Boman HG, Gudmundsson GH 1995 FALL-39, a putative human peptide antibiotic, is cysteine-free and expressed in bone marrow and testis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:195-199
4. Agusti A 2006 Thomas a. Neff lecture. Chronic obstructive pulmonary disease: a systemic disease. *Proc Am Thorac Soc* 3:478-481
5. Ahmad-Nejad P, Hacker H, Rutz M, Bauer S, Vabulas RM, Wagner H 2002 Bacterial CpG-DNA and lipopolysaccharides activate Toll-like receptors at distinct cellular compartments. *Eur J Immunol* 32:1958-1968
6. Akira S, Takeda K 2004 Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 4:499-511
7. Armogida SA, Yannaras NM, Melton AL, Srivastava MD 2004 Identification and quantification of innate immune system mediators in human breast milk. *Allergy Asthma Proc* 25:297-304
8. Ashitani J, Mukae H, Ihiboshi H, Taniguchi H, Mashimoto H, Nakazato M, Matsukura S 1996 [Defensin in plasma and in bronchoalveolar lavage fluid from patients with acute respiratory distress syndrome]. *Nihon Kyobu Shikkan Gakkai Zasshi* 34:1349-1353
9. Ashitani J, Mukae H, Nakazato M, Ihi T, Mashimoto H, Kadota J, Kohno S, Matsukura S 1998 Elevated concentrations of defensins in bronchoalveolar lavage fluid in diffuse panbronchiolitis. *Eur Respir J* 11:104-111
10. Bals R, Wang X, Wu Z, Freeman T, Bafna V, Zasloff M, Wilson JM 1998 Human beta-defensin 2 is a salt-sensitive peptide antibiotic expressed in human lung. *J Clin Invest* 102:874-880
11. Bals R, Wang X, Zasloff M, Wilson JM 1998 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 U S A* 95:9541-9546

12. Bals R, Weiner DJ, Meegalla RL, Accurso F, Wilson JM 2001 Salt-independent abnormality of antimicrobial activity in cystic fibrosis airway surface fluid. *Am J Respir Cell Mol Biol* 25:21-25
13. Bals R, Weiner DJ, Meegalla RL, Wilson JM 1999 Transfer of a cathelicidin peptide antibiotic gene restores bacterial killing in a cystic fibrosis xenograft model. *J Clin Invest* 103:1113-1117
14. Banchereau J, Steinman RM 1998 Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392:245-252
15. Bauer TT, Ewig S, Marre R, Suttorp N, Welte T 2006 CRB-65 predicts death from community-acquired pneumonia. *J Intern Med* 260:93-101
16. Becker MN, Diamond G, Verghese MW, Randell SH 2000 CD14-dependent lipopolysaccharide-induced beta-defensin-2 expression in human tracheobronchial epithelium. *J Biol Chem* 275:29731-29736
17. Beisswenger C, Kandler K, Hess C, Garn H, Felgentreff K, Wegmann M, Renz H, Vogelmeier C, Bals R 2006 Allergic airway inflammation inhibits pulmonary antibacterial host defense. *J Immunol* 177:1833-1837
18. Bensch KW, Raida M, Magert HJ, Schulz-Knappe P, Forssmann WG 1995 hBD-1: a novel beta-defensin from human plasma. *FEBS Lett* 368:331-335
19. Beutler B 2004 Innate immunity: an overview. *Mol Immunol* 40:845-859
20. Biragyn A, Surenhu M, Yang D, Ruffini PA, Haines BA, Klyushnenkova E, Oppenheim JJ, Kwak LW 2001 Mediators of innate immunity that target immature, but not mature, dendritic cells induce antitumor immunity when genetically fused with nonimmunogenic tumor antigens. *J Immunol* 167:6644-6653
21. Birchler T, Seibl R, Buchner K, Loeliger S, Seger R, Hossle JP, Aguzzi A, Lauener RP 2001 Human Toll-like receptor 2 mediates induction of the antimicrobial peptide human beta-defensin 2 in response to bacterial lipoprotein. *Eur J Immunol* 31:3131-3137
22. Boheim G 1974 Statistical analysis of alamethicin channels in black lipid membranes. *J Membr Biol* 19:277-303
23. Boucher RC 1994 Human airway ion transport. Part two. *Am J Respir Crit Care Med* 150:581-593
24. Bowdish DM, Davidson DJ, Speert DP, Hancock RE 2004 The human cationic peptide LL-37 induces activation of the extracellular signal-regulated kinase and p38 kinase pathways in primary human monocytes. *J Immunol* 172:3758-3765
25. Brogden KA, Heidari M, Sacco RE, Palmquist D, Guthmiller JM, Johnson GK, Jia HP, Tack BF, McCray PB 2003 Defensin-induced adaptive immunity in

- mice and its potential in preventing periodontal disease. *Oral Microbiol Immunol* 18:95-99
26. Chang B, memura-Maekawa J, Kura F, Kawamura I, Watanabe H 2004 Expression of IL-6 and TNF-alpha in human alveolar epithelial cells is induced by invading, but not by adhering, *Legionella pneumophila*. *Microb Pathog* 37:295-302
  27. Chen X, Niyonsaba F, Ushio H, Nagaoka I, Ikeda S, Okumura K, Ogawa H 2006 Human cathelicidin LL-37 increases vascular permeability in the skin via mast cell activation, and phosphorylates MAP kinases p38 and ERK in mast cells. *J Dermatol Sci* 43:63-66
  28. Chertov O, Michiel DF, Xu L, Wang JM, Tani K, Murphy WJ, Longo DL, Taub DD, Oppenheim JJ 1996 Identification of defensin-1, defensin-2, and CAP37/azurocidin as T-cell chemoattractant proteins released from interleukin-8-stimulated neutrophils. *J Biol Chem* 271:2935-2940
  29. Chromek M, Slamova Z, Bergman P, Kovacs L, Podracka L, Ehren I, Hokfelt T, Gudmundsson GH, Gallo RL, Agerberth B, Brauner A 2006 The antimicrobial peptide cathelicidin protects the urinary tract against invasive bacterial infection. *Nat Med* 12:636-641
  30. Chuang T, Ulevitch RJ 2001 Identification of hTLR10: a novel human Toll-like receptor preferentially expressed in immune cells. *Biochim Biophys Acta* 1518:157-161
  31. Chuang TH, Ulevitch RJ 2000 Cloning and characterization of a sub-family of human toll-like receptors: hTLR7, hTLR8 and hTLR9. *Eur Cytokine Netw* 11:372-378
  32. Coffelt SB, Waterman RS, Florez L, zu Bentrup KH, Zwezdaryk KJ, Tomchuck SL, LaMarca HL, Danka ES, Morris CA, Scandurro AB 2008 Ovarian cancers overexpress the antimicrobial protein hCAP-18 and its derivative LL-37 increases ovarian cancer cell proliferation and invasion. *Int J Cancer* 122:1030-1039
  33. Cowland JB, Johnsen AH, Borregaard N 1995 hCAP-18, a cathelin/pro-bactenecin-like protein of human neutrophil specific granules. *FEBS Lett* 368:173-176
  34. Cox G, Crossley J, Xing Z 1995 Macrophage engulfment of apoptotic neutrophils contributes to the resolution of acute pulmonary inflammation in vivo. *Am J Respir Cell Mol Biol* 12:232-237
  35. Crouch E, Wright JR 2001 Surfactant proteins a and d and pulmonary host defense. *Annu Rev Physiol* 63:521-554
  36. Cunliffe RN, Rose FR, Keyte J, Abberley L, Chan WC, Mahida YR 2001 Human defensin 5 is stored in precursor form in normal Paneth cells and is ex-

pressed by some villous epithelial cells and by metaplastic Paneth cells in the colon in inflammatory bowel disease. *Gut* 48:176-185

37. De Y, Chen Q, Schmidt AP, Anderson GM, Wang JM, Wooters J, Oppenheim JJ, Chertov O 2000 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* 192:1069-1074
38. Dentener MA, Louis R, Cloots RH, Henket M, Wouters EF 2006 Differences in local versus systemic TNFalpha production in COPD: inhibitory effect of hyaluronan on LPS induced blood cell TNFalpha release. *Thorax* 61:478-484
39. Diamond G, Jones DE, Bevins CL 1993 Airway epithelial cells are the site of expression of a mammalian antimicrobial peptide gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:4596-4600
40. Diamond G, Kaiser V, Rhodes J, Russell JP, Bevins CL 2000 Transcriptional regulation of beta-defensin gene expression in tracheal epithelial cells. *Infect Immun* 68:113-119
41. Diamond G, Zasloff M, Eck H, Brasseur M, Maloy WL, Bevins CL 1991 Tracheal antimicrobial peptide, a cysteine-rich peptide from mammalian tracheal mucosa: peptide isolation and cloning of a cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:3952-3956
42. Du X, Poltorak A, Wei Y, Beutler B 2000 Three novel mammalian toll-like receptors: gene structure, expression, and evolution. *Eur Cytokine Netw* 11:362-371
43. Ernst RK, Yi EC, Guo L, Lim KB, Burns JL, Hackett M, Miller SI 1999 Specific lipopolysaccharide found in cystic fibrosis airway *Pseudomonas aeruginosa*. *Science* 286:1561-1565
44. Fahy JV, Kim KW, Liu J, Boushey HA 1995 Prominent neutrophilic inflammation in sputum from subjects with asthma exacerbation. *J Allergy Clin Immunol* 95:843-852
45. Fang XM, Schroder S, Hoefl A, Stuber F 1999 Comparison of two polymorphisms of the interleukin-1 gene family: interleukin-1 receptor antagonist polymorphism contributes to susceptibility to severe sepsis. *Crit Care Med* 27:1330-1334
46. Felgentreff K, Beisswenger C, Griese M, Gulder T, Bringmann G, Bals R 2006 The antimicrobial peptide cathelicidin interacts with airway mucus. *Peptides* 27:3100-3106
47. Franke-Ullmann G, Pfortner C, Walter P, Steinmuller C, Lohmann-Matthes ML, Kobzik L 1996 Characterization of murine lung interstitial macrophages in comparison with alveolar macrophages in vitro. *J Immunol* 157:3097-3104

48. Fuse ET, Tateda K, Kikuchi Y, Matsumoto T, Gondaira F, Azuma A, Kudoh S, Standiford TJ, Yamaguchi K 2007 Role of Toll-like receptor 2 in recognition of *Legionella pneumophila* in a murine pneumonia model. *J Med Microbiol* 56:305-312
49. Ganz T, Lehrer RI 1994 Defensins. *Curr Opin Immunol* 6:584-589
50. Gao JL, Lee EJ, Murphy PM 1999 Impaired antibacterial host defense in mice lacking the N-formylpeptide receptor. *J Exp Med* 189:657-662
51. Gao Y, Lecker S, Post MJ, Hietaranta AJ, Li J, Volk R, Li M, Sato K, Saluja AK, Steer ML, Goldberg AL, Simons M 2000 Inhibition of ubiquitin-proteasome pathway-mediated I kappa B alpha degradation by a naturally occurring antibacterial peptide. *J Clin Invest* 106:439-448
52. Girardin SE, Boneca IG, Carneiro LA, Antignac A, Jehanno M, Viala J, Tedin K, Taha MK, Labigne A, Zahringer U, Coyle AJ, DiStefano PS, Bertin J, Sansonetti PJ, Philpott DJ 2003 Nod1 detects a unique muropeptide from gram-negative bacterial peptidoglycan. *Science* 300:1584-1587
53. Girardin SE, Hugot JP, Sansonetti PJ 2003 Lessons from Nod2 studies: towards a link between Crohn's disease and bacterial sensing. *Trends Immunol* 24:652-658
54. Gorter AD, Eijk PP, Van WS, Hiemstra PS, Dankert J, van AL 1998 Stimulation of the adherence of *Haemophilus influenzae* to human lung epithelial cells by antimicrobial neutrophil defensins. *J Infect Dis* 178:1067-1074
55. Griffin S, Taggart CC, Greene CM, O'Neill S, McElvaney NG 2003 Neutrophil elastase up-regulates human beta-defensin-2 expression in human bronchial epithelial cells. *FEBS Lett* 546:233-236
56. Gudmundsson GH, Agerberth B 1999 Neutrophil antibacterial peptides, multifunctional effector molecules in the mammalian immune system. *J Immunol Methods* 232:45-54
57. Hammad H, Lambrecht BN, Pochard P, Gosset P, Marquillies P, Tonnel AB, Pestel J 2002 Monocyte-derived dendritic cells induce a house dust mite-specific Th2 allergic inflammation in the lung of humanized SCID mice: involvement of CCR7. *J Immunol* 169:1524-1534
58. Han KJ, Su X, Xu LG, Bin LH, Zhang J, Shu HB 2004 Mechanisms of the TRIF-induced interferon-stimulated response element and NF-kappaB activation and apoptosis pathways. *J Biol Chem* 279:15652-15661
59. Harder J, Meyer-Hoffert U, Teran LM, Schwichtenberg L, Bartels J, Maune S, Schroder JM 2000 Mucoid *Pseudomonas aeruginosa*, TNF-alpha, and IL-1beta, but not IL-6, induce human beta-defensin-2 in respiratory epithelia. *Am J Respir Cell Mol Biol* 22:714-721

60. Hasan U, Chaffois C, Gaillard C, Saulnier V, Merck E, Tancredi S, Guiet C, Briere F, Vlach J, Lebecque S, Trinchieri G, Bates EE 2005 Human TLR10 is a functional receptor, expressed by B cells and plasmacytoid dendritic cells, which activates gene transcription through MyD88. *J Immunol* 174:2942-2950
61. Hayashi F, Smith KD, Ozinsky A, Hawn TR, Yi EC, Goodlett DR, Eng JK, Akira S, Underhill DM, Aderem A 2001 The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* 410:1099-1103
62. Heil F, Hmad-Nejad P, Hemmi H, Hochrein H, Ampenberger F, Gellert T, Dietrich H, Lipford G, Takeda K, Akira S, Wagner H, Bauer S 2003 The Toll-like receptor 7 (TLR7)-specific stimulus loxoribine uncovers a strong relationship within the TLR7, 8 and 9 subfamily. *Eur J Immunol* 33:2987-2997
63. Heilborn JD, Nilsson MF, Kratz G, Weber G, Sorensen O, Borregaard N, Stahle-Backdahl M 2003 The cathelicidin anti-microbial peptide LL-37 is involved in re-epithelialization of human skin wounds and is lacking in chronic ulcer epithelium. *J Invest Dermatol* 120:379-389
64. Heller WT, Waring AJ, Lehrer RI, Harroun TA, Weiss TM, Yang L, Huang HW 2000 Membrane thinning effect of the beta-sheet antimicrobial protegrin. *Biochemistry* 39:139-145
65. Herasimenka Y, Benincasa M, Mattiuzzo M, Cescutti P, Gennaro R, Rizzo R 2005 Interaction of antimicrobial peptides with bacterial polysaccharides from lung pathogens. *Peptides* 26:1127-1132
66. Hickling TP, Clark H, Malhotra R, Sim RB 2004 Collectins and their role in lung immunity. *J Leukoc Biol* 75:27-33
67. Hiemstra PS, Maassen RJ, Stolk J, Heinzl-Wieland R, Steffens GJ, Dijkman JH 1996 Antibacterial activity of antileukoprotease. *Infect Immun* 64:4520-4524
68. Hippenstiel S, Opitz B, Schmeck B, Suttorp N 2006 Lung epithelium as a sentinel and effector system in pneumonia--molecular mechanisms of pathogen recognition and signal transduction. *Respir Res* 7:97
69. Hiratsuka T, Nakazato M, Date Y, Ashitani J, Minematsu T, Chino N, Matsuura S 1998 Identification of human beta-defensin-2 in respiratory tract and plasma and its increase in bacterial pneumonia. *Biochem Biophys Res Commun* 249:943-947
70. Hoebe K, Du X, Georgel P, Janssen E, Tabet K, Kim SO, Goode J, Lin P, Mann N, Mudd S, Crozat K, Sovath S, Han J, Beutler B 2003 Identification of Lps2 as a key transducer of MyD88-independent TIR signalling. *Nature* 424:743-748
71. Hogg JC, Chu F, Utokaparch S, Woods R, Elliott WM, Buzatu L, Cherniack RM, Rogers RM, Sciruba FC, Coxson HO, Pare PD 2004 The nature of small-

- airway obstruction in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 350:2645-2653
72. Hollox EJ, Armour JA, Barber JC 2003 Extensive normal copy number variation of a beta-defensin antimicrobial-gene cluster. *Am J Hum Genet* 73:591-600
  73. Hoshino K, Takeuchi O, Kawai T, Sanjo H, Ogawa T, Takeda Y, Takeda K, Akira S 1999 Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. *J Immunol* 162:3749-3752
  74. Huttner KM, Bevins CL 1999 Antimicrobial peptides as mediators of epithelial host defense. *Pediatr Res* 45:785-794
  75. Imai K, Dalal SS, Chen ES, Downey R, Schulman LL, Ginsburg M, D'Armiento J 2001 Human collagenase (matrix metalloproteinase-1) expression in the lungs of patients with emphysema. *Am J Respir Crit Care Med* 163:786-791
  76. Inohara N, Koseki T, del PL, Hu Y, Yee C, Chen S, Carrio R, Merino J, Liu D, Ni J, Nunez G 1999 Nod1, an Apaf-1-like activator of caspase-9 and nuclear factor-kappaB. *J Biol Chem* 274:14560-14567
  77. Ishimoto H, Mukae H, Date Y, Shimbara T, Mondal MS, Ashitani J, Hiratsuka T, Kubo S, Kohno S, Nakazato M 2006 Identification of hBD-3 in respiratory tract and serum: the increase in pneumonia. *Eur Respir J* 27:253-260
  78. Islam D, Bandholtz L, Nilsson J, Wigzell H, Christensson B, Agerberth B, Gudmundsson G 2001 Downregulation of bactericidal peptides in enteric infections: a novel immune escape mechanism with bacterial DNA as a potential regulator. *Nat Med* 7:180-185
  79. Jia HP, Schutte BC, Schudy A, Linzmeier R, Guthmiller JM, Johnson GK, Tack BF, Mitros JP, Rosenthal A, Ganz T, McCray PB, Jr. 2001 Discovery of new human beta-defensins using a genomics-based approach. *Gene* 263:211-218
  80. Jiang Z, Mak TW, Sen G, Li X 2004 Toll-like receptor 3-mediated activation of NF-kappaB and IRF3 diverges at Toll-IL-1 receptor domain-containing adapter inducing IFN-beta. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:3533-3538
  81. Jones DE, Bevins CL 1993 Defensin-6 mRNA in human Paneth cells: implications for antimicrobial peptides in host defense of the human bowel. *FEBS Lett* 315:187-192
  82. Jones JG, Minty BD, Lawler P, Hulands G, Crawley JC, Veall N 1980 Increased alveolar epithelial permeability in cigarette smokers. *Lancet* 1:66-68
  83. Kagan BL, Ganz T, Lehrer RI 1994 Defensins: a family of antimicrobial and cytotoxic peptides. *Toxicology* 87:131-149



84. Kai-Larsen Y, Agerberth B 2008 The role of the multifunctional peptide LL-37 in host defense. *Front Biosci* 13:3760-3767
85. Kandler K, Shaykhiev R, Kleemann P, Kleszcz F, Lohoff M, Vogelmeier C, Bals R 2006 The anti-microbial peptide LL-37 inhibits the activation of dendritic cells by TLR ligands. *Int Immunol* 18:1729-1736
86. Kimbrell DA, Beutler B 2001 The evolution and genetics of innate immunity. *Nat Rev Genet* 2:256-267
87. Klotman ME, Chang TL 2006 Defensins in innate antiviral immunity. *Nat Rev Immunol* 6:447-456
88. Koczulla R, von DG, Kupatt C, Krotz F, Zahler S, Gloe T, Issbrucker K, Unterberger P, Zaiou M, Lebherz C, Karl A, Raake P, Pfosser A, Boekstegers P, Welsch U, Hiemstra PS, Vogelmeier C, Gallo RL, Clauss M, Bals R 2003 An angiogenic role for the human peptide antibiotic LL-37/hCAP-18. *J Clin Invest* 111:1665-1672
89. Krisanaprakornkit S, Kimball JR, Weinberg A, Darveau RP, Bainbridge BW, Dale BA 2000 Inducible expression of human beta-defensin 2 by *Fusobacterium nucleatum* in oral epithelial cells: multiple signaling pathways and role of commensal bacteria in innate immunity and the epithelial barrier. *Infect Immun* 68:2907-2915
90. Krisanaprakornkit S, Kimball JR, Weinberg A, Darveau RP, Bainbridge BW, Dale BA 2000 Inducible expression of human beta-defensin 2 by *Fusobacterium nucleatum* in oral epithelial cells: multiple signaling pathways and role of commensal bacteria in innate immunity and the epithelial barrier. *Infect Immun* 68:2907-2915
91. Kruger S, Ewig S, Marre R, Papassotiriou J, Richter K, von BH, Suttorp N, Welte T 2008 Procalcitonin predicts patients at low risk of death from community-acquired pneumonia across all CRB-65 classes. *Eur Respir J* 31:349-355
92. Kushner I, Jiang SL, Zhang D, Lozanski G, Samols D 1995 Do post-transcriptional mechanisms participate in induction of C-reactive protein and serum amyloid A by IL-6 and IL-1? *Ann N Y Acad Sci* 762:102-107
93. Latz E, Schoenemeyer A, Visintin A, Fitzgerald KA, Monks BG, Knetter CF, Lien E, Nilsen NJ, Espevik T, Golenbock DT 2004 TLR9 signals after translocating from the ER to CpG DNA in the lysosome. *Nat Immunol* 5:190-198
94. Le J, Vilcek J 1987 Tumor necrosis factor and interleukin 1: cytokines with multiple overlapping biological activities. *Lab Invest* 56:234-248
95. Lee WK, Ramanathan M, Jr., Spannhake EW, Lane AP 2007 The cigarette smoke component acrolein inhibits expression of the innate immune components IL-8 and human beta-defensin 2 by sinonasal epithelial cells. *Am J Rhinol* 21:658-663

96. Lehrer RI, Ganz T 2002 Cathelicidins: a family of endogenous antimicrobial peptides. *Curr Opin Hematol* 9:18-22
97. Lehrer RI, Ganz T, Selsted ME 1991 Defensins: endogenous antibiotic peptides of animal cells. *Cell* 64:229-230
98. Li J, Post M, Volk R, Gao Y, Li M, Metais C, Sato K, Tsai J, Aird W, Rosenberg RD, Hampton TG, Sellke F, Carmeliet P, Simons M 2000 PR39, a peptide regulator of angiogenesis. *Nat Med* 6:49-55
99. Lichtenstein AK, Ganz T, Selsted ME, Lehrer RI 1988 Synergistic cytolysis mediated by hydrogen peroxide combined with peptide defensins. *Cell Immunol* 114:104-116
100. Lillard JW, Jr., Boyaka PN, Chertov O, Oppenheim JJ, McGhee JR 1999 Mechanisms for induction of acquired host immunity by neutrophil peptide defensins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:651-656
101. Lindahl M, Stahlbom B, Tagesson C 1995 Two-dimensional gel electrophoresis of nasal and bronchoalveolar lavage fluids after occupational exposure. *Electrophoresis* 16:1199-1204
102. Lindahl M, Svartz J, Tagesson C 1999 Demonstration of different forms of the anti-inflammatory proteins lipocortin-1 and Clara cell protein-16 in human nasal and bronchoalveolar lavage fluids. *Electrophoresis* 20:881-890
103. Lopez AD, Murray CC 1998 The global burden of disease, 1990-2020. *Nat Med* 4:1241-1243
104. Lu Z, Kim KA, Suico MA, Shuto T, Li JD, Kai H 2004 MEF up-regulates human beta-defensin 2 expression in epithelial cells. *FEBS Lett* 561:117-121
105. MacRedmond RE, Greene CM, Dorscheid DR, McElvaney NG, O'Neill SJ 2007 Epithelial expression of TLR4 is modulated in COPD and by steroids, salmeterol and cigarette smoke. *Respir Res* 8:84
106. Maestrelli P, Saetta M, Di SA, Calcagni PG, Turato G, Ruggieri MP, Roggeri A, Mapp CE, Fabbri LM 1995 Comparison of leukocyte counts in sputum, bronchial biopsies, and bronchoalveolar lavage. *Am J Respir Crit Care Med* 152:1926-1931
107. Maestrelli P, Saetta M, Di SA, Calcagni PG, Turato G, Ruggieri MP, Roggeri A, Mapp CE, Fabbri LM 1995 Comparison of leukocyte counts in sputum, bronchial biopsies, and bronchoalveolar lavage. *Am J Respir Crit Care Med* 152:1926-1931
108. Matsumoto M, Funami K, Tanabe M, Oshiumi H, Shingai M, Seto Y, Yamamoto A, Seya T 2003 Subcellular localization of Toll-like receptor 3 in human dendritic cells. *J Immunol* 171:3154-3162

109. Maus UA, Koay MA, Delbeck T, Mack M, Ermert M, Ermert L, Blackwell TS, Christman JW, Schlondorff D, Seeger W, Lohmeyer J 2002 Role of resident alveolar macrophages in leukocyte traffic into the alveolar air space of intact mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 282:L1245-L1252
110. McCray PB, Jr., Bentley L 1997 Human airway epithelia express a beta-defensin. *Am J Respir Cell Mol Biol* 16:343-349
111. Mitchell JA, Paul-Clark MJ, Clarke GW, McMaster SK, Cartwright N 2007 Critical role of toll-like receptors and nucleotide oligomerisation domain in the regulation of health and disease. *J Endocrinol* 193:323-330
112. Morrison G, Kilanowski F, Davidson D, Dorin J 2002 Characterization of the mouse beta defensin 1, Defb1, mutant mouse model. *Infect Immun* 70:3053-3060
113. Mossman BT, Lounsbury KM, Reddy SP 2006 Oxidants and signaling by mitogen-activated protein kinases in lung epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol* 34:666-669
114. Muzio M, Natoli G, Sacconi S, Levrero M, Mantovani A 1998 The human toll signaling pathway: divergence of nuclear factor kappaB and JNK/SAPK activation upstream of tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6). *J Exp Med* 187:2097-2101
115. Nagaoka I, Hirota S, Niyonsaba F, Hirata M, Adachi Y, Tamura H, Heumann D 2001 Cathelicidin family of antibacterial peptides CAP18 and CAP11 inhibit the expression of TNF-alpha by blocking the binding of LPS to CD14(+) cells. *J Immunol* 167:3329-3338
116. Neish AS, Gewirtz AT, Zeng H, Young AN, Hobert ME, Karmali V, Rao AS, Madara JL 2000 Prokaryotic regulation of epithelial responses by inhibition of IkappaB-alpha ubiquitination. *Science* 289:1560-1563
117. Niyonsaba F, Someya A, Hirata M, Ogawa H, Nagaoka I 2001 Evaluation of the effects of peptide antibiotics human beta-defensins-1/-2 and LL-37 on histamine release and prostaglandin D(2) production from mast cells. *Eur J Immunol* 31:1066-1075
118. Niyonsaba F, Ushio H, Nagaoka I, Okumura K, Ogawa H 2005 The human beta-defensins (-1, -2, -3, -4) and cathelicidin LL-37 induce IL-18 secretion through p38 and ERK MAPK activation in primary human keratinocytes. *J Immunol* 175:1776-1784
119. Niyonsaba F, Ushio H, Nakano N, Ng W, Sayama K, Hashimoto K, Nagaoka I, Okumura K, Ogawa H 2007 Antimicrobial peptides human beta-defensins stimulate epidermal keratinocyte migration, proliferation and production of pro-inflammatory cytokines and chemokines. *J Invest Dermatol* 127:594-604

120. Nizet V, Ohtake T, Lauth X, Trowbridge J, Rudisill J, Dorschner RA, Pestonjasp V, Piraino J, Huttner K, Gallo RL 2001 Innate antimicrobial peptide protects the skin from invasive bacterial infection. *Nature* 414:454-457
121. O'Brien AD, Rosenstreich DL, Scher I, Campbell GH, MacDermott RP, Formal SB 1980 Genetic control of susceptibility to *Salmonella typhimurium* in mice: role of the LPS gene. *J Immunol* 124:20-24
122. O'Neil DA, Porter EM, Elewaut D, Anderson GM, Eckmann L, Ganz T, Kagnoff MF 1999 Expression and regulation of the human beta-defensins hBD-1 and hBD-2 in intestinal epithelium. *J Immunol* 163:6718-6724
123. Ong PY, Ohtake T, Brandt C, Strickland I, Boguniewicz M, Ganz T, Gallo RL, Leung DY 2002 Endogenous antimicrobial peptides and skin infections in atopic dermatitis. *N Engl J Med* 347:1151-1160
124. Palaniyar N, Clark H, Nadesalingam J, Hawgood S, Reid KB 2003 Surfactant protein D binds genomic DNA and apoptotic cells, and enhances their clearance, in vivo. *Ann N Y Acad Sci* 1010:471-475
125. Park CB, Kim HS, Kim SC 1998 Mechanism of action of the antimicrobial peptide buforin II: buforin II kills microorganisms by penetrating the cell membrane and inhibiting cellular functions. *Biochem Biophys Res Commun* 244:253-257
126. Platz J, Beisswenger C, Dalpke A, Koczulla R, Pinkenburg O, Vogelmeier C, Bals R 2004 Microbial DNA induces a host defense reaction of human respiratory epithelial cells. *J Immunol* 173:1219-1223
127. Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, Van HC, Du X, Birdwell D, Alejos E, Silva M, Galanos C, Freudenberg M, Ricciardi-Castagnoli P, Layton B, Beutler B 1998 Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in *Tlr4* gene. *Science* 282:2085-2088
128. Poltorak A, Smirnova I, He X, Liu MY, Van HC, McNally O, Birdwell D, Alejos E, Silva M, Du X, Thompson P, Chan EK, Ledesma J, Roe B, Clifton S, Vogel SN, Beutler B 1998 Genetic and physical mapping of the *Lps* locus: identification of the toll-4 receptor as a candidate gene in the critical region. *Blood Cells Mol Dis* 24:340-355
129. Pugin J, Schurer-Maly CC, Leturcq D, Moriarty A, Ulevitch RJ, Tobias PS 1993 Lipopolysaccharide activation of human endothelial and epithelial cells is mediated by lipopolysaccharide-binding protein and soluble CD14. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:2744-2748
130. Quayle AJ, Porter EM, Nussbaum AA, Wang YM, Brabec C, Yip KP, Mok SC 1998 Gene expression, immunolocalization, and secretion of human defensin-5 in human female reproductive tract. *Am J Pathol* 152:1247-1258

131. Rahman I, Li XY, Donaldson K, Harrison DJ, MacNee W 1995 Glutathione homeostasis in alveolar epithelial cells in vitro and lung in vivo under oxidative stress. *Am J Physiol* 269:L285-L292
132. Rennard SI, Basset G, Lecossier D, O'Donnell KM, Pinkston P, Martin PG, Crystal RG 1986 Estimation of volume of epithelial lining fluid recovered by lavage using urea as marker of dilution. *J Appl Physiol* 60:532-538
133. Rivas-Santiago B, Schwander SK, Sarabia C, Diamond G, Klein-Patel ME, Hernandez-Pando R, Ellner JJ, Sada E 2005 Human {beta}-defensin 2 is expressed and associated with Mycobacterium tuberculosis during infection of human alveolar epithelial cells. *Infect Immun* 73:4505-4511
134. Sallusto F, Schaerli P, Loetscher P, Schaniel C, Lenig D, Mackay CR, Qin S, Lanzavecchia A 1998 Rapid and coordinated switch in chemokine receptor expression during dendritic cell maturation. *Eur J Immunol* 28:2760-2769
135. Sanchez Nieto JM, Carillo AA 1995 The role of bronchoalveolar lavage in the diagnosis of bacterial pneumonia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 14:839-850
136. Sawaki K, Mizukawa N, Yamaai T, Yoshimoto T, Nakano M, Sugahara T 2002 High concentration of beta-defensin-2 in oral squamous cell carcinoma. *Anti-cancer Res* 22:2103-2107
137. Schaller-Bals S, Schulze A, Bals R 2002 Increased levels of antimicrobial peptides in tracheal aspirates of newborn infants during infection. *Am J Respir Crit Care Med* 165:992-995
138. Schmidtchen A, Frick IM, Andersson E, Tapper H, Bjorck L 2002 Proteinases of common pathogenic bacteria degrade and inactivate the antibacterial peptide LL-37. *Mol Microbiol* 46:157-168
139. Schumann RR, Leong SR, Flaggs GW, Gray PW, Wright SD, Mathison JC, Tobias PS, Ulevitch RJ 1990 Structure and function of lipopolysaccharide binding protein. *Science* 249:1429-1431
140. Schutte BC, Mitros JP, Bartlett JA, Walters JD, Jia HP, Welsh MJ, Casavant TL, McCray PB, Jr. 2002 Discovery of five conserved beta -defensin gene clusters using a computational search strategy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:2129-2133
141. Sha Q, Truong-Tran AQ, Plitt JR, Beck LA, Schleimer RP 2004 Activation of airway epithelial cells by toll-like receptor agonists. *Am J Respir Cell Mol Biol* 31:358-364
142. Shafer WM, Qu X, Waring AJ, Lehrer RI 1998 Modulation of Neisseria gonorrhoeae susceptibility to vertebrate antibacterial peptides due to a member of the resistance/nodulation/division efflux pump family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:1829-1833

143. Shaykhiev R, Beisswenger C, Kandler K, Senske J, Puchner A, Damm T, Behr J, Bals R 2005 Human endogenous antibiotic LL-37 stimulates airway epithelial cell proliferation and wound closure. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 289:L842-L848
144. Singh PK, Jia HP, Wiles K, Hesselberth J, Liu L, Conway BA, Greenberg EP, Valore EV, Welsh MJ, Ganz T, Tack BF, McCray PB, Jr. 1998 Production of beta-defensins by human airway epithelia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:14961-14966
145. Soong LB, Ganz T, Ellison A, Caughey GH 1997 Purification and characterization of defensins from cystic fibrosis sputum. *Inflamm Res* 46:98-102
146. Sorensen O, Cowland JB, Askaa J, Borregaard N 1997 An ELISA for hCAP-18, the cathelicidin present in human neutrophils and plasma. *J Immunol Methods* 206:53-59
147. Sorensen OE, Follin P, Johnsen AH, Calafat J, Tjabringa GS, Hiemstra PS, Borregaard N 2001 Human cathelicidin, hCAP-18, is processed to the antimicrobial peptide LL-37 by extracellular cleavage with proteinase 3. *Blood* 97:3951-3959
148. Spencer LT, Paone G, Krein PM, Rouhani FN, Rivera-Nieves J, Brantly ML 2004 Role of human neutrophil peptides in lung inflammation associated with alpha1-antitrypsin deficiency. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 286:L514-L520
149. Starner TD, Agerberth B, Gudmundsson GH, McCray PB, Jr. 2005 Expression and activity of beta-defensins and LL-37 in the developing human lung. *J Immunol* 174:1608-1615
150. Steinberg DA, Hurst MA, Fujii CA, Kung AH, Ho JF, Cheng FC, Lounsbury DJ, Fiddes JC 1997 Protegrin-1: a broad-spectrum, rapidly microbicidal peptide with in vivo activity. *Antimicrob Agents Chemother* 41:1738-1742
151. Super M, Ezekowitz RA 1992 The role of mannose-binding proteins in host defense. *Infect Agents Dis* 1:194-199
152. Taggart CC, Greene CM, Smith SG, Levine RL, McCray PB, Jr., O'Neill S, McElvaney NG 2003 Inactivation of human beta-defensins 2 and 3 by elastolytic cathepsins. *J Immunol* 171:931-937
153. Takahashi A, Wada A, Ogushi K, Maeda K, Kawahara T, Mawatari K, Kurazono H, Moss J, Hirayama T, Nakaya Y 2001 Production of beta-defensin-2 by human colonic epithelial cells induced by *Salmonella enteritidis* flagella filament structural protein. *FEBS Lett* 508:484-488
154. Takeda K, Akira S 2004 TLR signaling pathways. *Semin Immunol* 16:3-9
155. Takeda K, Akira S 2005 Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol* 17:1-14

156. Takeda K, Kaisho T, Akira S 2003 Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol* 21:335-376
157. Takeuchi O, Takeda K, Hoshino K, Adachi O, Ogawa T, Akira S 2000 Cellular responses to bacterial cell wall components are mediated through MyD88-dependent signaling cascades. *Int Immunol* 12:113-117
158. Tokumaru S, Sayama K, Shirakata Y, Komatsuzawa H, Ouhara K, Hanakawa Y, Yahata Y, Dai X, Tohyama M, Nagai H, Yang L, Higashiyama S, Yoshimura A, Sugai M, Hashimoto K 2005 Induction of keratinocyte migration via transactivation of the epidermal growth factor receptor by the antimicrobial peptide LL-37. *J Immunol* 175:4662-4668
159. Tomita T, Nagase T, Ohga E, Yamaguchi Y, Yoshizumi M, Ouchi Y 2002 Molecular mechanisms underlying human beta-defensin-2 gene expression in a human airway cell line (LC2/ad). *Respirology* 7:305-310
160. Tossi A, Sandri L, Giangaspero A 2000 Amphipathic, alpha-helical antimicrobial peptides. *Biopolymers* 55:4-30
161. Travis SM, Conway BA, Zabner J, Smith JJ, Anderson NN, Singh PK, Greenberg EP, Welsh MJ 1999 Activity of abundant antimicrobials of the human airway. *Am J Respir Cell Mol Biol* 20:872-879
162. Tsai WC, Strieter RM, Mehrad B, Newstead MW, Zeng X, Standiford TJ 2000 CXC chemokine receptor CXCR2 is essential for protective innate host response in murine *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *Infect Immun* 68:4289-4296
163. Tsutsumi-Ishii Y, Nagaoka I 2003 Modulation of human beta-defensin-2 transcription in pulmonary epithelial cells by lipopolysaccharide-stimulated mononuclear phagocytes via proinflammatory cytokine production. *J Immunol* 170:4226-4236
164. Tsutsumi-Ishii Y, Nagaoka I 2002 NF-kappa B-mediated transcriptional regulation of human beta-defensin-2 gene following lipopolysaccharide stimulation. *J Leukoc Biol* 71:154-162
165. Tudor RM, Yoshida T, Fijalkowka I, Biswal S, Petrache I 2006 Role of lung maintenance program in the heterogeneity of lung destruction in emphysema. *Proc Am Thorac Soc* 3:673-679
166. Underhill DM, Ozinsky A, Hajjar AM, Stevens A, Wilson CB, Bassetti M, Adorem A 1999 The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens. *Nature* 401:811-815
167. Valore EV, Park CH, Quayle AJ, Wiles KR, McCray PB, Jr., Ganz T 1998 Human beta-defensin-1: an antimicrobial peptide of urogenital tissues. *J Clin Invest* 101:1633-1642

168. van Gessel S, Folkerts G, van Wetering S, Hiemstra P, Nijkamp F 2008 Neutrophil defensins induce hyperresponsiveness of guinea pig airways. *Clinical and Experimental Allergy*
169. van Overveld F, Hiemstra P, De Backer W, Vermeire P 1995 Human mast cells can be activated by defensins. *Eur Respir J* 534
170. Van WS, Mannesse-Lazeroms SP, Dijkman JH, Hiemstra PS 1997 Effect of neutrophil serine proteinases and defensins on lung epithelial cells: modulation of cytotoxicity and IL-8 production. *J Leukoc Biol* 62:217-226
171. Van WS, Sterk PJ, Rabe KF, Hiemstra PS 1999 Defensins: key players or bystanders in infection, injury, and repair in the lung? *J Allergy Clin Immunol* 104:1131-1138
172. Van WS, van der Linden AC, van Sterkenburg MA, de Boer WI, Kuijpers AL, Schalkwijk J, Hiemstra PS 2000 Regulation of SLPI and elafin release from bronchial epithelial cells by neutrophil defensins. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 278:L51-L58
173. Ventura CL, Higdon R, Kolker E, Skerrett SJ, Rubens CE 2008 Host airway proteins interact with *Staphylococcus aureus* during early pneumonia. *Infect Immun* 76:888-898
174. von HJ, Koczulla R, Shaykhiev R, Herr C, Pinkenburg O, Reimer D, Wiewrodt R, Biesterfeld S, Aigner A, Czubyko F, Bals R 2008 The host defence peptide LL-37/hCAP-18 is a growth factor for lung cancer cells. *Lung Cancer* 59:12-23
175. Wang X, Zhang Z, Louboutin JP, Moser C, Weiner DJ, Wilson JM 2003 Airway epithelia regulate expression of human beta-defensin 2 through Toll-like receptor 2. *FASEB J* 17:1727-1729
176. Waterer GW, Quasney MW, Cantor RM, Wunderink RG 2001 Septic shock and respiratory failure in community-acquired pneumonia have different TNF polymorphism associations. *Am J Respir Crit Care Med* 163:1599-1604
177. Wattiez R, Hermans C, Cruyt C, Bernard A, Falmagne P 2000 Human bronchoalveolar lavage fluid protein two-dimensional database: study of interstitial lung diseases. *Electrophoresis* 21:2703-2712
178. Weiner DJ, Bucki R, Janmey PA 2003 The antimicrobial activity of the cathelicidin LL37 is inhibited by F-actin bundles and restored by gelsolin. *Am J Respir Cell Mol Biol* 28:738-745
179. Welte T, Marre R, Suttorp N 2003 [CAPNet--network of competence for community acquired pneumonia: structures and aims]. *Pneumologie* 57:34-41
180. Welte T, Marre R, Suttorp N 2004 [Competence network "community acquired pneumonia" (CAPNETZ). A first interim report]. *Internist (Berl)* 45:393-401



181. Wesche H, Henzel WJ, Shillinglaw W, Li S, Cao Z 1997 MyD88: an adapter that recruits IRAK to the IL-1 receptor complex. *Immunity* 7:837-847
182. Wilson CL, Ouellette AJ, Satchell DP, Ayabe T, Lopez-Boado YS, Stratman JL, Hultgren SJ, Matrisian LM, Parks WC 1999 Regulation of intestinal alpha-defensin activation by the metalloproteinase matrilysin in innate host defense. *Science* 286:113-117
183. Wu M, Maier E, Benz R, Hancock RE 1999 Mechanism of interaction of different classes of cationic antimicrobial peptides with planar bilayers and with the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. *Biochemistry* 38:7235-7242
184. Xiong YQ, Bayer AS, Yeaman MR 2002 Inhibition of intracellular macromolecular synthesis in *Staphylococcus aureus* by thrombin-induced platelet microbicidal proteins. *J Infect Dis* 185:348-356
185. Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Hoshino K, Kaisho T, Sanjo H, Takeuchi O, Sugiyama M, Okabe M, Takeda K, Akira S 2003 Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science* 301:640-643
186. Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Sanjo H, Uematsu S, Kaisho T, Hoshino K, Takeuchi O, Kobayashi M, Fujita T, Takeda K, Akira S 2002 Essential role for TIRAP in activation of the signalling cascade shared by TLR2 and TLR4. *Nature* 420:324-329
187. Yanagi S, Ashitani J, Imai K, Kyoraku Y, Sano A, Matsumoto N, Nakazato M 2007 Significance of human beta-defensins in the epithelial lining fluid of patients with chronic lower respiratory tract infections. *Clin Microbiol Infect* 13:63-69
188. Yanagi S, Ashitani J, Imai K, Kyoraku Y, Sano A, Matsumoto N, Nakazato M 2007 Significance of human beta-defensins in the epithelial lining fluid of patients with chronic lower respiratory tract infections. *Clin Microbiol Infect* 13:63-69
189. Yanagi S, Ashitani J, Imai K, Kyoraku Y, Sano A, Matsumoto N, Nakazato M 2007 Significance of human beta-defensins in the epithelial lining fluid of patients with chronic lower respiratory tract infections. *Clin Microbiol Infect* 13:63-69
190. Yang D, Chen Q, Chertov O, Oppenheim JJ 2000 Human neutrophil defensins selectively chemoattract naive T and immature dendritic cells. *J Leukoc Biol* 68:9-14
191. Yang D, Chertov O, Bykovskaia SN, Chen Q, Buffo MJ, Shogan J, Anderson M, Schroder JM, Wang JM, Howard OM, Oppenheim JJ 1999 Beta-defensins: linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6. *Science* 286:525-528

- 
192. Zaiou M, Nizet V, Gallo RL 2003 Antimicrobial and protease inhibitory functions of the human cathelicidin (hCAP18/LL-37) prosequence. *J Invest Dermatol* 120:810-816
  193. Zanetti M, Gennaro R, Romeo D 1995 Cathelicidins: a novel protein family with a common proregion and a variable C-terminal antimicrobial domain. *FEBS Lett* 374:1-5
  194. Zasloff M 2002 Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* 415:389-395
  195. Zedtwitz-Liebenstein K, Schenk P, Apfalter P, Fuhrmann V, Stoiser B, Granger W, Schuster E, Frass M, Burgmann H 2005 Ventilator-associated pneumonia: Increased bacterial counts in bronchoalveolar lavage by using urea as an endogenous marker of dilution. *Crit Care Med* 33:756-759
  196. Zhang P, Summer WR, Bagby GJ, Nelson S 2000 Innate immunity and pulmonary host defense. *Immunol Rev* 173:39-51
  197. Zielenski J, Corey M, Rozmahel R, Markiewicz D, Aznarez I, Casals T, Larriba S, Mercier B, Cutting GR, Krebsova A, Macek M, Jr., Langfelder-Schwind E, Marshall BC, Celie-Germana J, Claustres M, Palacio A, Bal J, Nowakowska A, Ferec C, Estivill X, Durie P, Tsui LC 1999 Detection of a cystic fibrosis modifier locus for meconium ileus on human chromosome 19q13. *Nat Genet* 22:128-129
  198. Zuyderduyn S, Ninaber DK, Hiemstra PS, Rabe KF 2006 The antimicrobial peptide LL-37 enhances IL-8 release by human airway smooth muscle cells. *J Allergy Clin Immunol* 117:1328-1335

## Messwerte

Tabelle 5: gemessene AMP-Konzentrationen

Lieferung am	Material	Eingang	Einsender	LL-37 (ng/ml)	HBD2 (ng/ml)
21.03.2005	BAL	10.09.2004	Berlin	429,242	14,118
21.03.2005	BAL	28.10.2004	Berlin	498,058	0,556
21.03.2005	BAL	02.10.2004	Magdeburg	441,324	0,854
21.03.2005	BAL	02.10.2004	Magdeburg	7107,320	0,000
21.03.2005	BAL	04.10.2004	Magdeburg	1425,400	1,758
21.03.2005	BAL	08.11.2004	Magdeburg	5256,160	0,000
Nov. 06	BAL	18.09.2004	Würzburg	1510,468	0,662
Nov. 06	BAL	29.09.2004	Würzburg	1892,862	28,030
Nov. 06	BAL		Magdeburg	415,52	0,000
Nov. 06	BAL		Rotenburg	4283,46	12,72
Nov. 06	BAL		Magdeburg	644,44	0,000

21.03.2005	others	25.11.2004	Ulm	1931,840	2,794
21.03.2005	others	26.11.2004	Ulm	1419,604	0,000
21.03.2005	others	07.12.2004	Ulm	453,576	1,456
21.03.2005	others	11.01.2005	Ulm	1883,584	12,026
21.03.2005	others	13.09.2004	Magdeburg	644,440	0,000
21.03.2005	others	10.11.2004	Magdeburg	982,562	0,000
21.03.2005	others	06.01.2005	Rotenburg	14283,460	12,070

Nov. 06	Sputum	19.09.06	Leipzig	42,0	23,93
Nov. 06	Sputum	21.09.06	Leipzig	0,000	249,6
Nov. 06	Sputum	05.10.06	Leipzig	49,7	32,60
Nov. 06	Sputum	05.10.06	Leipzig	36,4	5,95
Nov. 06	Sputum	05.10.06	Leipzig	0,000	15,15
Nov. 06	Sputum	22.09.2004	Würzburg	8471,660	20,818
Nov. 06	Sputum	03.06.2004	Berlin	4093,840	31,608
Nov. 06	Sputum	16.06.2004	Berlin	982,562	7,158
Nov. 06	Sputum	14.07.2004	Berlin	193,714	0,000
Nov. 06	Sputum	29.07.2004	Berlin	455,160	1,632
Nov. 06	Sputum	30.11.2004	Ulm	1696,458	3,794
Nov. 06	Sputum	01.12.2004	Ulm	874,022	1,400
Nov. 06	Sputum	01.12.2004	Ulm	360,038	0,000
Nov. 06	Sputum	29.09.06	Hannover	0,000	0,000
Nov. 06	Sputum	29.09.06	Hannover	0,000	4,73
Nov. 06	Sputum	07.12.2004	Ulm	8646,020	0,716
Nov. 06	Sputum	29.09.06	Hannover	0,000	8,34
Nov. 06	Sputum	07.12.2004	Ulm	105,308	0,000
Nov. 06	Sputum	07.12.2004	Ulm	669,462	1,400
Nov. 06	Sputum	08.12.2004	Ulm	1670,880	2,844
Nov. 06	Sputum	10.12.2004	Ulm	158,198	0,930
Nov. 06	Sputum	26.08.2004	Berlin	239,282	2,336
Nov. 06	Sputum	25.08.2004	Berlin	5457,760	2,654
Nov. 06	Sputum	13.12.2004	Ulm	928,186	10,090

Nov. 06	Sputum	13.12.2004	Ulm	433,634	0,000
Nov. 06	Sputum	14.12.2004	Ulm	476,218	14,816
Nov. 06	Sputum	16.12.2004	Ulm	1066,332	0,000
Nov. 06	Sputum	22.09.06	Charite	62,0	4,04
Nov. 06	Sputum	17.12.2004	Ulm	637,496	2,712
Dez. 06	Sputum	17.12.2004	Ulm	5341,420	0,064
Dez. 06	Sputum	20.12.2004	Ulm	1312,424	0,476
Dez. 06	Sputum	26.09.06	Charite	56,8	17,74
Dez. 06	Sputum	20.12.2004	Ulm	264,470	0,000
Dez. 06	Sputum	20.12.2004	Ulm	21,136	0,000
Dez. 06	Sputum	20.12.2004	Ulm	1117,252	0,100
Dez. 06	Sputum	27.09.06	Charite	0,000	41,06
Dez. 06	Sputum	21.12.2004	Ulm	192,134	0,000
Dez. 06	Sputum	23.12.2004	Ulm	485,352	0,314
Dez. 06	Sputum	02.10.2004	Berlin	2544,280	2,546
Dez. 06	Sputum	29.12.2004	Ulm	356,370	0,000
Dez. 06	Sputum	29.12.2004	Ulm	216,050	0,000
Dez. 06	Sputum	03.01.2005	Ulm	416,462	0,000
Dez. 06	Sputum	07.01.2005	Ulm	7098,040	0,000
Dez. 06	Sputum	11.01.2005	Ulm	1639,768	12,748
Dez. 06	Sputum	12.01.2005	Ulm	3323,460	14,562
Dez. 06	Sputum	20.10.2004	Berlin	4710,260	22,456
Dez. 06	Sputum	14.01.2005	Ulm	4876,440	1,118
Dez. 06	Sputum	14.01.2005	Ulm	1532,582	0,614
Dez. 06	Sputum	17.01.2005	Ulm	534,390	1,766
Dez. 06	Sputum	18.01.2005	Ulm	572,546	1,484
Dez. 06	Sputum	24.01.2005	Ulm	289,182	0,000
Dez. 06	Sputum	25.01.2005	Ulm	1339,738	8,158
Dez. 06	Sputum	25.01.2005	Ulm	254,930	0,000
Dez. 06	Sputum	26.01.2005	Ulm	294,138	0,006
Dez. 06	Sputum	27.01.2005	Ulm	2623,020	2,596
Dez. 06	Sputum	28.01.2005	Ulm	468,182	0,000
Dez. 06	Sputum	27.09.2004	Rotenburg	371,844	0,000
Dez. 06	Sputum	10.02.2005	Ulm	205,518	0,000
Dez. 06	Sputum	10.02.2005	Ulm	984,160	0,000
Jan. 07	Sputum	11.02.2005	Ulm	442,162	4,460
Jan. 07	Sputum	01.10.2004	Rotenburg	7032,880	0,000
Jan. 07	Sputum	14.02.2005	Ulm	907,594	0,384
Jan. 07	Sputum	01.10.2004	Magdeburg	1624,036	6,148
Jan. 07	Sputum	01.10.2004	Rotenburg	8736,420	7,800
Jan. 07	Sputum	04.10.2004	Rotenburg	462,912	15,638
Jan. 07	Sputum	15.02.2005	Ulm	442,998	0,000
Jan. 07	Sputum	01.10.2004	Rotenburg	431,010	
Jan. 07	Sputum	18.02.2005	Ulm	482,582	0,000
Jan. 07	Sputum	22.10.2004	Magdeburg	2869,260	0,662
Jan. 07	Sputum	29.10.2004	Magdeburg	685,040	0,000
Jan. 07	Sputum	21.02.2005	Ulm	422,030	27,686
Jan. 07	Sputum	22.02.2005	Ulm	132,600	1,996
Jan. 07	Sputum	23.02.2005	Ulm	492,130	0,000
Jan. 07	Sputum	23.02.2005	Ulm	235,260	0,000
Jan. 07	Sputum	11.11.2004	Magdeburg	2623,020	0,486

Jan. 07	Sputum	12.10.2004	Rotenburg	5552,180	16,554
Jan. 07	Sputum	03.11.2004	Rotenburg	1992,290	7,498
Jan. 07	Sputum	03.11.2004	Rotenburg	9019,960	11,960
Jan. 07	Sputum	05.11.2004	Rotenburg	302,156	5,758
Jan. 07	Sputum	22.11.2004	Rotenburg	717,566	0,496
Jan. 07	Sputum	29.11.2004	Rotenburg	1739,236	0,000
Jan. 07	Sputum	01.12.2004	Rotenburg	1759,068	8,502
Jan. 07	Sputum	02.12.2004	Rotenburg	386,306	0,046
Jan. 07	Sputum	02.12.2004	Rotenburg	402,898	12,950
Jan. 07	Sputum	03.12.2004	Rotenburg	462,150	0,422
Jan. 07	Sputum	13.12.2004	Rotenburg	949,990	0,000
Jan. 07	Sputum	15.12.2004	Rotenburg	914,508	9,614
Jan. 07	Sputum	28.12.2004	Rotenburg	802,988	14,070
Feb. 07	Sputum	04.01.2005	Rotenburg	7245,760	2,044
Feb. 07	Sputum	07.01.2005	Rotenburg	855,850	8,504
Feb. 07	Sputum	14.01.2005	Rotenburg	11192,720	15,896
Feb. 07	Sputum	17.01.2005	Rotenburg	1434,064	3,908
Feb. 07	Sputum	26.09.06	Bochum	112,9	0,41
Feb. 07	Sputum	09.10.06	Bochum	0,000	0,000
Feb. 07	Sputum	13.11.2004	Lübeck	601,976	4,194
Feb. 07	Sputum	09.10.06	Bochum	0,000	4,55
Feb. 07	Sputum	19.09.06	Rotenburg	64,5	7,10
Feb. 07	Sputum	26.09.06	Rotenburg	0,000	26,21
Feb. 07	Sputum	12.10.06	Rotenburg	0,000	0,46
Feb. 07	Sputum	19.09.06	Lübeck	35,4	10,59
Feb. 07	Sputum	26.09.06	Lübeck	0,000	>250
Feb. 07	Sputum	05.10.06	Lübeck	203,3	3,31
Feb. 07	Sputum	27.09.06	Berlin	28,1	45,17
Feb. 07	Sputum	21.09.06	Berlin	29,3	0,30

Tab. 6: Einzel- und Mittelwerte der AMP-Konzentration im Sputum von gesunden Menschen

	<b>Sputum 1</b>	<b>Sputum 2</b>	<b>Sputum 3</b>	<b>Sputum 4</b>	<b>Sputum 5</b>	<b>Mittelwert</b>
LL-37	84,723	84,7473	84,564	104,05	85,674	88,752
hBD2	0,198	0,338	1,156	0,312	0,000	0,401

Tab. 7: Die AMP-Konzentration (in ng/ml) in den BAL von gesunden Patienten (AMP-Konzentrationen in BAL von CAP-Patienten siehe Tab. 4.3)

Patient	hBD2 (ng/ml)	LL-37 (ng/ml)
1	0,000	0,000
2	1,43	0,000
3	0,000	0,000
4	0,974	0,000
5	0,61	0,09
6	0,000	0,000
7	0,000	0,000
8	0,864	0,000
9	2,13	0,000
Mittelwert	0,667	0,01

Tab. 8: Keimspektrum bei CAP-Patienten

Cap-Nr.	LL37 (ng/ml)	HBD2 (ng/ml)	nachgewiesene Erreger in BAL	nachgewiesene Erreger in Sputum
395	429,242	14,118	Legionella pneumophila	Andere
434	498,058	0,556	Haemophilus influenzae	
484	5256,160	0,000	Escherichia coli	
362	1931,840	2,794		Serratia spp
367	1419,604	0,000		Staphylococcus aureus
322	4093,840	31,608		Streptococcus pneumoniae
399	264,470	0,000		Enterococcus spp
425	4710,260	22,456		Andere
439	1339,738	8,158		Staphylococcus aureus
442	294,138	0,006		Pseudomonas aeruginosa
456	205,518	0,000		Pseudomonas spp
477	422,030	27,686		Staphylococcus aureus
480	132,600	1,996		Citrobacter spp
515	5552,180	16,554		Andere
539	1992,290	7,498		Proteus vulgaris
541	302,156	5,758		Haemophilus parainfluenzae
563	1739,236	0,000		Streptococcus pneumoniae
565	1759,068	8,502		Haemophilus parainfluenzae
585	914,508	9,614		Moraxella catarrhalis
628	11192,720	15,896		Klebsiella pneumoniae
630	1434,064	3,908		Haemophilus parainfluenzae
709	601,976	4,194		Klebsiella pneumoniae
1213	<Min	26,21		Andere
1215	<Min	0,46		Haemophilus parainfluenzae
1398	29,3	0,30		Haemophilus influenzae

## Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren Damen/Herren in Marburg:

Albert, Alfke, Arnold, Aumüller, Aziz, Bach, Bals, Barth, Bartsch, Basler, Bauer, Baum, Becker, Behe, Behr, Berger, Berndt, Bernhardt, Bertalanffy, Besedovsky, Beyer, Bien, Brilla, Cetin, Christiansen, Czubayko, Daut, Diedrich, Dittrich, Dodel, Dominguez, Donner-Banzhoff, Duda, Eilers, Engenhardt-Cabillic, Effendy, Eisele, Elsässer, Eschenbach, Fehmann, Feuser, Friederich, Fuchs, Fuchs-Winkelmann, Fuhrmann, Garten, Gemsa, Gerdes, Geus, Golenhofen, Göke, Görg, Gotthardt, Gotzen, Graul, Greger, Gress, Grimm, Griss, Grunder, Grezeschik, Groß, Gudermann, Hackenberg, Hadji, Hagedewig, Happle, Hasilik, Hebebrand, Heeg, Heidenreich, Hellinger, Hellwig, Hertl, Hess, Hesse, Herzum, Hilgermann, Höffken, Hofmann, Hofstaetter, Höltermann, Hörle, Hörsch, Hoyer, Huffmann, Joseph, Jacob, Jungclas, Kaffarnik, Kälble, Kalinowski, Kann, Kern, Klaus, Kleine, Klenk, Klingmüller, Klose, Koch, Köhler, König, Koolman, Krause, Kretschmer, Krieg, Kroh, Knoll, Kroll, Kuhlman, Kuhn, Kühnert, Lammel, Lang, Lange, Lehmann, Lennartz, Lill, Lippert, Liss, Loff, Löffler, Lohoff, Lorenz, Ludwig, Lürs, Maier, Maisch, Mann, Mandic, Mennel, Mittag, Moll, Moosdorf, Müller, Mutters, Netter, Neubauer, Neurath, Noll, Nüsing, Oertel, Pagenstecher, Pieper, Pfeiffer, Pohlen, Prinz, Quante, Radsak, Remschmidt, Renz, Richter, Roeper, Röhm, Rose, Rosenow, Rothmund, Rupp, Sahmland, Schäfer H, Schäfer J, Schäfer M, Schmid, Schmidt, Schmitt, Schmitz-Moormann, Schnabel, Schneider, Schrader, Schreiber, Schuermann, Schüffel, Schultz, Schumacher, Schwarz, Seifart, Seitz, Sekundo, Sesterhenn, Seyberth, Sommer, Sprinzl, Steiniger, Stiletto, Stinner, Strassmann, Stempel, Sturm, Sure, Suske, Tebbe, Teymoortash, Thomas, Vedder, Vogelmeier, Vohland, Voigt, Wagner H-J, Wagner U, Walthers, Weber, Weihe, Wennemuth, Werner, Wesemann, Westermann, Wiegandt, Wilke, Wirth, Wolf, Wulf, Wündisch, Zielke.

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich den Personen danken, die wesentlich zum Erfolg und zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Ich danke:

- Herrn Prof. Dr. med Dr. rer. nat. Robert Bals für die Bereitstellung des Themas, die kontinuierliche Betreuung und die damit verbundene ständige Bereitschaft, wissenschaftliche Probleme in einem persönlichen Gespräch zu beseitigen.
- Herrn Christian Herr und Herrn Dr. Christoph Beisswenger für die von Anfang an persönliche alltägliche Betreuung während der Laborarbeit, durch welche technische und wissenschaftliche Probleme schnell überwunden werden konnten.
- Herrn Thomas Damm und Frau Kathrin Rüttger, durch deren Arbeit in der Organisation des Labors der Ablauf der Versuche sichergestellt wurde.
- allen bisher genannten und weiteren Mitgliedern der AG Bals, vor allem den Damen Annette Püchner, Kerstin Kändler und Judith von Haussen und den Herren Christian Hess und Renat Shaykhiev für die hervorragende Aufnahme in die Arbeitsgruppe, wodurch das Lernen und das Arbeiten deutlich erleichtert wurden.
- Frau Dr. Maike Schnoor und Herrn Prof. Dr. med Dr. phil Heiner Raspe, für die Hilfe bei der statistischen Auswertung der Messwerte und der Korrelationsanalyse.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern Dr. Dorothee und Dr. Wilhelm Baur, die mir durch ihre finanzielle Unterstützung dieses Studium und diese Arbeit erst ermöglicht haben. Vor allem für das in mich gesetzte Vertrauen, dass dafür gesorgt hat, dass auch in schwierigen Zeiten das Gefühl der Ruhe und des letztendlichen Erfolges nie verloren ging, bin ich äußerst dankbar.

Zuletzt möchte ich meiner Freundin Vera Svoboda danken. Du warst für mich Kritiker und Motivator in einem. Mit Dir als Vorbild und Ansporn konnte diese Arbeit ihren Abschluss finden.





