

Aus dem Institut für Klinische Chemie der Medizinischen Fakultät  
der Universität zu Köln

Direktor: Prof. Dr. Thomas Streichert

# **Das Verhältnis zwischen der Serumkonzentration von LL-37 und der Leukozytenzahl korreliert mit der Schwere von COVID-19**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde  
der Medizinischen Fakultät  
der Universität zu Köln

vorgelegt von  
Matthias Keutmann  
aus Dormagen

promoviert am 11.12.2025



Dekan: Universitätsprofessor Dr. med. G. R. Fink  
1. Gutachter: Professor Dr. med. T. Streichert  
2. Gutachter: Professor Dr. med. J. Müller-Ehmsen

## Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes habe ich Unterstützungsleistungen von folgenden Personen erhalten:

Herr Prof. Dr. Klatt, Herr Prof. Dr. Thomas Streichert, Frau Gabriele Hermes

Weitere Personen waren an der Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe einer Promotionsberaterin/eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertationsschrift stehen.

Die Dissertationsschrift wurde von mir bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Alle Patienten wurden bei stationärer Aufnahme in die Uniklinik Köln auf SARS-CoV-2 getestet. Herr Jannik Stemler und Univ.-Prof. Dr. Oliver Cornely informierten mich, sobald ein COVID-19 positiver Patient neu aufgenommen wurde. Das Serum dieser Patienten wurde eigenständig von mir herausgesucht, aliquotiert und anschließend die Laborbefunde gesichert. Im Falle fehlender Laborparameter erfolgte die Bestimmung unter meiner Koordination durch die zuständigen Mitarbeiter im Zentrallabor der Uniklinik Köln. Den in dieser Arbeit durchgeführten ELISA zur Bestimmung der LL-37-Serumkonzentration habe ich nach entsprechender Einarbeitung durch die medizinisch-technische Assistentin Gabriele Hermes eigenständig durchgeführt. Das Einverständnis zur Verwendung der Proben wurde nach telefonischer Aufklärung der Patienten oder ihrer bevollmächtigten Angehörigen von mir eingeholt. Darüber hinaus habe ich den Schweregrad von COVID-19 anhand von Rechercharbeit in der Patientendatenbank Orbis beurteilt. Die statistische Auswertung mit SPSS, sowie die Erstellung von Tabellen und Abbildungen habe ich selbstständig durchgeführt. Anschließend erfolgte die Interpretation der Ergebnisse sowie die Erstellung des Manuskripts gemeinsam mit Herrn Prof. Dr. Streichert und Herrn Prof. Dr. Klatt.

Erklärung zur guten wissenschaftlichen Praxis:

Ich erkläre hiermit, dass ich die Ordnung zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis und zum Umgang mit wissenschaftlichem Fehlverhalten (Amtliche Mitteilung der Universität zu Köln AM 132/2020) der Universität zu Köln gelesen habe und verpflichte mich hiermit, die dort genannten Vorgaben bei allen wissenschaftlichen Tätigkeiten zu beachten und umzusetzen.

Köln, den

Unterschrift: .....

## Danksagung

An erster Stelle danke ich Herrn Prof. Dr. Thomas Streichert für die Möglichkeit, diese Arbeit an seinem Institut durchzuführen, sowie für seine wertvolle wissenschaftliche Begleitung, kritischen Anmerkungen und konstruktive Unterstützung.

Mein besonderer Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. Andreas Klatt für die engagierte Betreuung, seine Geduld, seine stetige Hilfsbereitschaft und den fachlichen Austausch, der diese Arbeit wesentlich geprägt hat.

Für die Bereitstellung der Proben und Patientendaten danke ich der Arbeitsgruppe Klinische Antiinfektiva unter der Leitung von Herrn Univ.-Prof. Dr. Oliver Cornely sowie Herrn Dr. Jannik Stemler.

Mein Dank gilt außerdem der Arbeitsgruppe Klinische Chemie der Uniklinik Köln. Insbesondere danke ich Frau Gabriele Hermes für die geduldige Einarbeitung und Unterstützung bei der Durchführung der Labormethoden.

Mein tief empfundener Dank gilt schließlich meiner Familie und meinen Freunden – für ihren Rückhalt, ihre Geduld und ihre Ermutigung während der gesamten Promotionszeit.

Meiner Familie,  
deren Rückhalt und Vertrauen mich während dieser Zeit begleitet und getragen haben.

# Inhaltsverzeichnis

<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>8</b>
<b>1. ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>10</b>
<b>2. EINLEITUNG</b>	<b>11</b>
2.1. COVID-19	11
2.1.1. Überblick	11
2.1.2. Epidemiologie	11
2.1.3. Erreger und Übertragung	12
2.1.4. Pathophysiologie	13
2.1.5. Symptome	14
2.1.6. Diagnostik	15
2.1.7. Therapie	15
2.1.8. Prävention	17
2.2. Laborparameter	17
2.2.1. LL-37	17
2.2.2. Vitamin D	19
2.2.3. Entzündungsmarker IL-6, CRP, PCT	19
2.2.4. LDH	20
2.2.5. Leukozyten	21
2.2.6. Kreatinin	21
2.2.7. Leberfunktion	21
2.2.8. Apolipoproteine	22
2.2.9. Immunglobuline	22
2.3. Ziele meiner Dissertation	23
<b>3. PUBLIKATION</b>	<b>24</b>
<b>4. DISKUSSION</b>	<b>36</b>
4.1.1. Ziel 1: Untersuchung des Zusammenhangs zwischen der LL-37-Serumkonzentration und dem Schweregrad von COVID-19	36
4.1.2. LL-37/Leukozyten-Quotient	38
4.1.3. LL-37 als Therapeutikum	39
4.2. Ziel 2: Untersuchung eines möglichen Zusammenhangs zwischen der Vitamin-D-Konzentration, der LL-37-Serumkonzentration und dem Schweregrad von COVID-19	39

<b>4.3. Ziel 3: Identifizierung neuer Biomarker zur frühzeitigen Einschätzung des Verlaufs von COVID-19</b>	<b>41</b>
4.3.1. Alter und Geschlecht	41
4.3.2. Entzündungsmarker	41
4.3.3. Leukozyten	43
4.3.4. Leber- und Nierenschädigung	44
4.3.5. Immunglobuline	45
<b>4.4 Limitationen</b>	<b>46</b>
<b>4.5 Ausblick</b>	<b>46</b>
<b>5 LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>48</b>

## Abkürzungsverzeichnis

ACE2	Angiotensin konvertierendes Enzym 2
ALAT	Alanin-Aminotransferase
AP-1	Aktivator-Protein-1
APOA1	Apolipoprotein A1
APOB	Apolipoprotein B
APOE4	Apolipoprotein E4
ASAT	Aspartat-Aminotransferase
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
CAMP	Cyclic adenosine monophosphate
COVID-19	Coronavirus disease 2019
CRP	C-Reaktives-Protein
CT	Computertomographie
Ct-Wert	Cycle-threshold-Wert
DAAs	Direct-Acting Antivirals
DEGAM	Deutsche Gesellschaft für Allgemeinmedizin und Familienmedizin
E-Protein	Envelope-Protein
ECMO	Extracorporeal membrane oxygenation
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HTAs	Host-Targeting Antivirals
ICU	Intensive Care Unit
Ig	Immunglobulin
IL-1 $\beta$	Interleukin-1 $\beta$
IL-6	Interleukin-6
IMPACT	International Medical Products Anti-Counterfeiting Taskforce
M-Protein	Matrix-Protein
NETs	Neutrophilenfallen
NF- $\kappa$ B	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells
N-Protein	Nukleokapsidprotein
PCR	Polymerase Chain Reaction
PCT	Procalcitonin
RBD	Rezeptorbindungsdomäne
RNS	Ribonukleinsäure

RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerase Chain Reaction
S-Protein	Spike-Protein
SARS-CoV-2	Severe acute respiratory syndrome coronavirus type 2
SpO <sub>2</sub>	Partielle Sauerstoffsättigung
S1	Subunit 1
S2	Subunit 2
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor-alpha
WHO	World Health Organization
$\gamma$ GT	Gamma-Glutamyltransferase

## 1. Zusammenfassung

Die rasante Ausbreitung des neuartigen SARS-CoV-2-Virus im Jahr 2019 führte zur weltweiten COVID-19-Pandemie und stellte die gesamte Weltbevölkerung vor Herausforderungen. Bis Anfang 2023 infizierten sich weltweit mehr als 670 Millionen Menschen mit COVID-19 und mehr als 6,8 Millionen Menschen starben an den Folgen des Virus. Eine Infektion führte in Deutschland bei 10% der Infizierten zu schweren Verläufen mit notwendiger Hospitalisierung. Es wird intensiv an Therapien und Impfstoffen gegen SARS-CoV-2 geforscht. Verschiedene Studien diskutierten einen Zusammenhang zwischen der Schwere des Verlaufs von COVID-19 und der Vitamin-D-Konzentration. Es wurde vermutet, dass Vitamin D durch die Stimulierung des antimikrobiellen Peptids LL-37 den Verlauf von COVID-19 positiv beeinflussen kann. Aus diesem Grund habe ich in dieser Studie einen möglichen Zusammenhang zwischen der Serumkonzentration von LL-37, Vitamin D und dem Schweregrad von COVID-19 untersucht. Dazu sammelte ich Serumproben von 78 COVID-19-Patienten, teilte die Patienten nach Schweregrad in 5 Gruppen ein und bestimmte die Serumkonzentration von LL-37 und Vitamin D. Überraschenderweise konnte ich keine Zusammenhänge zwischen den Serumkonzentrationen von LL-37 und Vitamin D und dem Schweregrad von COVID-19 nachweisen. LL-37 wird von Granulozyten gebildet und am Ort der Entzündung freigesetzt. Daher erscheint die Analyse von LL-37 in der bronchoalveolären Lavage relevanter bzw. aussagekräftiger als die Untersuchung im Patientenserum. Dennoch konnte ich einen hochsignifikanten, umgekehrt proportionalen Zusammenhang zwischen dem Verhältnis der LL-37-Serumkonzentration und der Leukozytenzahl (LL-37/Leukozytenzahl) und dem Schweregrad von COVID-19 nachweisen. Meine Ergebnisse lassen vermuten, dass das Verhältnis LL-37/Leukozytenzahl einen schweren Verlauf von COVID-19 frühzeitig prognostiziert. Bei den Patienten wurden weitere relevante Laborparameter bestimmt. Ich konnte eine Korrelation zwischen CRP, IL-6, PCT, Leukozytenzahl und LDH und dem Schweregrad von COVID-19 nachweisen.

## **2. Einleitung**

### **2.1. COVID-19**

#### **2.1.1. Überblick**

Die weltweite Ausbreitung des schweren akuten respiratorischen Coronavirus-2-Syndroms (SARS-CoV-2) im Jahr 2019 hat zu einer beispiellosen globalen Gesundheitskrise geführt. Die daraus resultierende Krankheit COVID-19 führte zu einer Überlastung der Gesundheitssysteme und hatte erhebliche sozioökonomische Auswirkungen. Am 11. März 2020 wurde die Krankheit von der Weltgesundheitsorganisation (WHO) als Pandemie eingestuft. Regierungen und Organisationen auf der ganzen Welt haben versucht, die Ausbreitung des Virus zu verlangsamen und die öffentliche Gesundheit durch eine Reihe von Maßnahmen zu schützen, die von Kontaktbeschränkungen über Impfkampagnen bis hin zu einer Maskenpflicht reichten. Trotz dieser Maßnahmen bleibt COVID-19 eine Bedrohung für die öffentliche Gesundheit und erfordert weitere Forschung, um Diagnostik und Therapie weiter zu optimieren. Diese Arbeit soll einen Beitrag zur Erforschung von COVID-19 leisten, indem sie potentielle Biomarker für den Krankheitsverlauf untersucht.

#### **2.1.2. Epidemiologie**

Die Ausbreitung von SARS-CoV-2 begann mit einem Ausbruch des Virus in Wuhan, China, Ende 2019. Bis Anfang 2023 infizierten sich weltweit mehr als 670 Millionen Menschen mit COVID-19. Mehr als 6,8 Millionen Menschen starben an den Folgen des Virus, was einer Letalität von ca. 1 % entspricht <sup>1</sup>. Aufgrund asymptomatischer Krankheitsverläufe ist von einer hohen Dunkelziffer auszugehen <sup>2</sup>. Bis Februar 2021 lag die Hospitalisierungsrate von Menschen mit COVID-19 in Deutschland bei ca. 10 %. Etwa ein Drittel davon musste intensivmedizinisch behandelt werden und etwa 20 % wurden künstlich beatmet <sup>3</sup>.

Die Basisreproduktionsrate ( $R_0$ ) bezeichnet die durchschnittliche Anzahl von Individuen in einer Population ohne Immunität gegenüber einer Erkrankung, die von einem Individuum infiziert wird. Nach Schätzungen einer Meta-Analyse liegt die  $R_0$  für COVID-19 bei 2,69 und damit deutlich über dem Wert der saisonalen Influenza <sup>4</sup>. Die Basisreproduktionsrate variiert je nach Virusvariante, Zeitpunkt, Ort und Demographie. Mit zunehmendem Alter steigt bei einer Infektion das Risiko für einen schweren Krankheitsverlauf. Epidemiologische Studien zeigen, dass ältere Menschen, insbesondere solche mit Vorerkrankungen oder Immunsuppression, von schwereren Krankheitsverläufen betroffen sind. COVID-19 bei Kindern unterscheidet sich hinsichtlich der Suszeptibilität, Transmission, Infektiosität und klinischem Verlauf und bedarf daher einer differenzierten Betrachtung <sup>5,6</sup>.

Die Ausbreitungsdynamik von COVID-19 ist klimaabhängig. Mit abnehmender Temperatur und Luftfeuchtigkeit wurde ein Anstieg der Infektionszahlen beobachtet<sup>7</sup>, was den wellenförmigen Verlauf der Infektionszahlen mit den höchsten Zahlen in den Wintermonaten erklärt.

### **2.1.3. Erreger und Übertragung**

COVID-19 wird durch eine Infektion mit SARS-CoV-2 verursacht. SARS-CoV-2 ist ein Ribonukleinsäure (RNS)-Virus aus der Familie der Coronaviren<sup>8</sup>. Das Virus ist ein helikales, von einer Lipidmembran umhülltes Nukleokapsid mit einem einzelsträngigen RNS-Genom positiver Polarität. Das Virus besitzt membranständige Strukturproteine sowie einige akzessorische Proteine<sup>9</sup>.

Eine entscheidende Rolle bei der Virusinfektion spielt das Spike-Protein (S-Protein). Es handelt sich um einen Trimer aus drei identischen Untereinheiten, wobei jede Untereinheit aus zwei unterschiedlichen Domänen besteht: der S1- (Subunit 1) und der S2-Untereinheit (Subunit 2)<sup>10</sup>. Die S1-Untereinheit enthält die Rezeptorbindungsdomäne (RBD), die für die Bindung des Virus an das Angiotensin Converting Enzyme (ACE2) auf der Oberfläche der Wirtszelle verantwortlich ist. Auf diese Weise ermöglicht die S1-Untereinheit dem Virus den Eintritt in die Wirtszelle. Die S2-Untereinheit besitzt ein Fusionspeptid, das bei der Bindung des S-Proteins an die Wirtszelle freigelegt wird. Damit verankert die S2-Untereinheit das S-Protein in der Membran und vermittelt die Membranfusion<sup>11</sup>. Das S-Protein ist aufgrund seiner Schlüsselrolle bei der Infektion ein wichtiges Targetmolekül für Impfstoffe und antivirale Therapien<sup>12</sup>.

Das Envelopeprotein (E-Protein) ist ein kleines Strukturprotein, das für den Zusammenbau und die Vermehrung der Viruspartikel essenziell ist<sup>13</sup>. Das Matrix-Protein (M-Protein) verleiht dem Virus durch Interaktion mit dem S- und E-Protein seine charakteristische Form und ist am Zusammenbau der Viruspartikel beteiligt<sup>14</sup>. Zu den nicht-membranständigen Strukturproteinen gehört das Nukleokapsidprotein (N-Protein), das zusammen mit dem Genom das Nukleokapsid bildet. Es interagiert mit viralen Membranproteinen während des Zusammenbaus des Virions und erhöht die Effizienz der Transkription und des Viruszusammenbaus<sup>15</sup>.

Die Adsorption von SARS-CoV-2 an die Wirtszelle erfolgt durch Andocken der S1-Untereinheit des S-Proteins an das als Rezeptor fungierende ACE2 der Wirtszelle. Dies ermöglicht den Eintritt des Virus in die Wirtszelle, die Virusreplikation und die Transkription. Es erfolgt die Produktion von Proteinen, der Zusammenbau und schließlich die Freisetzung neuer Virionen<sup>16</sup>. SARS-CoV-2-Varianten mit genetischen Veränderungen entstehen durch Mutationen im S-Protein und können die viralen Eigenschaften beeinflussen<sup>17</sup>. Je nach

Virusvariante unterscheiden sich die Virulenz, Inkubationszeit und Transmissibilität <sup>18</sup>. Einige dieser Varianten haben sich aufgrund ihrer erhöhten Infektiosität oder Resistenz gegenüber antiviralen Therapien und Impfstoffen als besorgniserregend erwiesen. Beispielsweise kann eine Mutation des S-Proteins die Bindung von SARS-CoV-2 an die Wirtszelle und damit die Infektiosität erhöhen <sup>19</sup>.

COVID-19 wurde erstmals im Dezember 2019 in Wuhan, China, bei einer Gruppe von Patienten diagnostiziert, die sich mit einer unbekannt Form der viralen Pneumonie vorstellten. Allen Patienten war gemeinsam, dass sie den Markt in Huanan, China besucht hatten <sup>20</sup>. SARS-CoV-2 weist eine hohe Sequenzidentität mit dem SARS-ähnlichen Fledermaus-Coronavirus auf. Der Ursprung von SARS-CoV-2 wird daher in der Übertragung des Virus von einer Fledermaus auf den Menschen auf dem benannten Markt in China vermutet. Die epidemiologische Bedeutung der Übertragung von SARS-CoV-2 vom Tier auf den Menschen wird jedoch als gering eingeschätzt <sup>21</sup>. Der häufigste Übertragungsweg von SARS-CoV-2 ist die aerogene Übertragung von Mensch zu Mensch durch die Freisetzung infektiöser respiratorischer Partikel <sup>22</sup>. Darüber hinaus gibt es Evidenz für eine Kontaktübertragung über infizierte Oberflächen <sup>23</sup>. SARS-CoV-2 RNA konnte auch im Stuhl einiger COVID-19 Patienten nachgewiesen werden, sodass eine fäkal-orale Übertragung von COVID-19 möglich ist <sup>24</sup>.

Die Variabilität der Infektiosität von COVID-19 ist ein bekanntes Merkmal der Krankheit. Die höchste Infektiosität besteht kurz vor und kurz nach Symptombeginn, wobei der Zeitraum nicht genau bestimmt werden kann <sup>25,26</sup>. Es wurde festgestellt, dass sich viele Patienten in der präsymptomatischen Phase des Indexfalls infizieren, d.h. etwa 1-2 Tage vor dem Auftreten von Symptomen <sup>25</sup>. In einer Studie mit 181 COVID-19-Fällen betrug die durchschnittliche Inkubationszeit 5 Tage <sup>27</sup>. Es ist jedoch bekannt, dass die Inkubationszeit je nach Virusvariante variiert, wobei die durchschnittliche Inkubationszeit der BA1-Omikron-Variante nur 3 Tage beträgt <sup>28</sup>.

#### **2.1.4. Pathophysiologie**

COVID-19 liegen verschiedene Schädigungsmechanismen zugrunde, die sich auf unterschiedliche Organe und Gewebe auswirken. Einer der Hauptmechanismen ist die direkte Infektion von Zellen. SARS-CoV-2 dringt über den ACE2-Rezeptor in die Wirtszelle ein, wobei es die Serin-Protease Transmembrane Serine Protease 2 (TMPRSS2) benötigt. Dieser Rezeptor wird in verschiedenen Zelltypen exprimiert, unter anderem im Alveolarepithel der Lunge, im Gefäßendothel, in Nierenepithelzellen, Enterozyten, Hepatozyten, Myokardzellen

und Zellen des zentralen Nervensystems<sup>29,30</sup>. Das Eindringen des Virus in die Wirtszelle führt über zelluläre Mechanismen zu Zellschädigung und Zelltod. Neben der direkten Schädigung kann COVID-19 auch indirekte Auswirkungen auf den Organismus haben. Indirekte Folgen einer Infektion mit SARS-CoV-2 werden durch eine Hyperinflammation aufgrund einer überschießenden systemischen Immunreaktion oder einer Immundysregulation hervorgerufen<sup>31</sup>. Dies geschieht durch massive Freisetzung proinflammatorischer Botenstoffe, die als Zytokinsturm bezeichnet wird und eine häufige Komplikation bei schweren Fällen von COVID-19 darstellt.

Die Immunantwort des infizierten Organismus erfolgt zunächst durch das angeborene Immunsystem, das u.a. Interferone, Makrophagen, dendritische Zellen, Granulozyten und natürliche Killerzellen umfasst<sup>32</sup>. Eine verminderte antivirale Abwehr des angeborenen Immunsystems kann den Krankheitsverlauf von COVID-19 entscheidend beeinflussen<sup>33</sup>. Das erworbene Immunsystem reagiert auf eine Infektion mit SARS-CoV-2 mit einer zellulären Immunität, zu der zytotoxische T-Zellen (CD8+), T-Helferzellen (CD4+) und B-Gedächtniszellen gehören<sup>34</sup>. T-Zellen sind spezifisch gegen Strukturproteine von SARS-CoV-2 gerichtet, während B-Gedächtniszellen innerhalb von 6 Monaten nach der Infektion gebildet werden<sup>35</sup>. Median 2 Wochen nach Symptombeginn kommt es auch zu einer spezifischen Antikörperantwort gegen Strukturproteine von SARS-CoV-2<sup>36</sup>. Es werden verschiedene Antikörper, darunter die SARS-CoV-2-spezifischen Antikörper IgG, IgM und IgA, gebildet, die vor einer Reinfektion schützen sollen. Die Antikörpertiter nehmen jedoch nach der Infektion mit der Zeit wieder ab. Der zeitliche Verlauf und die Stärke der Antikörperantwort ist sehr individuell. Es gibt bisher keine Referenzwerte, die eine Empfehlung für die Höhe des Antikörpertiters geben oder einordnen, wie hoch der Schutz bei einem bestimmten Titerwert ist.

Immunität kann durch eine immunwirksame Antigenexposition durch wiederholte Infektion mit SARS-CoV-2 oder durch wiederholte COVID-19-Impfung erworben werden. Es handelt sich dabei um eine funktionale und nicht um eine sterile Immunität, was bedeutet, dass Infektion und Übertragung trotz Immunisierung erfolgen können<sup>37</sup>. Eine Reinfektion ist also trotz Impfung möglich. Die Immunantwort auf SARS-CoV-2 kann auch durch individuelle Faktoren wie Alter, Geschlecht, Vorerkrankungen und genetische Veranlagung beeinflusst werden<sup>38</sup>.

### **2.1.5. Symptome**

Die Klinik von COVID-19 reicht von asymptomatischen bis hin zu lebensbedrohlichen Verläufen. Häufige Symptome bei COVID-19 sind Husten und Fieber. Weitere Symptome sind Schnupfen, Halsschmerzen, Abgeschlagenheit, Gliederschmerzen, Kopfschmerzen, gastrointestinale Beschwerden und Appetitlosigkeit<sup>39-41</sup>. Zu den typischen klinischen

Manifestationen zählen außerdem Anosmie, Dysgeusie und Parosmie <sup>42</sup>. Die Beteiligung der Atemwege kann zu einer Pneumonie führen, die in ein Acute Respiratory Distress Syndrome münden kann <sup>43</sup>. Die klinische Präsentation ist variabel und es können auch allgemein unspezifische Symptome auftreten.

„Long-COVID“ bezeichnet das postakute COVID-19 und ist durch das Persistieren klinischer Symptome oder Langzeitkomplikationen über 4 Wochen nach der akuten Krankheitsphase hinaus gekennzeichnet <sup>44</sup>. Die Manifestation der Symptome variiert in Dauer und Schweregrad. Die Ursachen und Mechanismen des postakuten COVID-19 sind noch nicht vollständig geklärt <sup>44</sup>.

Die COVID-19 Pandemie hat auch die psychische Gesundheit vieler Menschen nachhaltig beeinträchtigt. Es wurde festgestellt, dass psychische Erkrankungen wie Angststörungen oder Depressionen während der Pandemie in allen Bevölkerungsgruppen zugenommen haben <sup>45</sup>. Es ist wichtig zu beachten, dass soziale Isolation ebenfalls zu diesen Auswirkungen beitragen kann.

### **2.1.6. Diagnostik**

Als Goldstandard zur Detektion von SARS-CoV-2 dient die Polymerase-Kettenreaktions (PCR)-Diagnostik. Dabei erfolgt ein Nachweis von RNS aus respiratorischen Sekreten mittels Real-Time Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) <sup>46</sup>. Der Ct-Wert gilt als Maß für die SARS-CoV-2-RNS-Konzentration, wobei niedrige Ct-Werte auf hohe Viruslasten hinweisen.

Mit Hilfe eines Antigen-Tests können virale Proteine von SARS-CoV-2 in respiratorischen Sekreten nachgewiesen werden. Sie werden in der Akutdiagnostik als Point-of-Care-Tests eingesetzt und liefern Ergebnisse innerhalb weniger Minuten.

Antikörpertests zum Nachweis spezifischer Antikörper gegen SARS-CoV-2 dienen der Bestimmung einer zurückliegenden Infektion oder einer Impfantwort. Es gibt verschiedene Testverfahren, die SARS-CoV-2-spezifische Immunglobuline G (IgG), M (IgM), A (IgA) oder Gesamtantikörper nachweisen. Da die Serokonversion bei der Mehrzahl der Patienten in der zweiten Woche nach Symptombeginn erfolgt, wird ein früherer Antikörpernachweis für die Akutdiagnostik nicht empfohlen <sup>47</sup>.

### **2.1.7. Therapie**

Die Therapie von COVID-19 wird der Entwicklung der Symptome des Patienten angepasst. Bei schweren Fällen von COVID-19 kann eine tägliche Pulsoxymetrie erwogen werden, um auf einen Abfall des Sauerstoffpartialdrucks ( $SpO_2$ ) und eine Hypoxie mit einer Sauerstoffgabe

reagieren zu können. Bei Verdacht auf eine Pneumonie werden bildgebende Verfahren wie Röntgen oder Computertomografie eingesetzt.

Milde Krankheitsverläufe von COVID-19 werden bei hohem Leidensdruck symptomatisch z.B. mit Analgetika therapiert. In der frühen Therapie des schweren COVID-19 kommen antivirale Medikamente zum Einsatz. Es werden direkte antivirale Medikamente (DAAs) angewandt, die auf virale Proteine abzielen. Weniger weit entwickelte Host-Targeting-Wirkstoffe (HTAs) hemmen die menschliche Wirtszelle, die das Virus für die Replikation und Ausbreitung benötigt<sup>48</sup>. Ein weiterer Ansatzpunkt ist die Blockade der Endozytose von SARS-CoV-2, sodass das virale Material nicht zur Replikation in die Wirtszelle gelangt<sup>49</sup>.

Therapeutisch relevant sind auch Therapien gegen die Strukturproteine Protein-M, Protein-S und Protein-E. Sie dienen der Konservierung des viralen Genoms und unterdrücken die Immunantwort der Wirtszelle, sodass sie sinnvolle Angriffspunkte für Medikamente darstellen<sup>50</sup>.

Budesonid ist ein inhalatives Glukokortikoid, das hauptsächlich zur Therapie von Atemwegserkrankungen eingesetzt wird. In einer Phase-2-Studie mit COVID-19-Patienten reduzierte die frühzeitige Gabe von Budesonid die Wahrscheinlichkeit, dass eine intensivmedizinische Behandlung erforderlich wurde, und verkürzte die Zeit bis zur Genesung<sup>51</sup>. Die Deutsche Gesellschaft für Allgemeinmedizin und Familienmedizin (DEGAM) spricht eine Kann-Empfehlung (DEGAM 2023) für die inhalative Budesonid-Therapie bei Patienten mit einem erhöhten Risiko für einen schweren Krankheitsverlauf aus.

In einer Phase-3-Studie wurde gezeigt, dass der monoklonale Antikörper Sotrovimab das Risiko einer Krankheitsverschlechterung bei Hochrisikopatienten mit leichtem bis mittelschwerem COVID-19 reduziert<sup>52</sup>. Sotrovimab wird von der DEGAM als Soll-Empfehlung für immunsupprimierte Patienten und als Kann-Empfehlung (DEGAM 2023) für Risikopatienten ohne Impfschutz empfohlen.

Remdesivir ist ein Adenosinanalogon, das die RNS-abhängige RNS-Polymerase von SARS-CoV-2 und damit die Virusreplikation hemmt. In einer randomisierten Doppelblindstudie bei nicht hospitalisierten Patienten mit hohem Risiko für eine COVID-19-Progression führte eine dreitägige Behandlung mit Remdesivir im Vergleich zu Placebo zu einer 87%igen Reduktion des Risikos einer Hospitalisierung oder Mortalität<sup>53</sup>.

Zu den Therapieansätzen, bei denen der Wirt das Wirkstoffziel darstellt, gehört die Unterdrückung einer überschießenden Entzündungsreaktion. Geeignete Medikamente hierfür sind Kortikosteroide und IL-6-Inhibitoren<sup>54,55</sup>.

Ein weiterer therapeutischer Ansatz ist die Neutralisation des Virus durch monoklonale Antikörper, die spezifisch an die Glykoproteine von SARS-CoV-2 binden<sup>56</sup>. Die Kombination von Casirivimab und Imdevimab ist seit November 2021 in der Europäischen Union zur frühen antiviralen Therapie zugelassen.

Für die Therapie mit Antikörpern gibt es den Ansatz, Blutplasma von Rekonvaleszenten als Transfusion zu verwenden. Das Plasma des Spenders dient dabei als Reservoir für humane Antikörper<sup>57</sup>. Intravenöse Immunglobuline werden aus dem Plasma von Rekonvaleszenten gewonnen und finden therapeutische Anwendung bei verschiedenen entzündlichen und autoimmunen Erkrankungen. Diese Form der Immuntherapie könnte auch bei COVID-19 wirksam sein<sup>58</sup>.

Peptide mit antiviralen Eigenschaften haben ebenfalls ein großes Potential für die Therapie von COVID-19. Peptide können Protein-Interaktionen hemmen und haben bereits Effekte bei viralen Infektionen, einschließlich CoVs gezeigt<sup>59</sup>. Sie haben in der Regel ein geringeres Nebenwirkungsprofil als chemische Medikamente, es gibt Möglichkeiten zur Verlängerung der Peptidhalbwertszeit und eine schnelle Markteinführung ist häufig möglich<sup>60</sup>. Die Wirkmechanismen von Peptiden sind die Blockierung der Adsorption des Virus an die Wirtszelle, die Hemmung des Viruseintritts und die Hemmung der Bildung und Freisetzung von SARS-CoV-2<sup>61</sup>.

### **2.1.8. Prävention**

Die Impfung gegen COVID-19 hat sich als wirksam erwiesen und reduziert das Infektionsrisiko sowie die Wahrscheinlichkeit eines schweren Krankheitsverlaufs<sup>62</sup>. Die Wirksamkeit der Impfung nimmt 6 Monate nach der vollständigen Impfung ab, was auf eine Abnahme der Immunität zurückzuführen sein könnte<sup>63</sup>.

Bei den nicht-medikamentösen Maßnahmen ist das Tragen eines Mund-Nasen-Schutzes zum Schutz vor COVID-19 sinnvoll, da es das Infektionsrisiko signifikant reduzieren kann<sup>64,65</sup>. Neben flächendeckenden Lockdowns sind Strategien wie die Isolierung von Infizierten und Verdachtsfällen sowie eine Kontaktnachverfolgung hilfreich, um die Ausbreitungsdynamik zu kontrollieren<sup>66</sup>.

## **2.2. Laborparameter**

### **2.2.1. LL-37**

Cathelicidin ist der Vorläufer von LL-37, einem antimikrobiellen Peptid, das Teil der angeborenen Immunabwehr ist. Humanes Cathelicidin (hCap-18) wird durch die Proteinase 3 proteolytisch zu LL-37 gespalten und durch Exozytose freigesetzt<sup>67</sup>. LL-37 besteht aus 37 Aminosäuren mit der Primärstruktur LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLPRTES und besitzt eine  $\alpha$ -helikale Struktur<sup>68</sup>. LL-37 ist ein amphipathisches, kationisches Peptid mit einer

Nettoladung von +6 bei neutralem pH-Wert. LL-37 wird im menschlichen Körper vor allem von Leukozyten und Epithelzellen gebildet.

Das antimikrobielle Peptid kommt im Körper sowohl frei im Serum als auch gebunden an Lipide und Apolipoproteine vor. In meiner Studie untersuchte ich die Serumkonzentration von freiem LL-37. Die Serumkonzentration spiegelt die systemische Konzentration wider. LL-37 wird aber auch lokal im Gewebe oder im Speichel freigesetzt und kann hier vom Serum abweichende Konzentrationen haben. Die Expression und Freisetzung werden durch verschiedene Stimuli ausgelöst. Dazu gehören z.B. Infektionen, Entzündungen, Stress, Vitamin-D oder genetische Varianten. Es wird angenommen, dass verschiedene Transkriptionsfaktoren wie der nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells (NF- $\kappa$ B), das Aktivator-Protein-1 (AP-1) oder der Vitamin-D-Rezeptor an der Regulation von LL-37 beteiligt sind <sup>69</sup>.

LL-37 hat neben antimikrobiellen auch immunmodulatorische Funktionen <sup>70</sup>. Bei inflammatorischen Prozessen kann es Entzündungsmediatoren wie IL-1 $\beta$  oder Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) hemmen oder stimulieren, je nachdem, welcher Signalweg beteiligt ist <sup>71</sup>. LL-37 kann die Migration und Funktion verschiedener Immunzellen wie Makrophagen, dendritischer Zellen und T-Zellen beeinflussen. LL-37 ist über die beschriebenen Mechanismen an der Pathogenese verschiedener Krankheiten beteiligt. In einigen Fällen hat LL-37 eine schützende Funktion, in anderen Fällen trägt es zum Krankheitsprogress bei. Das Vorhandensein zirkulierender LL-37-spezifischer T-Zellen ist mit der Aktivität von Psoriasis assoziiert <sup>72</sup>. LL-37 zeigt Potential in der Therapie von Karzinomen. Allerdings ist die Wirkung unterschiedlich, sodass LL-37 bei einigen Tumorarten die Proliferation unterdrückt, bei anderen aber karzinogene Wirkungen zeigt. Zudem könnte LL-37 eine schützende Rolle bei rheumatoider Arthritis haben <sup>71</sup>. Eine hohe Konzentration von LL-37 im Blutserum von Patienten mit bakterieller Pneumonie sowie von Kleinkindern mit Bronchiolitis zeigte einen protektiven Effekt in Form eines mildereren Krankheitsverlaufs <sup>73,74</sup>.

Aufgrund dieses vielseitigen Wirkprofils rückte LL-37 auch im Zusammenhang mit COVID-19 in den Fokus aktueller Forschung. Insbesondere das Potential, virale Eintrittsmechanismen zu blockieren und immunregulatorisch zu wirken, deutet darauf hin, dass LL-37 den Verlauf einer SARS-CoV-2-Infektion beeinflussen könnte <sup>75</sup>.

In einer kürzlich durchgeführten in-vitro Studie konnte gezeigt werden, dass LL-37 die Bindung von SARS-CoV-2 an den ACE2-Rezeptor der Wirtszelle und damit den Viruseintritt verhindert <sup>76</sup>. Auf Grundlage dieser Erkenntnisse vermuteten wir, dass LL-37 den Krankheitsverlauf von COVID-19 positiv beeinflussen kann.

Vor diesem Hintergrund untersuchten wir, ob höhere LL-37-Serumkonzentrationen mit einem mildereren Krankheitsverlauf assoziiert sind. Solche Konzentrationen könnten Ausdruck einer effektiven angeborenen Immunantwort sein.

Das Vorläuferprotein hCAP-18 wird überwiegend in neutrophilen Granulozyten exprimiert, die LL-37 aus peroxidase-negativen Granula freisetzen <sup>77,78</sup>. Aus diesem Grund betrachteten wir zusätzlich den Quotienten aus LL-37-Serumkonzentration und Leukozytenzahl. Der gebildete Quotient spiegelt die Menge an freigesetztem LL-37 pro Leukozyt wider und erlaubt somit eine Einschätzung der Aktivität des angeborenen Immunsystems.

### **2.2.2. Vitamin D**

Vitamin D gehört zu den fettlöslichen Vitaminen. Nur ein geringer Teil des Bedarfs kann über die Nahrung gedeckt werden, der überwiegende Teil wird vom Körper selbst produziert. Die Biosynthese von Vitamin D<sub>3</sub> (Cholecalciferol) erfolgt in der Haut aus 7-Dehydrocholesterol mit Hilfe von Ultraviolett-Strahlung. Vitamin D<sub>3</sub> gelangt ins Blut, wird dort vor allem an das Vitamin-D-bindende Protein gebunden und zur Leber transportiert. In der Leber erfolgt die Hydroxylierung zu Calcidiol, der Speicherform von Vitamin D. Calcidiol wird überwiegend in den Nieren zum biologisch aktiven Calcitriol hydroxyliert.

Seit vielen Jahren ist die Bedeutung von Vitamin D im Zusammenhang mit dem Kalziumstoffwechsel und der Knochengesundheit bekannt <sup>79</sup>. Darüber hinaus gibt es Hinweise, dass Vitamin D einen wichtigen Einfluss auf weitere physiologische Funktionen, u.a. das Immunsystem, haben kann <sup>80</sup>. Der Vitamin-D-Rezeptor wird auf verschiedenen Zellen des Immunsystems exprimiert, wodurch Vitamin D in der Lage ist, die Proliferation und Funktion von T-Zellen, Makrophagen und Antigen-präsentierenden Zellen zu regulieren <sup>81</sup>. Bei einigen viralen Infektionen hatte eine Vitamin-D-Supplementierung positive Effekte auf den Krankheitsverlauf, während ein Vitamin-D-Mangel das Risiko für schwere Verläufe erhöhte <sup>82</sup>. Vitamin D könnte auch den Krankheitsverlauf von COVID-19 beeinflussen. Vitamin D stimuliert die Expression des cyclic adenosine monophosphate (cAMP)-Gens. Das cAMP-Gen codiert für das Vorläuferprotein von LL-37 und ist ein zentraler Regulationspunkt der Synthese <sup>83</sup>. Über diesen Mechanismus kann Vitamin D stimulierend auf die Freisetzung von LL-37 wirken. Daraus ergibt sich die Hypothese, dass hohe Vitamin-D-Konzentrationen auch zu hohen LL-37-Konzentrationen führen, die sich positiv auf eine COVID-19-Infektion auswirken.

### **2.2.3. Entzündungsmarker IL-6, CRP, PCT**

Zu den wichtigen Entzündungsparametern gehören unter anderem C-Reaktives-Protein (CRP), Interleukin-6 (IL-6), Procalcitonin (PCT) und auch die Leukozytenzahl. Die Entzündungsreaktion spielt eine wichtige Rolle bei der Infektion mit SARS-CoV-2 <sup>84</sup>.

CRP ist ein Akute-Phase-Protein, das in der Leber gebildet wird. CRP ist im Körper als Reaktion auf inflammatorische Prozesse erhöht und kann durch Aktivierung von Phagozyten

verschiedene Mikroorganismen bekämpfen. Bei der COVID-19-Pneumonie kommt es zu einem Zytokinsturm, bei dem unter anderem die Zytokine IL-6 und TNF- $\alpha$  die Produktion von CRP stimulieren. Dies lässt vermuten, dass die CRP-Konzentration mit dem Schweregrad einer COVID-19-Infektion zusammenhängt.

Interleukin-6 (IL-6) ist ein Entzündungsmediator, der u.a. von Zellen des Immunsystems produziert wird. Es spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation der Immunantwort und des Entzündungsprozesses. IL-6 ist besonders wichtig bei der Bekämpfung von Infektionen bakterieller und viraler Genese. Es wird auch angenommen, dass IL-6 eine Rolle bei der Entstehung von Zytokinstürmen spielt, bei denen es zu einer übermäßigen Entzündungsreaktion im Körper kommt, die zu Organversagen und zum Tod führen kann. Eine so genannte Hyperinflammation wird bei COVID-19 Patienten mit Vorerkrankungen und Risikofaktoren beobachtet <sup>85</sup>. Daher wurde in meiner Studie die IL-6-Konzentrationen im Serum neben CRP als weiteren Entzündungsparameter untersucht.

Procalcitonin ist ein Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 13 kD, das aus 116 Aminosäuren besteht. Es stellt zwar die Vorstufe des Hormons Calcitonin dar, ist jedoch eine biologische Entität. Während Calcitonin praktisch ausschließlich von den C-Zellen der Schilddrüse gebildet wird, kann Procalcitonin von verschiedenen Zelltypen und Organen (z.B. Leber, Niere, Fettgewebe und Muskel) synthetisiert werden. Auslöser für die Procalcitoninfreisetzung sind proinflammatorische Stimuli. PCT dient als unterstützender Biomarker, um eine systemische, bakterielle Infektion, insbesondere eine Sepsis, von einer lokalen Entzündung abgrenzen zu können. Ich habe die PCT-Konzentration bestimmt, um die Häufigkeit schwerer bakterieller Co-Infektionen bei COVID-19 zu untersuchen.

#### **2.2.4. LDH**

Die Laktatdehydrogenase (LDH) ist ein Enzym, das in vielen verschiedenen Zelltypen vorkommt und an der Umwandlung von Pyruvat in Laktat im anaeroben Energiestoffwechsel beteiligt ist. Erhöhte LDH-Konzentrationen im Blut können auf eine Schädigung oder Erkrankung in Zellen hinweisen, in denen das Enzym normalerweise vorkommt, z.B. Herz, Leber, Nieren und Lunge. SARS-CoV-2 kann Pneumonien verursachen, die mit einer Schädigung des Lungengewebes und dem Untergang von Zellen einhergehen <sup>86</sup>. Die LDH-Konzentrationen können außerdem bei inflammatorischen Prozessen erhöht sein <sup>87</sup>, welche insbesondere bei schweren COVID-19-Infektionen auftreten. Vor diesem Hintergrund habe ich die LDH-Serumkonzentrationen der Patienten als Marker für den Grad der Gewebsschädigung bei COVID-19 untersucht.

### **2.2.5. Leukozyten**

Leukozyten, auch weiße Blutkörperchen genannt, sind essenzielle Komponenten der Immunabwehr. Sie werden im Knochenmark gebildet und zirkulieren im Blut, bis sie bei Infektionen in das betroffene Gewebe einwandern. Dort bekämpfen sie Pathogene über verschiedene Mechanismen der angeborenen und adaptiven Immunantwort.

Die wichtigsten Leukozytenpopulationen umfassen neutrophile Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten. Ihre Anzahl im peripheren Blut ist ein etablierter Entzündungsparameter und kann Hinweise auf das Ausmaß und die Art der Immunreaktion geben.

Bei Infektionen wie COVID-19 kommt es durch die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine – insbesondere IL-1 und TNF- $\alpha$  – zu einer Aktivierung des Knochenmarks mit konsekutiver Leukozytose. Gleichzeitig kann es in frühen oder milderen Stadien auch zu einer Leukozytopenie kommen, etwa infolge eines erhöhten Verbrauchs oder viraler Suppression hämatopoetischer Prozesse.

Die Leukozytenzahl wurde daher im Rahmen dieser Arbeit als laborchemischer Marker zur Einschätzung der systemischen Immunantwort bestimmt.

### **2.2.6. Kreatinin**

Kreatinin ist ein Endprodukt des Muskelmetabolismus, das von den Nieren gefiltert und mit dem Urin ausgeschieden wird. Die Kreatinin-Konzentration ist ein Indikator für die Nierenfunktion. Eine erhöhte Kreatinin-Konzentration weist auf eine verminderte glomeruläre Filtrationsrate (GFR) hin. Im Zusammenhang mit COVID-19 konnte gezeigt werden, dass SARS-CoV-2 mit neu auftretenden akuten Nierenschäden assoziiert ist und die Therapie erschweren kann <sup>88</sup>. Die Epithelzellen der Niere exprimieren ACE2 und bieten SARS-CoV-2 die Möglichkeit zum Viruseintritt. Vor diesem Hintergrund wurde Kreatinin als Maß für die Nierenfunktion bzw. die GFR untersucht.

### **2.2.7. Leberfunktion**

Zu den Biomarkern, die eine Leberschädigung anzeigen, gehören unter anderem die Enzyme Alanin-Aminotransferase (ALAT), Aspartat-Aminotransferase (ASAT) und Gamma-Glutamyltransferase ( $\gamma$ GT). ALAT wird hauptsächlich in den Parenchymzellen der Leber, den Hepatozyten gebildet, während ASAT auch in Geweben anderer Organe gebildet wird. Eine Erhöhung von ALAT und ASAT sprechen für eine Hepatozytenschädigung. Bei COVID-19 kann eine Leberschädigung durch eine IL-6-vermittelte Endotheliopathie <sup>89</sup> oder auch durch

medikamententoxische Wirkungen <sup>90</sup> verursacht werden.  $\gamma$ GT ist ein Marker für eine Schädigung der Cholangiozyten. ACE2, der Rezeptor für den Eintritt von SARS-CoV-2 in die Wirtszelle, wird auch auf Cholangiozyten exprimiert, sodass eine direkte Schädigung durch das Virus möglich ist <sup>90</sup>. Aus diesen Gründen habe ich die Leberenzyme als Maß für die Leberzellschädigung untersucht.

### **2.2.8. Apolipoproteine**

Apolipoproteine bilden die hydrophile Oberfläche der Lipoproteine, die für den Transport der wasserunlöslichen Lipide im Blut verantwortlich sind. Apolipoprotein A1 (APOA1) ist ein Strukturprotein des High-Density-Lipoprotein (HDL) und besitzt eine antiinflammatorische Wirkung. Apolipoproteine dienen als prädiktive Marker für kardiovaskuläre, neoplastische und zerebrovaskuläre Erkrankungen <sup>91</sup>. Es wird vermutet, dass adäquate APOA1- und APOB-Konzentrationen einen protektiven Einfluss auf den Krankheitsverlauf bei COVID-19 haben <sup>91</sup>. APOE4, ein Allel des Apolipoprotein E-Gens, gilt als Risikofaktor für eine schwere COVID-19-Infektion und wird mit COVID-19 assoziierten Müdigkeit in Verbindung gebracht <sup>92,93</sup>.

In der Literatur gibt es Hinweise darauf, dass LL-37 gebunden an Apolipoproteine vorliegen kann, was die gemessene Konzentration von freiem LL-37 im Serum beeinflussen könnte. Daher untersuchte ich den Zusammenhang zwischen der Konzentration der Apolipoproteine und LL-37 im Serum.

### **2.2.9. Immunglobuline**

Immunglobuline sind Antikörper, die von Plasmazellen als Reaktion auf einen Krankheitserreger gebildet werden. Als Teil der humoralen Immunabwehr sind Immunglobuline über verschiedene Mechanismen spezifisch gegen Krankheitserreger gerichtet, wobei die 5 Isotypen Immunglobulin A, D, E, G und M unterschieden werden. Da das Immunsystem bei einer Infektion mit COVID-19 vermehrt (spezifische) Immunglobuline gegen SARS-CoV-2 bildet <sup>94</sup>, untersuchte ich die Serumkonzentrationen der Immunglobuline IgA, IgG und IgM. Die Analyse bezog sich auf Gesamtkonzentrationen von IgA, IgG und IgM, nicht auf SARS-CoV-2-spezifische Antikörper.

## **2.3. Ziele meiner Dissertation**

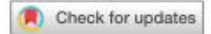
Zur Zeit der Probenentnahme von Mai 2020 bis April 2021 stellte COVID-19 eine gefährliche Erkrankung mit unvorhersehbarem Verlauf und begrenzten therapeutischen Möglichkeiten dar. Ziel meiner Untersuchungen war es, neue Biomarker zu identifizieren, die einen schweren Verlauf der Erkrankung frühzeitig prognostizieren, um die Patienten entsprechend behandeln und hospitalisieren zu können. Neben dem diagnostischen Nutzen sollte meine Arbeit auch Hinweise auf einen möglichen therapeutischen Nutzen von LL-37 liefern. Sowohl eine indirekte Modulation über Vitamin D als auch eine direkte, inhalative Verabreichung – analog zur Anwendung von Budesonid – erscheinen theoretisch denkbar.

Ziele:

- 2.3.1.1.1.1. Untersuchung des Zusammenhangs zwischen der LL-37-Serumkonzentration und dem Schweregrad von COVID-19.
- 2.3.1.1.1.2. Untersuchung eines möglichen Zusammenhangs zwischen der Vitamin-D-Konzentration, der LL-37-Serumkonzentration und dem Schweregrad von COVID-19.
- 2.3.1.1.1.3. Identifikation zusätzlicher laborchemischer Marker mit prognostischem Potential für den Krankheitsverlauf bei COVID-19.

### **3. Publikation**

Die Ergebnisse der Dissertation wurden unter dem Titel „The ratio of serum LL-37 levels to blood leucocyte count correlates with COVID-19 severity“ im Jahr 2022 bei Scientific Reports publiziert <sup>95</sup>. Das Projekt wurde durch ein Stipendium des Köln Fortune Programms (Begabtenförderung für Studierende der Medizin und Zahnmedizin) gefördert.



# OPEN The ratio of serum LL-37 levels to blood leucocyte count correlates with COVID-19 severity

Matthias Keutmann<sup>1</sup>, Gabriele Hermes<sup>1</sup>, Denise Meinberger<sup>1</sup>, Annika Roth<sup>1</sup>, Jannik Stemler<sup>2,3,4</sup>, Oliver A. Cornely<sup>2,3,4,5</sup>, Andreas R. Klatt<sup>1✉</sup> & Thomas Streichert<sup>1</sup>

Beneficial effects of vitamin D on COVID-19 progression have been discussed in several studies. Vitamin D stimulates the expression of the antimicrobial peptide LL-37, and evidence shows that LL-37 can antagonize SARS-CoV-2. Therefore, we investigated the association between LL-37 and vitamin D serum levels and the severity of COVID-19. To this end, 78 COVID-19 patients were divided into 5 groups according to disease severity. We determined serum levels of LL-37, vitamin D, and routine laboratory parameters. We demonstrated a correlation of CRP, IL-6, PCT, leukocyte count, and LDH with the severity of COVID-19. Our study did not demonstrate a direct relationship between serum levels of LL-37 and vitamin D and the severity of COVID-19. LL-37 is produced by granulocytes and released at the site of inflammation. Therefore, the analysis of LL-37 in broncho-alveolar lavage rather than in patient serum seems critical. However, since LL-37 is produced by granulocytes, we determined serum LL-37 levels as a function of leukocyte count. The LL-37/leukocyte count ratio correlates highly significantly inversely proportional with COVID-19 severity. Our results indicate that the LL-37/leukocyte count ratio could be used to assess the risk of COVID-19 progression as early as hospital admission.

Coronavirus disease 2019 (COVID-19) is caused by the Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2). The potential therapeutic and preventive effects of vitamin D in COVID-19 are a current topic of discussion in the media and the scientific community. Vitamin D is a fat-soluble vitamin and plays a crucial role in regulating calcium balance<sup>1</sup>. In addition, studies show that vitamin D has a decisive influence on the immune system and regulates antimicrobial innate immune responses<sup>2–4</sup>. The effects of vitamin D are mediated by its binding to the vitamin D receptor (VDR) and subsequent binding to vitamin D response elements (VREs)<sup>2</sup>. Such a consensus VRE is located in the promoter of the human cathelicidin antimicrobial peptide (CAMP) gene. Vitamin D stimulates the expression of the CAMP gene, which encodes for the human cathelicidin (hCap-18), the precursor of LL-37<sup>3</sup>. Human cathelicidin is proteolytically cleaved to LL-37 by proteinase 3 and released by exocytosis<sup>5</sup>. LL-37 is an antimicrobial peptide that is part of the innate immune defense. It consists of 37 amino acids that form an amphipathic,  $\alpha$ -helical structure. At neutral pH, LL-37 is a cationic peptide with a net charge of +6. In addition to its antibacterial properties, LL-37 has also antiviral properties<sup>6</sup>, and lower LL-37 serum levels are associated with severity of illness and length of hospital stay<sup>7,8</sup>.

SARS-CoV-2 infection is initiated by the binding of viral spike protein 1 (S1) to the host angiotensin-converting enzyme-2 (ACE2). LL-37 binds with high affinity to the receptor binding domain (RBD) of S1. LL-37 also binds to the host cell ACE2 and blocks the ligand binding domain (LBD). Both could reduce the subsequent recruitment of ACE2 and inhibit the entry of SARS-CoV-2 to the host cell<sup>9</sup>. Therefore, LL-37 might influence the course of COVID-19, and LL-37 serum levels might be related to infection severity.

<sup>1</sup>Faculty of Medicine and University Hospital Cologne, University of Cologne, Institute for Clinical Chemistry, 50937 Cologne, Germany. <sup>2</sup>Faculty of Medicine and University Hospital Cologne, Translational Research, Cologne Excellence Cluster On Cellular Stress Responses in Aging-Associated Diseases (CECAD), University of Cologne, 50931 Cologne, Germany. <sup>3</sup>Faculty of Medicine and University Hospital Cologne, Department I of Internal Medicine, Center for Integrated Oncology Aachen Bonn Cologne Duesseldorf (CIO ABCD) and Excellence Center for Medical Mycology (ECMM), University of Cologne, 50937 Cologne, Germany. <sup>4</sup>German Centre for Infection Research (DZIF), Partner Site Bonn-Cologne, 50931 Cologne, Germany. <sup>5</sup>Faculty of Medicine and University Hospital Cologne, Clinical Trials Centre Cologne (ZKS Köln), University of Cologne, 50935 Cologne, Germany. ✉email: andreas.klatt@uk-koeln.de

In this study, we investigated a possible relationship between the serum levels of LL-37 and vitamin D and COVID-19 severity. In addition, we determined other laboratory parameters that might impact serum LL-37 levels or be related to COVID-19 severity.

## Material and methods

**Study design and ethics.** This retrospective cohort study was performed at and under the guidelines of the University Hospital of Cologne, Germany and approved by the ethics committee of the Medical Faculty of the University of Cologne (ISI protocol, version 2.2 - 02.04.2019). Written informed consent was obtained from all patients or their authorized representatives.

**Study population.** The cohort enrolment criteria included patients that tested positive for SARS-CoV-2 infection by polymerase chain reaction (PCR) and were hospitalized at the University Hospital Cologne. The 78 participating patients were divided into five groups depending on the severity of the COVID-19 disease. Ten patients with asymptomatic disease course (WHO Score 1, according to the WHO Working Group on Clinical Characterization and Treatment of COVID-19 Infection<sup>10</sup>) formed the first group. The second group consisted of 13 patients who were symptomatic but did not require oxygen administration during hospitalization (WHO Score 2–4). The third group included 26 patients whose COVID-19 disease required non-invasive oxygen administration (WHO Score 5 or 6). The fourth group comprised 13 patients who required invasive mechanic tube ventilation (WHO Score 7–9). The fifth group included 16 patients who died of COVID-19 during the hospitalization (WHO Score 10).

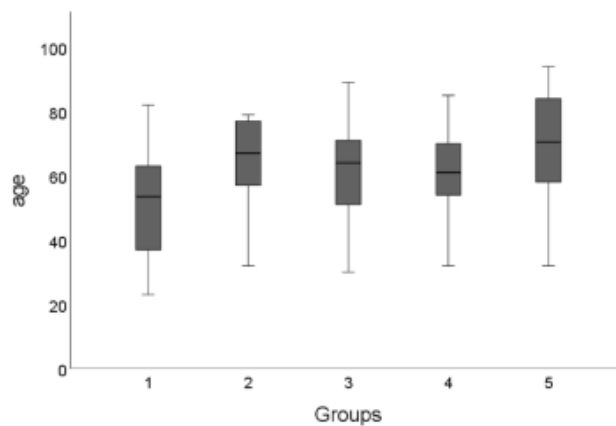
**Blood samples.** Blood samples were collected between day 1 and day 3 of clinical admission of each individual inpatient stay between December 2020 and March 2021. Serum was collected in 4.7-ml serum monovettes (Sarstedt, Germany), centrifuged at 2772 g for 10 min, and stored at -80 °C until use. Ethylenediaminetetraacetat (EDTA) blood was collected in EDTA monovettes and used for hematological analysis (Sarstedt, Germany).

**Enzyme-linked immunosorbent binding assay (ELISA).** To detect LL-37, sandwich ELISA was performed with a Human Antibacterial Protein LL-37 ELISA Kit from Abbeba\* strictly following the provided protocol. In brief, 96 well plates were coated with an anti-LL-37 antibody. LL-37 standards and patient serum were added to the wells, and a biotin-conjugated reagent was added to the wells and incubated. Unbound conjugates were removed using the provided wash buffer at each stage. Tetramethylbenzidine 6 (TMB 6) substrate was used to quantify the HRP enzymatic reaction. Optical density (OD) was measured spectrophotometrically at 450 nm. Samples of each patient were measured in duplicate.

**Other laboratory measurements.** C-reactive protein (CRP) was determined by the CRP Latex Test Gen. 3, a particle-enhanced immunoturbidimetry (Roche Diagnostics\*) with the Cobas C702 analyzer system. Interleukin 6 (IL-6) was determined by the Elecsys IL-6 (Roche Diagnostics\*), a sandwich immunoassay, using the Cobas E801 analyzer system. Procalcitonin (PCT) was determined using the Elecsys BRAHMS PCT sandwich immunoassay (Roche Diagnostics), with the Cobas E801 analytical system (Roche Diagnostics). Lactate dehydrogenase (LDH) concentration was measured by a simple optical assay of the IFCC (International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine) method using the Cobas C702 analyzer system. The white blood cells were determined from EDTA blood using the Sysmex XN-9100 or XN1000\*. The concentration of 25-hydroxycholecalciferol (25-HCC, Calcidiol) was determined using Elecsys Vitamin D total II (Roche Diagnostics\*), a competitive binding assay, with the Cobas E801 analytical system. 1,25-Dihydrocholecalciferol (1,25-DHCC, Calcitriol) was determined using a sandwich assay with chemiluminescence in the LIAISON\* immunoassay analyzer (DiaSorin). Creatinine concentration was measured using the Creatinine Plus Test Ver. 2 (Roche Diagnostics\*), an enzymatic method, on the Cobas C702. Immunoglobulins A (IgA), G (IgG), and M (IgM) were determined by Tina-quant assay (Roche Diagnostics\*), an immunoturbidimetry, using the Cobas C702 analytical system. Aspartate aminotransferase (ASAT) and alanine aminotransferase (ALAT) were detected using the ASAT test and ALAT test (Roche Diagnostics\*), a coupled optical test of the 7 IFCC method, on the Cobas C702. The concentration of gamma-glutamyl transferase (gamma-GT) in heparin plasma was determined using the gamma-glutamyl transferase test (Roche Diagnostics\*) of the IFCC method, a color test. Apolipoproteins were analyzed using Tina-quant immunoturbidimetry (Roche Diagnostics\*) with the Cobas C702 analyzer system. The concentration of triglycerides was determined by Triglycerides GPO-PAP (Roche Diagnostics\*) using the Cobas C 702 analytical system. Cholesterol concentration, low-density lipoprotein (LDL) and high-density lipoprotein (HDL) were measured using the enzymatic color test Cholesterol Oxidase-Phenol 4-Aminoantipyrene Peroxidase (CHOD-PAP) (Roche Diagnostics\*) on the Cobas C702.

**Statistical analysis.** Descriptive statistics are presented with average value, standard deviation, median, and interquartile range. Normality of distribution was checked with Kolmogorov–Smirnov criterion and graphically with histograms. Relations between parameters were expressed as correlation coefficients Spearman's Rho for quantitative factors. The statistical analysis was performed using IBM SPSS Statistics 28.0.0.0. (IBM Corp., Armonk, NY, USA). All p-values were two-tailed with  $p < 0.05$  considered statistically significant.

**Ethics approval.** All methods were carried out in accordance with relevant guidelines and regulations.



**Figure 1.** Boxplot of age and severity of COVID-19. The age distribution of the five groups. The median, upper quartile, lower quartile, minimum and maximum are shown.

## Results

**Demographics.** The patient ages in our study ranged from 23 to 94 years (Fig. 1). The mean age was 62 years, with a standard deviation of 17 years (Table 1). The mean age was highest in group 5 at 69 years. There was no statistically significant difference between the groups.

We investigated the association between sex and COVID-19 severity because previous studies have shown an association<sup>11,12</sup>. Our study population consisted of 42 (54%) male and 36 (46%) female patients (Supplementary Table 1). No association was found.

**Clinical characteristics and laboratory data.** The patients were clinically classified into five groups according to the severity of COVID-19 disease, as described. Serum LL-37 and vitamin D levels were determined to investigate a potential correlation between serum LL-37 and vitamin D levels and COVID-19 severity. In addition, other laboratory parameters that might be related to serum LL-37 levels and the severity of COVID-19 were determined (Table 1).

The correlation between the individual parameters and the COVID-19 severity was calculated as Spearman's rank correlation (Table 2). A correlation coefficient of 1 describes a perfect positive correlation, whereas a correlation coefficient of  $-1$  describes a perfect negative correlation. A correlation is significant at  $p < 0.05$  for two-sided tests.

**LL-37.** LL-37 binds to the spike protein of SARS-CoV-2 and may prevent the virus from entering the host cell<sup>9</sup>. We assumed a protective effect of LL-37 in COVID-19 and a relationship between the LL-37 serum levels and COVID-19 severity. Therefore, we examined LL-37 serum levels in our patients. To date, no defined LL-37 reference values exist. In our study, serum LL-37 levels ranged from 1 to 148 ng/ml, with an average serum level of 68 ng/ml. We found a decrease in mean LL-37 serum levels from 87 ng/l in group 1 to 57 ng/l in group 4. However, there was no statistically significant correlation between LL-37 serum levels and the severity of COVID-19, age, or sex of patients (Fig. 2a).

**LL-37 and leukocytes.** LL-37 is produced in epithelial cells and neutrophil granulocytes. We therefore examined the ratio of serum LL-37 levels as a function of leukocyte count. The ratio indicates how much LL-37 is produced per leukocyte. We found a highly significant inversely proportional correlation between the LL-37/leukocyte count ratio and the severity of COVID-19 ( $p < 0.001$ ) (Fig. 2b). The asymptomatic patients had the highest ratio with a mean of 81, whereas the deceased group (group 5) and the mechanically ventilated patients (group 4) had the lowest ratios with a mean of 8 (Table 1). In contrast, LL-37 serum levels as function of lymphocyte count did not correlate with COVID-19 severity (Supplementary Fig. 1b).

**Vitamin D.** A recent study showed an association between vitamin D and COVID-19 severity<sup>13</sup>. Vitamin D regulates calcium balance and modulates immune system activity. A distinction is made between the precursor of vitamin D, calcidiol, and the active vitamin D hormone, calcitriol. In our study, mean serum calcidiol levels were below the reference range of 30–70  $\mu\text{g/l}$  in all groups, whereas mean serum calcitriol levels were within the reference range of 20–79 ng/l (Table 1). Serum calcidiol and calcitriol levels showed no correlation with COVID-19 severity (Fig. 2c,d). Vitamin D has a stimulatory effect on LL-37<sup>3</sup>, so we also examined the relationship between these concentrations. We found no significant association between serum vitamin D and LL-37 levels (Supplementary Fig. 2a,b).

**Inflammatory markers CRP, IL-6, and PCT.** The inflammatory response plays a crucial role in COVID-19. We therefore determined serum levels of the inflammatory markers IL-6, CRP, and procalcitonin. CRP is an acute-phase plasma protein produced in the liver. Serum CRP levels above 100 mg/l are indicative of systemic

	Group 1	Group 2	Group 3	Group 4	Group 5	Total average	Reference range
Severity of COVID-19	Asymptomatic	Mild symptoms	Not invasively ventilated	Mechanical ventilated	Deceased		
WHO score	1	2–4	5–6	7–9	10		
N	10	13	26	13	16	78	
Age	52	63	61	60	68	62	
Male : female	7:3	6:7	13:13	8:5	8:8	42:36	
LL-37 [ng/ml]	86.6	71.2	64.7	57.4	68.9	68.2	
LL-37/leukocyte count	81	20	12	8	8	21	
LL-37/lymphocyte count	99	94	113	61	112	99	
25-HCC [ $\mu$ g/l]	-20	-21	-26	-16	-22	-22	30–70
1,25-DHCC [ng/l]	43.8	36.9	48.3	51.4	48.3	46.5	19.9–79.3
CRP [mg/l]	+59.2	+61.0	+115.2	+92.2	+155.6	+102.6	<5.0
IL-6 [ng/l]	+38.9	+35.9	+90.0	+284.3	+291.1	+148.4	<8.0
Procalcitonin [ $\mu$ g/l]	+0.1	+0.1	+0.5	+0.7	+1.0	+0.6	<0.1
LDH [U/l]	+276	+264	+358	+446	+333	+355	<250
Leukocytes [ $\times 10^9$ /l]	4.7	6.6	7.6	9.2	11.0	10.5	4.4–11.3
Lymphocyte count [ $\times 10^9$ /l]	1.2	-1.1	1.3	1.2	-0.7	-1.1	1.2–3.5
IgG [g/l]	10.3	11.0	9.7	12.1	10.4	10.5	7.0–16.0
IgA [g/l]	1.9	2.2	2.3	2.9	2.2	2.3	0.7–4.0
IgM [g/l]	1.1	1.1	0.9	1.4	1.0	1.1	0.4–2.3
ASAT [U/l]	+59 (m) 26 (f)	49 (m) +51 (f)	+50 (m) +65 (f)	+95 (m) +79 (f)	+56 (m) +38 (f)	+56 (m) +55 (f)	<50 (m) <35 (f)
ALAT [U/l]	+58 (m) 18 (f)	+55 (m) +38 (f)	46 (m) +35 (f)	+126 (m) +133 (f)	23 (m) 26 (f)	+60 (m) +46 (f)	<50 (m) <35 (f)
Gamma-GT [U/l]	+78 (m) +42 (f)	+98 (m) +51 (f)	+181 (m) +73 (f)	+382 (m) +387 (f)	+80 (m) +102 (f)	+174 (m) +116 (f)	<60 (m) <40 (f)
Creatinine [mg/dl]	+1.5 (m) 0.6 (f)	+2.8 (m) 0.6 (f)	+1.6 (m) +1.3 (f)	1.1 (m) +1.2 (f)	+1.5 (m) +1.0 (f)	+1.6 (m) +1.0 (f)	0.5–1.1 (m) 0.5–0.9 (f)
Apolipoprotein A-1 [mg/dl]	118 (m) -106 (f)	-94 (m) 113 (f)	-87 (m) -91 (f)	-72 (m) -92 (f)	-84 (m) -106 (f)	-90 (m) -100 (f)	104–202 (m) 108–225 (f)
Apolipoprotein B [mg/dl]	105 (m) 108 (f)	97 (m) 98 (f)	106 (m) 83 (f)	94 (m) 88 (f)	79 (m) 95 (f)	97 (m) 91 (f)	66–133 (m) 60–117 (f)
Apolipoprotein B/A-1	1.01	0.95	1.30	1.61	1.16	1.31	
Triglycerides [mg/dl]	174	164	172	+227	152	176	<200
Cholesterol [mg/dl]	185	163	155	158	156	161	<200
HDL [mg/dl]	-38 (m) -33 (f)	-30 (m) -39 (f)	-32 (m) -34 (f)	-23 (m) -29 (f)	-35 (m) 46 (f)	-32 (m) -37 (f)	>40 (m) >45 (f)
LDL [mg/dl]	121	103	101	76	92	98	<150
Chol./HDL-Chol. quotient	+5.5	4.9	+6.7	+19.4	5.0	+8.0	<5.1

**Table 1.** Clinical characteristics and laboratory data. The clinical characteristics and laboratory data obtained in the study. The mean values of the groups and the reference ranges are listed. Values below the reference range are marked with a minus, values above with a plus.

high-grade inflammation. In all groups, the mean serum CRP level was above the reference value of 5.0 mg/l. While groups 1 and 2 had the lowest increase in serum CRP level, the value was highest in group 5 (Table 1). We found a positive correlation between serum CRP level and the severity of COVID-19 ( $p=0.03$ ) (Fig. 2g).

IL-6 is a proinflammatory cytokine and a marker of inflammatory processes. Serum IL-6 levels above 150 ng/l are indicative of systemic high-grade inflammation. The mean serum IL-6 level was above the reference value of 8 ng/l in all five groups (Table 1). We found a positive correlation between the serum concentration of IL-6 and the severity of disease progression ( $p<0.001$ ) (Fig. 2f).

The detection of sepsis associated with COVID-19 is of great prognostic and therapeutic importance. Therefore, we determined serum PCT levels. Serum PCT levels above 2  $\mu$ g/ml indicate systemic bacterial infection

Parameter	Coefficient	p-value	Parameter	Coefficient	p-value	Parameter	Coefficient	p-value
Age	0.177	0.121	LDH	<b>0.244</b>	<b>0.032</b>	Gamma-GT	0.191	0.096
Sex	0.038	0.744	Leukocyte count	<b>0.344</b>	<b>0.002</b>	Apo_A1	-0.218	0.055
LL-37	-0.130	0.257	Lymphocyte count	-0.181	0.152	Apo_B	-0.142	0.215
LL-37/leukocyte count ratio	<b>-0.373</b>	<b>&lt;0.001</b>	Creatinin	0.131	0.252	Apo_B/A-1	0.160	0.266
LL-37/lymphocyte count ratio	0.058	0.650	IgG	0.084	0.473	Triglyceride	0.009	0.939
Calcitriol	-0.026	0.834	IgA	0.145	0.212	Cholesterin	-0.161	0.163
Calcidiol	-0.059	0.607	IgM	-0.037	0.746	HDL	-0.058	0.612
CRP	<b>0.340</b>	<b>0.003</b>	ASAT	-0.098	0.395	LDL	<b>-0.248</b>	<b>0.030</b>
IL-6	<b>0.470</b>	<b>&lt;0.001</b>	ALAT	-0.127	0.268	Chol/HDL	-0.034	0.770
Procalcitonin	<b>0.404</b>	<b>0.002</b>						

**Table 2.** Correlation of quantitative factors with the severity of COVID-19. The Spearman correlation of each parameter with COVID-19 severity. Listed are the correlation coefficients and p-values. Significant differences are shown in bold.

and are considered a sign of sepsis. The serum PCT value in group 5 showed the highest increase with a mean value of 0.95 µg/l (Table 1). COVID-19 severity correlated positively with serum PCT levels ( $p = 0.002$ ) (Fig. 2h).

**Lactate dehydrogenase (LDH).** LDH is an enzyme found in all human cells. The serum LDH level correlates with COVID-19 mortality<sup>14</sup>. An increase in serum LDH level above 250 U/l indicates cell death and tissue destruction. Mean serum LDH levels were higher than the reference value in all groups, with the highest mean level in group 4 (Table 1). We found a positive correlation between serum LDH levels and COVID-19 severity ( $p = 0.032$ ) (Fig. 2e).

**Leukocyte and lymphocyte count.** A correlation between white blood cell count and the severity of COVID-19 has been noted in the literature<sup>11</sup>. A change in white blood cell count can have several causes. Bacterial and viral infectious diseases such as COVID-19 can cause both an increase (leukocytosis) and a decrease (leukopenia) in white blood cells. In our study, 18 patients had leukocytopenia, in which the white blood cell count was below the reference value of  $4.4 \times 10^3$  cells/µl. 15 patients had leukocytosis with a white blood cell count above the upper reference value of  $11.3 \times 10^3$  cells/µl. The white blood cell count correlated positively with COVID-19 severity ( $p = 0.02$ ) (Fig. 2i).

A change in lymphocyte count may have multiple causes, including viral infectious diseases such as COVID-19, so we determined absolute lymphocyte counts. Overall, 53% of patients had absolute lymphocytopenia ( $< 1.2 \times 10^9$  cells/l). There was no significant difference between the groups (Supplementary Fig. 1a).

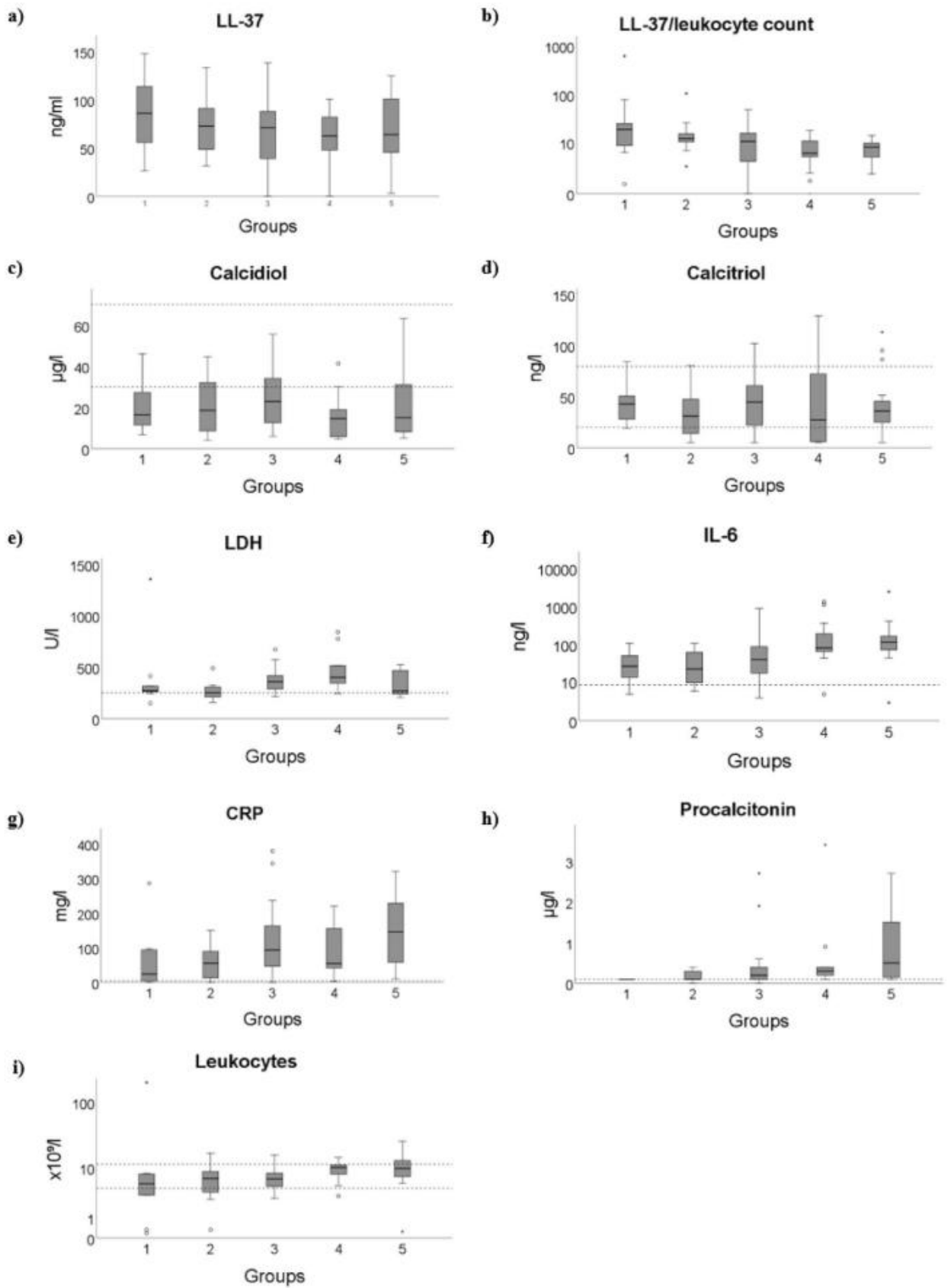
**Immunoglobulins (Ig).** A COVID-19 infection causes the synthesis of specific immunoglobulins against SARS-CoV-2<sup>15</sup>. In this study, we investigated a correlation between total IgM, IgA, and IgG serum levels and the severity of COVID-19. Mean serum IgM, IgA, and IgG levels were within the reference range in all 5 groups. Serum IgM, IgA, and IgG levels showed no correlation with COVID-19 severity (Supplementary Fig. 1c–e).

**Liver function.** Liver disease may also occur with COVID-19<sup>16</sup>. Therefore, we examined ASAT, ALAT, and gamma-GT, the standard biomarkers of liver injury. We found an increase in mean serum ASAT, ALAT, and gamma-GT levels above the reference range (Table 1). There was no significant difference between the groups (Supplementary Fig. 1f–k).

**Renal function.** There is evidence of an association between COVID-19 mortality and impaired renal function<sup>17</sup>. Creatinine is a reliable marker for renal function. The mean serum creatinine level was above the reference ranges in the groups, except for groups 1 and 2 (female) and group 3 (male) (Table 1). There was no correlation between creatinine concentration and COVID-19 severity (Supplementary Fig. 1l–m).

**Lipoproteins.** LL-37 has been shown to bind to various lipids<sup>18</sup>. The binding of LL-37 to lipoproteins represents an important reservoir for LL-37 and can influence serum LL-37 levels. Therefore, we examined the relationship between serum LL-37 and serum lipids. We did not find any correlation between serum LL-37 levels and serum lipid levels (Supplementary Fig. 1r–v).

Elevated total cholesterol, triglyceride, and LDL levels are important risk factors in the development of cardiovascular disease. In contrast, high HDL levels have a beneficial effect. We also examined the association between serum lipids and COVID-19 severity. Mean serum triglyceride, cholesterol, and LDL levels were within the reference range in all groups, whereas mean serum HDL levels were below the reference value in each group. We did not detect any correlation between serum lipid levels and COVID-19 severity (Supplementary Fig. 1r–v).



**Figure 2.** Boxplot of parameters significantly correlated with COVID-19 severity. The median, upper quartile, lower quartile, minimum and maximum are shown. The dashed lines show the reference values. The correlation coefficients and significances are shown in Table 2. Calcidiol and calcitriol are not significantly correlated with COVID-19 severity.

**Apolipoproteins.** Apolipoproteins are the protein component of lipoproteins. Moreover, apolipoprotein A-I (apoA-I) causes inhibition of LL-37 in plasma and attenuates its cytotoxic effect, thereby protecting host cells<sup>19,20</sup>. Therefore, we examined apoA-I and apolipoprotein B (apoB) levels in serum. The mean serum apoA-I levels were below the reference value in groups 3, 4, and 5. Mean serum apoB levels were within the reference range in all groups (Table 1). Serum levels of apoA-I and apoB did not correlate with COVID-19 severity (Supplementary Fig. 1n–q). There was no correlation between LL-37 serum levels and apoA-I and apoB serum levels.

## Discussion

Studies have described the beneficial effect of vitamin D on the disease course of COVID-19, although randomized controlled trials are still pending<sup>21–23</sup>. Cathelicidin, the precursor of LL-37, is strongly upregulated by vitamin D<sup>24,25</sup>. In addition, LL-37 binds with high affinity to the SARS-CoV-2 spike protein, preventing the spike protein from binding to the host cell<sup>9</sup>. LL-37 also binds to host cell ACE2 and prevents the spike protein from binding to the host cell, thereby preventing virus entry<sup>9</sup>. Those studies led us to believe that serum LL-37 levels and COVID-19 severity might be related. Therefore, we examined the serum LL-37 levels of COVID-19 patients. We found a decrease in mean LL-37 serum levels from 87 ng/l in group 1 to 57 ng/l in group 4 (Table 1). Surprisingly, this difference was not statistically significant and there was no statistically significant correlation between serum LL-37 levels and COVID-19 severity.

A recent study compared serum cathelicidin levels of healthy persons and COVID-19 patients<sup>26</sup>. It found a significant difference between healthy and SARS-CoV-2 infected persons but no correlation between serum cathelicidin levels and COVID-19 severity. In our study, we examined serum levels of free (unbound) LL-37. LL-37 is known to bind to lipids and apolipoproteins<sup>18,19</sup>. Because LL-37 is cytotoxic to human cells at higher concentrations, binding of LL-37 to lipids and apolipoproteins may regulate serum levels of LL-37 and help avoid cytotoxicity<sup>19,27</sup>. In addition, the binding of LL-37 may serve as an LL-37 reservoir for rapid LL-37 accumulation in the event of infection. LL-37 is produced by various cells, such as epithelial cells, and by white blood cells in response to infection and after stimulation with vitamin D<sup>28,29</sup>. Hence, serum LL-37 levels are also dependent on leukocyte count, and leukocyte count varies during a COVID-19 infection. Therefore, we calculated serum LL-37 levels as a function of leukocyte count. The ratio indicates how much LL-37 is produced per leukocyte. LL-37 is part of the innate immune system, and the release of LL-37 and the LL-37/leukocyte count ratio are indicators of the activity of the innate immune system. We found a highly significant inversely proportional correlation between the LL-37/leukocyte count ratio and the severity of COVID-19. Since blood samples had been collected at the beginning of the inpatient stay, the LL-37/leukocyte count ratio could indicate a greater likelihood of a severe course of COVID-19 early. In our study population, the mean LL-37/leukocyte count ratio was less than 10 in the mechanical ventilated and deceased patients (groups 4 and 5, Table 1). Our results provide evidence that the LL-37/leukocyte count ratio could be used as a marker for early prognosis of the COVID-19 severity.

Because white blood cells are recruited from vessels to extravascular inflamed tissues, local extravascular concentrations of LL-37 may differ from serum LL-37 levels. In addition, LL-37 is released by neutrophil degranulation, and the local LL-37 concentration may be much higher<sup>30</sup>. During the course of COVID-19, some patients develop severe pneumonia, and leukocytes are recruited to the airways and lungs<sup>31</sup>. Granulocytes and macrophages locally secrete large amounts of LL-37, and local LL-37 levels in the airways and lungs may differ from serum LL-37 levels. Examination of LL-37 concentrations in the broncho-alveolar lavage fluid (BALF) of COVID-19 patients may reveal a correlation between LL-37 levels and COVID-19 severity. The presence of LL-37 in BALF is mainly due to the degranulation of neutrophil granulocytes. This process means that activated leukocytes are surrounded by a gradient of cathelicidins at the site of infection. Because pneumonia in COVID-19 patients is associated with massive mucus production with leukocytes<sup>32,33</sup>, it is likely that high concentrations of LL-37 are present in the BALF of COVID-19 patients. As a comparison, the LL-37 concentration of 30 µg/ml in BALF of cystic fibrosis patients is sixfold higher than an LL-37 concentration of 5 µg/ml in BALF of healthy individuals<sup>34</sup>. In addition, a significant correlation has been found between the concentration of LL-37 in nasal secretions and the severity of acute bronchiolitis in hospitalized infants and young children<sup>35</sup>.

COVID-19 has a mortality rate that is currently higher in northern latitudes above 35°<sup>36</sup>. Latitude 35° north is the latitude above which most people do not receive sufficient sunlight in winter to maintain adequate vitamin D levels<sup>36</sup>. Vitamin D could thus have a beneficial effect on COVID-19 severity. Therefore, we examined the serum vitamin D levels of COVID-19 patients in relation to the severity of COVID-19. We found no correlation between serum vitamin D levels and COVID-19 severity. Some studies support our findings but others do not. A recent study showed that low calcidiol levels in hospitalized patients with COVID-19 were associated with severe disease and increased ICU admission and mortality<sup>13</sup>. The results of a pilot study in Spain suggest that vitamin D supplementation may reduce disease severity<sup>52</sup>. In contrast, a retrospective cohort study of 231 patients found that serum calcidiol levels were not significant in predicting mortality in patients with SARS-CoV-2<sup>37</sup>. Another cohort study suggested a similar risk of mortality in COVID-19, independent of vitamin D concentration<sup>38</sup>. Further interventional studies are needed on the potential beneficial effect of vitamin D on COVID-19 severity.

Vitamin D has been shown to upregulate the CAMP gene encoding LL-37 and stimulate LL-37 production<sup>39</sup>. This upregulation suggests a positive relationship between serum vitamin D and serum LL-37 levels. Nevertheless, we found no correlation between serum vitamin D and serum LL-37 levels. Again, this finding may be explained by the binding of LL-37 to serum lipids and apolipoproteins, or because we measured free (unbound) serum LL-37 levels.

Measurement of calcidiol, the precursor of the vitamin D hormone (calcitriol), is recommended for assessing vitamin D deficiency. In our study, all 5 patient groups showed a deficiency of calcidiol. In contrast, mean calcitriol concentrations were within the normal range (Table 1). In recent years, vitamin D deficiency has been very present in the media in Germany, and calcitriol intake is common. Because we did not ascertain whether

our patients had taken calcitriol supplements before their hospitalization, we cannot exclude a supplemental calcitriol intake as a reason for the calcidiol deficiency and the normal serum calcitriol levels of our study population. However, the discrepancy could arise from inaccuracy in the current reference values for calcidiol and calcitriol. New studies may be needed to determine the validity of the stated reference values.

Studies have already shown an association between age and COVID-19 severity. The older the patient, the higher the risk of a more severe course of COVID-19 and mortality<sup>40,41</sup>. In general, older patients have a weaker immune system and are more likely to have preexisting conditions than younger patients. Surprisingly, we found no correlation between age and COVID-19 severity (Table 2). However, the mean age of all our groups was comparatively high, ranging between 52 and 68 (Table 1). Potentially, older asymptomatic COVID-19 patients or older COVID-19 patients with mild symptoms were hospitalized out of caution, in contrast to younger COVID-19 patients, who were not concerned about a severe course of COVID-19 and did not go to the hospital.

Determination of inflammatory markers may be helpful in assessing the severity and prognosis of COVID-19. CRP is elevated in acute inflammatory processes, which are common in SARS-CoV-2 infections. We found a positive correlation between serum CRP levels and COVID-19 severity (Table 2). We found the highest average serum CRP levels in patient groups 3, 4, and 5 (Table 1). All patients in those groups required ventilation and some died from COVID-19. In particular, the patients who died, group 5, had the highest serum CRP levels, with a mean serum CRP value of more than 156 mg/l, indicating high-grade systemic inflammation. A recent study showed similar results and that high serum CRP levels were associated with a more severe disease course in COVID-19 patients<sup>42</sup>. Our results confirm that serum CRP level is an important marker for early detection of severe COVID-19 disease and timely intensive medical intervention.

In our study, COVID-19 severity correlated positively with serum levels of IL-6 (Table 2), and groups 4 and 5 had mean serum IL-6 levels above 150 ng/l (Table 1). Serum IL-6 levels above 150 ng/l are indicative of severe inflammation. A recent study shows that serum IL-6 levels can effectively assess the severity of COVID-19 and predict disease progression in patients<sup>43</sup>. That finding confirms our findings and highlights the importance of serum IL-6 as an indicator of disease severity. Regular monitoring of inflammatory parameters IL-6 and CRP is recommended<sup>44</sup> and clinical studies assessed a possible therapeutic benefit of an IL-6 receptor blockade in COVID-19<sup>45,46</sup>.

We demonstrated a positive correlation between serum PCT levels and COVID-19 severity (Table 2). A recent study demonstrated higher serum PCT levels in patients who required intensive care<sup>47</sup>. In our study, the mean serum PCT concentration was less than 2.0 µg/l in all groups (Table 1). Values above 2.0 µg/l indicate systemic bacterial infection. Values between 0.5 and 2.0 µg/l are considered pathological but are in the borderline range where systemic, bacterial infection can neither be reliably diagnosed nor excluded. In another study, PCT concentrations between 2 µg/l and 0.5 µg/l were detected in COVID-19 patients<sup>43</sup>. Thus, concurrent bacterial involvement in addition to infection with SARS-CoV-2 may occur but does not seem to be the rule.

Pneumonia and pulmonary fibrosis are common findings in severe COVID-19 cases<sup>14</sup> and are associated with tissue destruction and cell death. Studies have shown that an increase in serum LDH level is associated with severe COVID-19 and increased mortality<sup>14,48</sup>. In our study, the mean serum LDH level was above the reference range of 250 U/l in all 5 groups. We found a significant correlation between serum LDH levels and COVID-19 severity. In a previous study, we demonstrated an increase in serum LDH levels in moderate and severe courses of COVID-19 above 400 U/l<sup>48</sup>. In the current study, only group 4 achieved a comparably high mean serum LDH level. The mean serum LDH levels of the other groups were below 400 U/l. The difference in serum LDH levels between the two studies may be explained by improved treatment options. Treatment with dexamethasone, which has an anti-inflammatory effect, has been shown to reduce the extent of ensued airway and lung inflammation and mortality in COVID-19 patients requiring oxygen supplementation<sup>49</sup>.

In addition to markers of inflammation, the white blood cell count can also be an important indicator of infections. Leukocytopenia can occur when the consumption of leukocytes to ward off the infection outweighs the new synthesis of leukocytes in the bone marrow. Leukocytosis can be caused by lymphocytosis or granulocytosis as a cytokine-induced immune response to viral or bacterial infection. The COVID-19 patients of our study had both leukocytopenia and leukocytosis. The white blood cell count correlated positively with COVID-19 severity. Our findings are in line with a recent study that found a positive correlation between white blood cell count and disease severity<sup>11</sup>: Patients with a severe course of COVID-19 had leukocytosis more frequently than patients with a mild course<sup>11</sup>. Recently, the white blood cell count of 1099 Chinese patients with COVID-19 was investigated and leukopenia was found in 34% of the cases<sup>50</sup>. These results support our findings that both leukocytopenia and leukocytosis can occur in patients with COVID-19.

In our study, in addition to CRP, IL-6, LDH, and leukocyte count, we identified the ratio of LL-37 to leukocyte count as another prognostic laboratory parameter that correlates with COVID-19 severity. All parameters were determined on days 1–3 after hospitalization. Severity grading was performed after recovery from COVID-19 or patient death. All parameters, CRP, IL-6, LDH, leukocyte count, and LL-37/leukocyte count, can be considered early prognostic parameters. Currently, no decision limits have been defined for the parameters, e.g., limits above which CRP concentration or below which LL-37/leukocyte ratio patients will die. Without decision limits, it is not possible to assess which parameter correctly predicts the course of COVID-19 more often. Therefore, their prognostic significance cannot be compared. Further, each parameter has a different meaning. CRP and IL-6 are inflammatory markers reflecting the extent of the systemic proinflammatory response. Leukocytes play a central role in defense against infection and leukocyte production is generally stimulated during infection. However, it can also decrease due to consumption during the course of infection. LDH, in turn, reflects the extent of cell and tissue damage. LL-37 is part of the innate immune system, and the release of LL-37 and the LL-37/leukocyte count ratio indicate the activity of the innate immune system. Because the parameters indicate different things, we advise considering all the parameters.

## Limitations

In our study, serum LL-37 levels of COVID-19 patients, but not of healthy subjects were compared. Therefore, the assessment of serum LL-37 levels is limited since no reference values for serum LL-37 exist. In particular, the comparison of serum LL-37 levels of healthy subjects with severely ill COVID-19 patients would have been interesting. Furthermore, the LL-37 ELISA detects LL-37 but also the precursor molecule human cathelicidin. Therefore, it is not possible to distinguish between active LL-37 and inactive human cathelicidin. However, human cathelicidin should be converted to LL-37 upon release<sup>5</sup>. Another limitation of our study is that the severity of COVID-19 disease was assessed without considering patients' preexisting conditions. A study suggest that preexisting conditions may have an impact on mortality<sup>31</sup>. In our study, blood samples were collected at the beginning of the inpatient stay. A longitudinal study with consecutive blood samples would provide further important insights. Furthermore, we did not differentiate between virus variants and subvariants. Our study was conducted before the delta-variant of SARS-CoV-2 became widespread.

## Conclusions

In our study, we found neither a significant correlation of LL-37 or vitamin D serum levels and severity of COVID-19 nor a significant correlation of vitamin D with LL-37 serum levels. However, we uncovered important aspects for investigating the relevance of LL-37 in the context of COVID-19 disease. LL-37 is produced by granulocytes and released at the site of inflammation. Therefore, the analysis of LL-37 in BALF rather than in serum seems critical. Since LL-37 is produced by granulocytes, we determined serum LL-37 levels as function of leukocyte count. The LL-37/leukocyte count ratio correlates highly significantly inversely proportional with the severity of COVID-19. Our results indicate that the progression of COVID-19 could be assessed using the LL-37/leukocyte count ratio as an early marker at the beginning of an inpatient stay.

## Data availability

The datasets analysed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Received: 23 March 2022; Accepted: 23 May 2022

Published online: 08 June 2022

## References

- Gil, Á., Plaza-Diaz, J. & Mesa, M. D. Vitamin D: Classic and novel actions. *Ann. Nutr. Metab.* **72**(2), 87–95 (2018).
- Miller, J. & Gallo, R. L. Vitamin D and innate immunity. *Dermatol. Ther.* **23**(1), 13–22 (2010).
- Wang, T. T. et al. Cutting edge: 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> is a direct inducer of antimicrobial peptide gene expression. *J. Immunol.* **173**(5), 2909–2912 (2004).
- Yim, S., Dhawan, P., Ragunath, C., Christakos, S. & Diamond, G. Induction of cathelicidin in normal and CF bronchial epithelial cells by 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>. *J. Cystic Fibrosis: Official J. Eur. Cystic Fibrosis Soc.* **6**(6), 403–410 (2007).
- Sørensen, O. E. et al. Human cathelicidin, hCAP-18, is processed to the antimicrobial peptide LL-37 by extracellular cleavage with proteinase 3. *Blood* **97**(12), 3951–3959 (2001).
- Fabisiaik, A., Murawska, N. & Fichna, J. LL-37: Cathelicidin-related antimicrobial peptide with pleiotropic activity. *Pharmacol. Rep.* **68**(4), 802–808 (2016).
- Majewski, K., Kozłowska, E., Zelechowska, P. & Brzezińska-Błaszczyk, E. Serum concentrations of antimicrobial peptide cathelicidin LL-37 in patients with bacterial lung infections. *Central Eur. J. Immunol.* **43**(4), 453–457 (2018).
- Mansbach, J. M. et al. Serum LL-37 levels associated with severity of bronchiolitis and viral etiology. *Clin. Infect. Dis.* **65**(6), 967–975 (2017).
- Wang, C. et al. Human cathelicidin inhibits SARS-CoV-2 infection: Killing two birds with one stone. *ACS Infect. Dis.* **7**(6), 1545–54 (2021).
- Marshall, J. C. et al. A minimal common outcome measure set for COVID-19 clinical research. *Lancet Infect. Dis.* **20**(8), e192–e197 (2020).
- Yoo, E. H. et al. Comprehensive laboratory data analysis to predict the clinical severity of coronavirus disease 2019 in 1952 patients in Daegu, Korea. *Ann Lab Med.* **42**(1), 24–35 (2022).
- Li, X. et al. Risk factors for severity and mortality in adult COVID-19 inpatients in Wuhan. *J. Allergy Clin Immunol.* **146**(1), 110–118 (2020).
- Vasheghani, M. et al. The relationship between serum 25-hydroxyvitamin D levels and the severity of COVID-19 disease and its mortality. *Sci. Rep.* **11**(1), 17594 (2021).
- Yan, L. et al. An interpretable mortality prediction model for COVID-19 patients. *Nat. Mach. Intell.* **2**(5), 283–288 (2020).
- Meinberger, D. et al. Analysis of IgM, IgA, and IgG isotype antibodies Directed against SARS-CoV-2 spike glycoprotein and ORF8 in the course of COVID-19. *Sci. Rep.* **11**(1), 8920 (2021).
- Lei, F. et al. Longitudinal association between markers of liver injury and mortality in COVID-19 in China. *Hepatology* **72**(2), 389–398 (2020).
- Bezerra, R. et al. Outcomes of critically ill patients with acute kidney injury in COVID-19 infection: An observational study. *Ren Fail.* **43**(1), 911–918 (2021).
- Sørensen, O., Bratt, T., Johnsen, A. H., Madsen, M. T. & Borregaard, N. The human antibacterial cathelicidin, hCAP-18, is bound to lipoproteins in plasma. *J. Biol. Chem.* **274**(32), 22445–22451 (1999).
- Wang, Y., Johansson, J., Agerberth, B., Jörnvall, H. & Griffiths, W. J. The antimicrobial peptide LL-37 binds to the human plasma protein apolipoprotein A-I. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **18**(5), 588–589 (2004).
- Zhang, G. et al. Analysis of clinical characteristics and laboratory findings of 95 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a retrospective analysis. *Respir. Res.* **21**(1), 74 (2020).
- AlSafar, H. et al. COVID-19 disease severity and death in relation to vitamin D status among SARS-CoV-2-positive UAE residents. *Nutrients.* **13**(5), 1714 (2021).
- Sharun, K., Tiwari, R. & Dhama, K. COVID-19 and sunlight: Impact on SARS-CoV-2 transmissibility, morbidity, and mortality. *Ann. Med. Surg. (Lond.)* **66**, 102419 (2021).
- Ricci, A. et al. Circulating Vitamin D levels status and clinical prognostic indices in COVID-19 patients. *Respir. Res.* **22**(1), 76 (2021).

24. Gombart, A. F., Borregaard, N. & Koefler, H. P. Human cathelicidin antimicrobial peptide (CAMP) gene is a direct target of the vitamin D receptor and is strongly up-regulated in myeloid cells by 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>. *FASEB J.* **19**(9), 1067–1077 (2005).
25. Liu, P. T. *et al.* Convergence of IL-1beta and VDR activation pathways in human TLR2/1-induced antimicrobial responses. *PLoS ONE* **4**(6), e5810 (2009).
26. Adham, Z. S. & Al-Ghurabi, B. H. Serum level of cathelicidin in Covid-19 patients in relation with oral health. *J. Res. Med. Dent. Sci.* **9**(7), 85 (2021).
27. Svensson, D., Lagerstedt, J. O., Nilsson, B. O. & Del Giudice, R. Apolipoprotein A-I attenuates LL-37-induced endothelial cell cytotoxicity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **493**(1), 71–76 (2017).
28. Yim, S., Dhawan, P., Ragunath, C., Christakos, S. & Diamond, G. Induction of cathelicidin in normal and CF bronchial epithelial cells by 1,25-dihydroxyvitamin D(3). *J. Cyst. Fibros.* **6**(6), 403–410 (2007).
29. Liu, P. T. *et al.* Toll-like receptor triggering of a vitamin D-mediated human antimicrobial response. *Science* **311**(5768), 1770–1773 (2006).
30. Bowdish, D. M. *et al.* Impact of LL-37 on anti-infective immunity. *J. Leukoc. Biol.* **77**(4), 451–459 (2005).
31. Alon, R. *et al.* Leukocyte trafficking to the lungs and beyond: lessons from influenza for COVID-19. *Nat. Rev. Immunol.* **21**(1), 49–64 (2021).
32. Liu, Y. *et al.* Mucus production stimulated by IFN- $\alpha$  signaling triggers hypoxia of COVID-19. *Cell Res.* **30**(12), 1078–1087 (2020).
33. Meyerholz, D.K., Reznikov, L.R. Influence of SARS-CoV-2 on airway mucus production: A review and proposed model. *Vet Pathol.* 3009858211058837 (2021).
34. Chen, C. I., Schaller-Bals, S., Paul, K. P., Wahn, U. & Bals, R. Beta-defensins and LL-37 in bronchoalveolar lavage fluid of patients with cystic fibrosis. *J. Cyst. Fibros.* **3**(1), 45–50 (2004).
35. Papadaki, M., Marmarinos, A., Tsoia, M., Gourgiotis, D. & Soldatou, A. Cathelicidin levels in nasal secretions are associated with the severity of acute bronchiolitis. *Pediatric Pulmonol.* **56**(6), 1673–1680 (2021).
36. Rhodes, J. M., Subramanian, S., Laird, E. & Kenny, R. A. Editorial: low population mortality from COVID-19 in countries south of latitude 35 degrees North supports vitamin D as a factor determining severity. *Aliment Pharmacol. Ther.* **51**(12), 1434–1437 (2020).
37. Al-Jarallah, M. *et al.* In-hospital mortality in SARS-CoV-2 stratified by serum 25-hydroxy-vitamin D levels: A retrospective study. *J. Med. Virol.* **93**(10), 5880–5885 (2021).
38. Zafar, M., Karkhanis, M., Shahbaz, M., Khanna, A., Barry, L., Alam, S., *et al.* Vitamin D levels and mortality with SARS-COV-2 infection: a retrospective two-centre cohort study. *Postgrad Med J.* (2021).
39. Wang, T.-T. *et al.* Cutting Edge: 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> Is a Direct Inducer of Antimicrobial Peptide Gene Expression. *J. Immunol.* **173**(5), 2909–2912 (2004).
40. Izcovich, A. *et al.* Prognostic factors for severity and mortality in patients infected with COVID-19: A systematic review. *PLoS ONE* **15**(11), e0241955 (2020).
41. Goel, H. *et al.* A systematic review of clinical and laboratory parameters of 3000 COVID-19 cases. *Obstet. Gynecol. Sci.* **64**(2), 174–189 (2021).
42. Chen, W. *et al.* Plasma CRP level is positively associated with the severity of COVID-19. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* **19**(1), 18 (2020).
43. Liu, F. *et al.* Prognostic value of interleukin-6, C-reactive protein, and procalcitonin in patients with COVID-19. *J. Clin. Virol.* **127**, 104370 (2020).
44. Torsten Feldt, W.G., Heim, K., Lübbert, C., Mikolajewska, A., Michaela Niebank, F.P., Rothfuss, K., Schmiedel, S., Miriam S. Stegemann, August Stich, I.T., Weber, S., Wolf T. Notes on the identification, diagnosis and treatment of patients with COVID-19. Robert Koch-Institut, Ständiger Arbeitskreis der Kompetenz- und Behandlungszentren für Krankheiten durch hochpathogene Erreger. 28 (2021).
45. Torsten Feldt, W.G., Heim, K., Lübbert, C., Mikolajewska, A., Niebank, M., Pfäfflin, F., Rothfuss, K., Schmiedel, S., Miriam S. Stegemann, Stich, A., Trebesch, I., Weber, S., Wolf, T. Hinweise zu Erkennung, Diagnostik und Therapie von Patienten mit COVID-19. In: Erreger SAdK-uBfKdh, editor (2021).
46. Salama, C. *et al.* Tocilizumab in Patients Hospitalized with Covid-19 Pneumonia. *N. Engl. J. Med.* **384**(1), 20–30 (2021).
47. Broman, N. *et al.* IL-6 and other biomarkers as predictors of severity in COVID-19. *Ann. Med.* **53**(1), 410–412 (2021).
48. Denise Meinberger, M.K., Roth, A., Hermes, G., Stemler, J., Oliver A. Cornely, Streichert, T., Andreas R. Klatt. Analysis of IgM, IgA, and IgG Isotype Antibodies Directed Against SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein and ORF8 in the Course of COVID-19. *Research Square.* (2021).
49. Horby, P. *et al.* Dexamethasone in Hospitalized Patients with Covid-19. *N. Engl. J. Med.* **384**(8), 693–704 (2021).
50. Guan, W.-j. *et al.* Clinical characteristics of coronavirus disease 2019 in China. *N. Engl. J. Med.* **382**(18), 1708–20 (2020).
51. Docherty, A. B. *et al.* Features of 20 133 UK patients in hospital with covid-19 using the ISARIC WHO clinical characterisation protocol: Prospective observational cohort study. *BMJ* **369**, m1985 (2020).
52. Entrenas Castillo, M. *et al.* Effect of calcifediol treatment and best available therapy versus best available therapy on intensive care unit admission and mortality among patients hospitalized for COVID-19: A pilot randomized clinical study. *J. Steroid. Biochem. Molecul. Biol.* <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2020.105751> (2020).

## Author contributions

Conceptualization and supervision: A.K., T.S.; Methodology: M.K., G.H., D.M., T.S. and A.K.; Sample collection: M.K., D.M., G.H., J.S., and O.C.; Formal analysis: M.K., G.H., T.S., and A.K.; Investigation: M.K., G.H., D.M., T.S. and A.R.; Writing—first draft preparation: M.K., A.K., T.S., A.R.; Writing—review and editing: M.K., G.H., D.M., A.R., J.S., O.C., A.K., and T.S.

## Funding

Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.

## Competing interests

The authors declare no competing interests.

## Additional information

**Supplementary Information** The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41598-022-13260-8>.

**Correspondence** and requests for materials should be addressed to A.R.K.

**Reprints and permissions information** is available at [www.nature.com/reprints](http://www.nature.com/reprints).

**Publisher's note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



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

© The Author(s) 2022

## 4. Diskussion

### 4.1.1. Ziel 1: Untersuchung des Zusammenhangs zwischen der LL-37-Serumkonzentration und dem Schweregrad von COVID-19

Die COVID-19-Pandemie breitete sich zur Zeit meiner Dissertation weltweit aus und beeinflusste das Leben von Milliarden von Menschen. Die sozioökonomischen und gesundheitlichen Folgen waren gravierend. Das Gesundheitssystem war in vielen Ländern überlastet, was zu Engpässen bei der medizinischen Versorgung und der Triage von Patienten führte. Die Folgen für die Wirtschaft waren beträchtlich: Geschäftsschließungen, Arbeitsplatzverluste und eine allgemeine Verlangsamung der Wirtschaft. Mit Hochdruck wurde an Therapien und Impfstoffen gegen SARS-CoV-2 geforscht, um das Infektionsgeschehen zu kontrollieren. Unter den vielen Therapieansätzen gab es kein Medikament, das schwere Verläufe zuverlässig behandeln konnte. Die Impfkampagnen liefen zunächst schleppend an, bevor sie tatsächlich zur Eindämmung der Pandemie beitrugen. Impfstoffe waren nicht flächendeckend verfügbar, es gibt Kontraindikationen gegen die Impfstoffe und manche Menschen zeigten keine Bereitschaft, sich impfen zu lassen. Zudem können geimpfte Personen trotzdem an COVID-19 erkranken und sind für andere Menschen ansteckend. Vor diesem Hintergrund verfolgte ich mit meiner Studie das Ziel, in der akuten Phase der Pandemie einen Beitrag zur Bekämpfung von COVID-19 zu leisten. Dazu untersuchte ich das diagnostische Potential von LL-37 im Zusammenhang mit COVID-19. LL-37 bindet mit hoher Affinität an das S-Protein von SARS-CoV-2 und verhindert so dessen Eintritt in die Wirtszelle<sup>76,96</sup>. Darüber hinaus bindet LL-37 auch an den ACE2-Rezeptor der Wirtszelle und verhindert das Andocken des S-Proteins von SARS-CoV-2 und den Viruseintritt<sup>96</sup>. LL-37 greift somit in den Pathomechanismus von COVID-19 ein und hat eine protektive Wirkung auf den Wirt. Studien belegen eine antibakterielle Wirkung von LL-37, aber auch antivirale Eigenschaften konnten nachgewiesen werden. Bei COVID-19 wäre sowohl eine direkte inhalative therapeutische Anwendung von LL-37 als auch eine indirekte Erhöhung über Vitamin D vorstellbar.

Studien haben gezeigt, dass hohe Vitamin-D-Konzentrationen den Krankheitsverlauf von COVID-19 positiv beeinflussen können. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass Vitamin D die Expression des CAMP-Gens stimuliert, das für das antimikrobielle Peptid LL-37 kodiert. Daraus ergab sich die Frage, ob die LL-37-Serumkonzentration mit dem Schweregrad von COVID-19 korreliert. Dazu wurden 78 Patienten mit COVID-19 je nach Schwere der Erkrankung in 5 Gruppen eingeteilt. Anschließend wurden die LL-37-Serumkonzentrationen sowie weitere Laborparameter bestimmt und auf eine Korrelation mit dem Schweregrad von COVID-19 untersucht. Überraschenderweise fand ich in der Patientenpopulation keine

Korrelation zwischen der LL-37-Serumkonzentration und dem Schweregrad der Erkrankung. Ich fand zwar eine Abnahme der LL-37-Serumkonzentration von 87 ng/l in der asymptomatischen Patientengruppe auf 57 ng/l in der Gruppe mit schweren Symptomen, jedoch war dieser Unterschied statistisch nicht signifikant. Es ist möglich, dass die Gruppengröße bzw. die Varianz innerhalb der Gruppen zu einer unzureichenden Teststärke (Power) geführt hat, sodass ein potentieller Effekt nicht detektiert werden konnte.

In unserer Studie habe ich die LL-37-Konzentration bei COVID-19-Patienten in Abhängigkeit vom Schweregrad verglichen, ohne einen Vergleich mit einer gesunden Kontrollgruppe durchzuführen. Es ist möglich, dass bei einer Infektion mit COVID-19 die angeborene Immunantwort mit der Freisetzung von LL-37 reagiert und die Serumkonzentration im Vergleich zu gesunden Personen erhöht ist. Eine Studie, die den Zusammenhang zwischen LL-37 und der Hyperkoagulation bei COVID-19 untersuchte, zeigte signifikant höhere Serumkonzentrationen von LL-37 bei Patienten mit COVID-19 im Vergleich zu gesunden Probanden <sup>97</sup>. Eine andere Studie zeigte einen Unterschied in der Serum-Cathelicidin-Konzentration zwischen Patienten mit COVID-19 und einer gesunden Kontrollgruppe <sup>98</sup>. Es gibt in der Literatur kaum verlässliche Vergleichswerte von gesunden Menschen, die einen Normbereich der LL-37-Serumkonzentrationen definieren, was die Einordnung der Höhe der ermittelten Werte erschwert.

Der zum Nachweis von LL-37 verwendete ELISA detektiert nicht nur LL-37, sondern auch dessen Vorläufermolekül, das humane Cathelicidin. Somit kann bei den ermittelten Werten nicht zwischen aktiviertem LL-37 und inaktivem Cathelicidin unterschieden werden. Ich kann daher nicht ausschließen, dass bei isolierter Betrachtung des aktivierten LL-37 der Unterschied zwischen den Gruppen signifikant ausgefallen wäre. Zukünftige Studien sollten, falls verfügbar, differenzierende Assays verwenden.

In meiner Studie untersuchte ich die Konzentration von ungebundenem (freiem) LL-37. Es konnte gezeigt werden, dass LL-37 im Blut auch an Lipide und Apolipoproteine gebunden vorkommt <sup>67,99</sup>, wobei die Bindung über den antibakteriellen, C-terminalen Teil von LL-37 vermittelt wird. Lipide und Apolipoproteine könnten somit als Reservoir für LL-37 dienen, das im Falle einer Infektion gezielt freigesetzt werden kann <sup>67</sup>. Da das ELISA-Verfahren ausschließlich freies LL-37 misst, bleiben an Lipide gebundene Anteile unberücksichtigt, was die Interpretation der absoluten Konzentrationen im Serum einschränken kann.

In Studien hat LL-37 bereits eine antivirale Wirkung bei verschiedenen Viruserkrankungen gezeigt. LL-37 hemmt die Virusreplikation von Human Immunodeficiency Virus 1 (HIV-1) <sup>100</sup> und zeigt antivirale Eigenschaften gegenüber Influenza A <sup>101</sup>.

LL-37 wird durch Degranulation aus neutrophilen Granulozyten freigesetzt, daher kann die LL-37-Konzentration im von der Immunreaktion betroffenen Gewebe von der gemessenen

Serumkonzentration abweichen kann. Leukozyten wandern in die Gewebe ein, in denen sich die Entzündungsreaktion hauptsächlich manifestiert. Dort findet die Sekretion von LL-37 aus Granulozyten, Makrophagen und Epithelzellen statt, was zu hohen lokalen Konzentrationen von LL-37 führen kann. Es ist daher möglich, dass eine Korrelation zwischen der Konzentration von LL-37 in der bronchoalveolären Lavage (BAL) und dem Schweregrad von COVID-19 besteht. Das Vorhandensein von LL-37 in der BAL ist hauptsächlich auf aktivierte Leukozyten zurückzuführen, die durch Degranulation neutrophiler Granulozyten Cathelicidin freisetzen. Da die Pneumonie bei COVID-19-Patienten mit einer massiven Schleimproduktion durch Leukozyten einhergeht <sup>102,103</sup>, ist es wahrscheinlich, dass hohe Konzentrationen von LL-37 in der BAL von COVID-19-Patienten auftreten. In einer Studie wurde in der BAL von Mukoviszidose-Patienten eine LL-37-Konzentration von 30 µg/ml gefunden, die sechsmal höher war als in der gesunden Kontrollgruppe (5 µg/ml) <sup>104</sup>. Eine andere Studie zeigte, dass die LL-37-Konzentration im Nasensekret von Säuglingen und Kleinkindern mit akuter Bronchiolitis mit dem Schweregrad der Erkrankung korrelierte <sup>105</sup>. Zusammenfassend war in meiner Studie der Unterschied in der LL-37-Serumkonzentration zwischen den Gruppen 1-5 nicht signifikant. Eine isolierte Betrachtung des aktivierten LL-37 sowie die Berücksichtigung des gebundenen LL-37 könnten jedoch zu signifikanten Ergebnissen führen. Es ist anzunehmen, dass die Messung der LL-37-Konzentration im BAL eine höhere Aussagekraft besitzt als die Messung der Serumkonzentration.

#### **4.1.2. LL-37/Leukozyten-Quotient**

Wie bereits beschrieben, wird LL-37 von verschiedenen Zelltypen gebildet, insbesondere von Epithelzellen und neutrophilen Granulozyten <sup>106</sup>. Ich vermutete daher, dass die Leukozytenzahl einen großen Einfluss auf die LL-37-Konzentration hat. Deshalb betrachtete ich die LL-37-Serumkonzentration in Abhängigkeit von der Leukozytenzahl und bildete den LL-37/Leukozyten-Quotienten. Dieser gibt an, wie hoch die durchschnittliche freigesetzte LL-37-Menge pro Leukozyt im Serum ist. Der LL-37/Leukozyten-Quotient spiegelt die Aktivität des angeborenen Immunsystems wider. Ich fand eine hochsignifikante, inverse Korrelation zwischen dem LL-37/Leukozyten-Quotienten und dem Schweregrad von COVID-19. Da die Blutproben direkt bei der stationären Aufnahme entnommen wurden, erlaubt der LL-37/Leukozyten-Quotient offenbar eine frühe Einschätzung des Schweregrades von COVID-19. Der Quotient lag bei Patienten der Gruppen 1-3 im Durchschnitt bei 28, während Patienten der Gruppen 4 und 5 (maschinell beatmete und verstorbene Patienten) im Mittel einen Quotienten von unter 10 hatten. Die Ergebnisse deuten auf einen Nutzen des LL37/Leukozyten-Quotienten als frühen prognostischen Marker für den Schweregrad von

COVID-19 hin. Aufgrund der hochsignifikanten Korrelation mit dem Schweregrad von COVID-19 zeigt der LL-37/Leukozyten-Quotient als neuer Parameter zur Beurteilung der Aktivierung des angeborenen Immunsystems ein großes Potential für die frühe Detektion schwerer Krankheitsverläufe.

#### **4.1.3. LL-37 als Therapeutikum**

In einer Studie an Mäusen mit Sepsis zeigte LL-37 eine therapeutische Wirksamkeit über drei verschiedene Mechanismen <sup>107</sup>: LL-37 moduliert den Zelltod durch Unterdrückung der Makrophagen-Pyroptose, die proinflammatorische Eigenschaften besitzt. Die Freisetzung von extrazellulären Neutrophilenfallen (NETs) mit bakterizider Wirkung wird durch LL-37 verstärkt. LL-37 stimuliert die Neutrophilen zur Freisetzung von antimikrobiellen Mikrovesikeln (Ektosomen), die den pathologischen Zustand der Sepsis verbessern. Die virale Sepsis ist eine Komplikation von COVID-19 und daher von diagnostischer und therapeutischer Relevanz <sup>108</sup>. Vor diesem Hintergrund sollte die Rolle von LL-37 bei der viralen Sepsis von COVID-19 untersucht werden, um den Nutzen einer LL-37-Gabe zu evaluieren. Bisher gibt es keine zugelassene klinische Anwendung von LL-37 als Therapeutikum. Die Tatsache, dass LL-37 vom menschlichen Körper selbst produziert wird, könnte die Entwicklung als inhalativ applizierbarer Wirkstoff unterstützen, insbesondere im Hinblick auf Biokompatibilität <sup>109</sup>. Da SARS-CoV-2 über die Atemwege in den menschlichen Körper gelangt, ist die lokale Applikation von Hemmstoffen in Nase und Lunge entscheidend für die Kontrolle der Virusinfektion. Für eine inhalative Applikationsform wäre LL-37 daher sehr gut geeignet <sup>110</sup>. Denkbar wäre für LL-37 auch eine indirekte Erhöhung über die Gabe von Vitamin D (s. 3.2). Eine kürzlich veröffentlichte placebokontrollierte Studie untersuchte die orale Applikation von LL-37 über genetisch modifizierte *Lactococcus lactis* bei hospitalisierten COVID-19-Patienten und zeigte, dass eine frühe Gabe die Zeit bis zur negativen PCR signifikant verkürzte, ohne dass schwerwiegende Nebenwirkungen auftraten <sup>111</sup>.

#### **4.2. Ziel 2: Untersuchung eines möglichen Zusammenhangs zwischen der Vitamin-D-Konzentration, der LL-37-Serumkonzentration und dem Schweregrad von COVID-19**

Die Sterblichkeitsrate von COVID-19 steigt oberhalb von 35° nördlicher Breite an. Der 35. nördliche Breitengrad gilt als der Breitengrad, über dem die meisten Menschen im Winter nicht genügend Sonnenlicht erhalten, um ausreichende Vitamin-D-Konzentrationen aufrechtzuerhalten. Vor diesem Hintergrund erscheint ein Zusammenhang zwischen Vitamin D und dem Schweregrad von COVID-19 möglich. In meiner Studie untersuchte ich daher den Zusammenhang zwischen der Vitamin-D-Serumkonzentration und dem

Schweregrad der Erkrankung bei COVID-19-Patienten. Ich fand jedoch keine Korrelation. Die Studienlage ist ambivalent, einige Studien unterstützen meine Ergebnisse, andere hingegen nicht. Eine Studie aus dem Jahr 2021 zeigte, dass niedrige Calcidiol-Konzentrationen bei hospitalisierten Patienten mit einem schwereren Krankheitsverlauf, mehr Aufhalten auf der Intensivstation und einer höheren Mortalitätsrate assoziiert waren <sup>112</sup>. Eine in Spanien durchgeführte Pilotstudie ergab Hinweise darauf, dass eine Vitamin-D-Supplementierung den Schweregrad von COVID-19 verringern kann <sup>113</sup>. Im Gegensatz dazu wurde in einer retrospektiven Kohortenstudie mit 231 COVID-19 Patienten keine Korrelation zwischen den Calcidiol-Konzentrationen und der Mortalität von COVID-19 gefunden <sup>114</sup>. In einer anderen Kohortenstudie war die Mortalitätsrate von COVID-19 Patienten unabhängig von ihren Vitamin-D-Konzentrationen <sup>115</sup>.

Vitamin D kann direkt die Synthese von LL-37 stimulieren <sup>116</sup>. Vitamin D kann auch den Abbau von LL-37 hemmen, indem es die Enzyme hemmt, die für den Abbau von LL-37 verantwortlich sind. Diese Hochregulation deutet auf eine positive Beziehung zwischen Serum-Vitamin D und LL-37-Serumkonzentrationen hin. Ich fand jedoch keine Korrelation zwischen Serum-Vitamin D und LL-37-Serumkonzentrationen. Die Expression von LL-37 ist komplex und wird von verschiedenen Faktoren beeinflusst. Auch genetische, immunologische und entzündliche Prozesse regulieren die Bildung von LL-37, sodass Vitamin D allein nicht ausschlaggebend für die Konzentration von LL-37 ist.

In der Diagnostik kann sowohl die Konzentration von Calcidiol und Calcitriol bestimmt werden. Calcidiol ist die stabile und inaktive Form von Vitamin D, während Calcitriol der aktive Metabolit ist. Die Messung von Calcidiol, also der Vorstufe des Vitamin-D-Hormons (Calcitriol), wird in der klinischen Praxis empfohlen, da die Calcidiol-Konzentration als Indikator für den Vitamin-D-Status im Körper gilt. In meiner Studie wiesen im Durchschnitt alle 5 Patientengruppen einen Calcidiolmangel auf. Die mittleren Calcitriol-Konzentrationen lagen jedoch im Normbereich (Tabelle 1). In den letzten Jahren war das Thema Vitamin-D-Mangel in Deutschland in den Medien sehr präsent, und die Einnahme von Calcitriol ist weit verbreitet. Da nicht erhoben wurde, ob die Patienten vor der stationären Aufnahme Calcitriol-Präparate eingenommen haben, kann ich eine Calcitriol-Einnahme als Ursache für den Calcidiol-Mangel bei normalen Serum-Calcitriol-Konzentrationen der Studienpopulation nicht ausschließen. Ein einmaliger Messzeitpunkt könnte zudem nicht ausreichen, um die immunologische Dynamik der Vitamin-D-Wirkung abzubilden.

### **4.3. Ziel 3: Identifizierung neuer Biomarker zur frühzeitigen Einschätzung des Verlaufs von COVID-19**

#### **4.3.1. Alter und Geschlecht**

Studien haben bereits einen Zusammenhang zwischen dem Alter und dem Schweregrad von COVID-19 gezeigt. Je älter eine Patientin oder ein Patient ist, desto höher ist das Risiko eines schwereren Verlaufs von COVID-19 und der Mortalität<sup>40,117</sup>. Im Allgemeinen haben ältere Patienten ein schwächeres Immunsystem und leiden häufiger an Vorerkrankungen als jüngere Patienten. Überraschenderweise ergab sich im Patientenkollektiv keine Korrelation zwischen dem Alter und dem Schweregrad von COVID-19 (Tabelle 2). Allerdings war das Durchschnittsalter in allen Gruppen relativ hoch und lag zwischen 52 und 68 Jahren (Tabelle 1). Möglicherweise wurden ältere, asymptomatische Patienten aus Vorsicht hospitalisiert, wodurch sich der Alterseffekt im stationären Kollektiv nivellierte.

54 % der Patienten in der Studienpopulation waren Männer und 46 % Frauen, was keinen signifikanten Unterschied zwischen den Geschlechtern darstellt. Dies deckt sich mit Studien, die keine signifikanten geschlechtsspezifischen Unterschiede in der Infektionshäufigkeit fanden<sup>118</sup>. Das Geschlecht der Patienten zeigte in meiner Studie keinen Zusammenhang mit dem Schweregrad von COVID-19. Eine Meta-Analyse kam jedoch zu dem Ergebnis, dass das männliche Geschlecht mit einem schwereren Krankheitsverlauf und einer schlechteren Prognose bei COVID-19 assoziiert ist<sup>119</sup>. Eine Studie zeigte bei männlichen Patienten im Vergleich zu weiblichen Patienten erhöhte Zytokin-Konzentrationen und eine schwächere T-Zell-Antwort, was ein möglicher Erklärungsansatz ist<sup>120</sup>.

#### **4.3.2. Entzündungsmarker**

Die Bestimmung von Entzündungsmarkern kann bei der Beurteilung des Schweregrades und der Prognose von COVID-19 hilfreich sein. CRP ist bei akuten Entzündungsprozessen, wie sie häufig bei SARS-CoV-2-Infektionen auftreten, erhöht. Ich fand eine positive Korrelation zwischen der CRP-Konzentration im Serum und dem Schweregrad von COVID-19 (Tabelle 2). Die höchsten durchschnittlichen Serum-CRP-Konzentrationen fand ich in den Patientengruppen 3, 4 und 5 (Tabelle 1). Alle Patienten dieser Gruppen mussten künstlich beatmet werden und einige von ihnen starben an COVID-19. Die verstorbenen Patienten der Gruppe 5 wiesen die höchsten Serum-CRP-Konzentrationen auf, mit einem durchschnittlichen Serum-CRP-Wert von mehr als 156 mg/l, was die Rolle von CRP als Marker für eine systemische Hyperinflammation unterstreicht. Eine kürzlich durchgeführte Studie zeigte ähnliche Ergebnisse und stellte fest, dass eine hohe CRP-Serumkonzentration mit einem schwereren Krankheitsverlauf bei Patienten mit COVID-19 assoziiert ist<sup>121</sup>. Bereits im frühen

Erkrankungsstadium konnte CRP in Studien eine prognostische Einschätzung der Schwere von COVID-19 liefern <sup>122,123</sup>. Meine Ergebnisse bestätigen, dass die CRP-Serumkonzentration ein wichtiger Marker für die Früherkennung eines schweren Verlaufs von COVID-19 und für die rechtzeitige Einleitung einer intensivmedizinischen Behandlung ist.

In meiner Studie korrelierte der Schweregrad von COVID-19 mit der Serum-IL-6-Konzentration (Tabelle 2). Die Gruppen 4 und 5 wiesen mittlere Serum-IL-6-Konzentrationen von über 150 ng/l auf (Tabelle 1), was auf eine schwere Entzündung hinweist. In einer Studie konnte gezeigt werden, dass die Serum-IL-6-Konzentration ein guter Marker für den Schweregrad von COVID-19 und für die Vorhersage des Krankheitsverlaufs bei Patienten ist <sup>122</sup>. Dies wird durch meine Ergebnisse bestätigt und unterstreicht die Bedeutung von Serum-IL-6 als Indikator für den Schweregrad von COVID-19. Ein regelmäßiges Monitoring der Entzündungsparameter IL-6 und CRP wird vom Robert Koch-Institut empfohlen <sup>124</sup>. In klinischen Studien wurde der mögliche therapeutische Nutzen einer IL-6-Rezeptorblockade bei COVID-19 untersucht. Tocilizumab könnte die Mortalität durch Hemmung eines Zytokinsturms senken <sup>125</sup>. In einer Studie reduzierte Tocilizumab den Bedarf an mechanischer Beatmung und führte kurzfristig zu einer Reduktion der Mortalität <sup>54</sup>. In einer Placebo-kontrollierten Studie mit hospitalisierten COVID-19 Patienten aus verschiedenen Ländern bewirkte Tocilizumab dagegen keine Reduktion der Mortalität <sup>126</sup>. Tocilizumab ist seit Ende 2021 in Deutschland zur Behandlung der COVID-19-Pneumonie zugelassen und wird in der aktuellen S3-Leitlinie bei Patienten mit schwerem Krankheitsverlauf und erhöhtem Sauerstoffbedarf empfohlen <sup>127</sup>.

Ich konnte eine positive Korrelation zwischen den Serum-PCT-Konzentrationen und dem Schweregrad von COVID-19 nachweisen (Tabelle 2). Eine kürzlich durchgeführte Studie zeigte höhere Serum-PCT-Werte bei COVID-19 Patienten, die intensivmedizinisch behandelt werden mussten <sup>123</sup>. In meiner Studie lag die durchschnittliche Serum-PCT-Konzentration in allen Gruppen unter 2,0 µg/l (Tabelle 1). Werte über 2,0 µg/l weisen auf eine systemische bakterielle Infektion hin. Werte zwischen 0,5 und 2,0 µg/l gelten als pathologisch, liegen aber in einem Grenzbereich, in dem eine systemische bakterielle Infektion weder sicher diagnostiziert noch ausgeschlossen werden kann. In einer anderen Studie wurden bei 94,3 % der Patienten mit COVID-19 PCT-Konzentrationen zwischen 0 und 0,5 µg/l gefunden <sup>122</sup>. Eine gleichzeitige bakterielle Beteiligung neben der Infektion mit SARS-CoV-2 kann also vorkommen und deutet auf einen schweren Krankheitsverlauf hin.

Die Regelmedikation der Patienten sowie bereits eingeleitete Therapien gegen COVID-19 können einen Einfluss auf die in meiner Studie erhobenen Parameter haben. Beispielsweise

kann die Behandlung mit Dexamethason und Tocilizumab Entzündungsparameter wie CRP oder PCT verändern <sup>128</sup>.

Pneumonie und Lungenfibrose sind häufige Befunde bei schweren COVID-19-Fällen <sup>86</sup> und werden mit Gewebeerstörung und Zelltod in Verbindung gebracht. Studien haben gezeigt, dass ein Anstieg der LDH-Serumkonzentration mit schwerer COVID-19-Infektion und erhöhter Mortalität assoziiert ist <sup>86,94,129</sup>. In meiner Studie lag die durchschnittliche LDH-Serumkonzentration in allen 5 Gruppen über dem Referenzbereich von 250 U/l. Ich fand eine signifikante Korrelation zwischen der Serum-LDH-Konzentration und dem Schweregrad von COVID-19. In einer früheren Studie wurde ein Anstieg der Serum-LDH-Konzentration über 400 U/l bei mittelschweren und schweren COVID-19-Verläufen nachgewiesen <sup>94</sup>. In der vorliegenden Studie erreichte nur die Gruppe 4 eine vergleichbar hohe mittlere LDH-Serumkonzentration. Die mittleren Serum-LDH-Konzentrationen der anderen Gruppen lagen unter 400 U/l. Der Unterschied in den Serum-LDH-Konzentrationen zwischen den beiden Studien kann durch die verbesserten Behandlungsmöglichkeiten erklärt werden. Es wurde gezeigt, dass die Behandlung mit Dexamethason, das eine entzündungshemmende Wirkung hat, das Ausmaß einer Pneumonie und die Mortalität bei COVID-19-Patienten mit erhöhtem Sauerstoffbedarf reduziert <sup>130</sup>.

### **4.3.3. Leukozyten**

Die Leukozytenzahl ist ein grundlegender laborchemischer Parameter zur Beurteilung immunologischer Veränderungen bei Infektionen. Eine Leukozytopenie kann auftreten, wenn der Verbrauch von Leukozyten zur Infektabwehr die Neusynthese im Knochenmark übersteigt. Eine Leukozytose hingegen entsteht häufig durch eine Lymphozytose oder Granulozytose infolge zytokinvermittelter Aktivierung, wie sie bei viralen oder bakteriellen Infektionen vorkommt.

In der untersuchten Kohorte zeigten sich sowohl Leukozytosen als auch Leukozytopenien bei COVID-19-Patienten. Eine verminderte Leukozytenzahl kann durch virale Suppression der Hämatopoese oder erhöhten Verbrauch infolge der Immunantwort bedingt sein. Demgegenüber kann eine Leukozytose durch zytokinvermittelte Aktivierung des Knochenmarks entstehen, wie sie bei schweren systemischen Immunreaktionen auftreten kann.

In der vorliegenden Analyse fand sich eine positive Korrelation zwischen der Leukozytenzahl und dem Schweregrad der COVID-19-Erkrankung. Dies deutet darauf hin, dass bei schweren Verläufen überwiegend eine Leukozytose auftritt, vermutlich infolge einer ausgeprägten systemischen Inflammationsreaktion.

Meine Ergebnisse stimmen mit einer kürzlich durchgeführten Studie überein, in der eine positive Korrelation zwischen der Anzahl der weißen Blutkörperchen und dem Schweregrad der Erkrankung gefunden wurde <sup>131</sup>: Patienten mit einem schweren Verlauf von COVID-19 hatten häufiger eine Leukozytose als Patienten mit einem leichten Verlauf <sup>131</sup>. Kürzlich wurde die Leukozytenzahl bei 1099 chinesischen COVID-19-Patienten untersucht, wobei in 34 % der Fälle eine Leukopenie festgestellt wurde <sup>132</sup>. Diese Ergebnisse unterstützen meine Befunde, dass bei COVID-19-Patienten sowohl Leukozytopenie als auch Leukozytose auftreten können. Im Rahmen der Diagnostik könnte ein Differentialblutbild mit Berücksichtigung der Leukozyten/Arten weitere Informationen bezüglich des Krankheitsverlaufs liefern. Eine Subgruppe sind die Lymphozyten. Sie dienen der Erkennung und Bekämpfung von Fremdstoffen im Körper, insbesondere von Krankheitserregern. Sie tragen zur spezifischen und unspezifischen Immunabwehr bei und sind für die Produktion von Antikörpern sowie für die zelluläre Immunantwort verantwortlich. In meiner Studie lagen die absoluten Lymphozytenzahlen der Patienten im Durchschnitt unter dem Referenzwert. Diese Ergebnisse deuten auf eine Schwächung des Immunsystems durch SARS-CoV-2 hin. In einer Studie wiesen 33,7 % der hospitalisierten Patienten mit COVID-19 eine Leukozytopenie und sogar 83,3 % eine Lymphozytopenie auf <sup>132</sup>.

#### **4.3.4. Leber- und Nierenschädigung**

Die Biomarker für Leberschäden, ASAT, ALAT und  $\gamma$ GT, lagen bei den Patienten im Durchschnitt deutlich über dem Referenzbereich. Studien haben gezeigt, dass eine schwere COVID-19-Infektion häufig zu Leberschäden führt, die sowohl durch direkte virale Effekte, medikamententoxische Einflüsse als auch systemische Entzündungsreaktionen verursacht werden können <sup>133</sup>. Es wurde jedoch auch gezeigt, dass SARS-CoV-2 an ACE2-positive Cholangiozyten bindet und dadurch die Leberfunktion direkt beeinträchtigen kann <sup>90</sup>. Da LL-37 den Eintritt von SARS-CoV-2 in die Wirtszelle über den ACE2-Rezeptor durch die oben beschriebenen Mechanismen verhindert, könnte LL-37 einen protektiven Effekt auf die Leber haben. In einer retrospektiven Kohortenstudie an 5771 Patienten mit COVID-19 korrelierte die Serum-ALAT-Konzentration mit der Mortalität <sup>134</sup>.

Ich untersuchte die Kreatinin-Konzentration im Serum als Marker für eine Nierenschädigung. Die Konzentration war im Durchschnitt in allen Gruppen erhöht, korrelierte aber nicht mit dem Schweregrad der COVID-19-Infektion. In einer Studie aus Brasilien zeigten COVID-19 Patienten mit akuter Nierenschädigung eine erhöhte Mortalität <sup>135</sup>. Der Schweregrad der Nierenerkrankung war allerdings nicht die Hauptdeterminante für die Schwere des Krankheitsverlaufs, was meine Ergebnisse bestätigt. Eine andere Studie kam zu dem Ergebnis, dass höhere Serum-Kreatinin-Konzentrationen bei Patienten mit COVID-19 mit

einem erhöhten Risiko für schwerwiegende Komplikationen und einer erhöhten Mortalität assoziiert waren <sup>136</sup>. Die Nierenbeteiligung bei einer SARS-CoV-2-Infektion äußert sich hauptsächlich in einer Schädigung der Nierentubuli <sup>88</sup>. Eine weitere Studie, die an Autopsien das Nierengewebe von verstorbenen COVID-19 Patienten untersuchte, fand Endothelschäden, die wahrscheinlich durch eine direkte Schädigung durch SARS-CoV-2 verursacht wurden <sup>137</sup>. Eine weitere Erklärung für den Anstieg des Serumkreatinins und die Nierenschädigung bei COVID-19 ist eine Dehydratation durch Fieber, Durchfall und Erbrechen. Darüber hinaus können bestimmte Medikamente wie Antibiotika oder antivirale Medikamente die Nierenfunktion beeinträchtigen und zu einem Anstieg der Kreatinin-Konzentration führen. Die Proteinurie gilt als Hauptmanifestationszeichen einer Nierenschädigung bei SARS-2 <sup>88</sup> und könnte in der Diagnostik den Kreatinin-Wert ergänzen.

#### **4.3.5. Immunglobuline**

In einer kürzlich durchgeführten Studie wurden die gegen das SARS-CoV-2-Protein gerichteten Immunglobuline IgM, -A und -G im Serum von COVID-19-Patienten untersucht <sup>94</sup>. Es wurde festgestellt, dass die Antikörperreaktion nicht die einzige Determinante des Krankheitsverlaufs ist, sondern dass auch andere Laborparameter wie z.B. Entzündungsmarker mit dem Schweregrad von COVID-19 assoziiert sind <sup>94</sup>. Immunglobuline spielen ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Diagnose von SARS-CoV-2, aber der Antikörpertest allein weist eine suboptimale Sensitivität und Spezifität auf, was den Nutzen für medizinische Entscheidungen einschränken kann <sup>138</sup>.

Meine Studie zeigte, dass die Gesamtkonzentration der Immunglobuline IgG, IgA und IgM nicht mit dem Schweregrad von COVID-19 korreliert. Es ist möglich, dass die Konzentration der SARS-CoV-2-spezifischen Immunglobuline mit dem Schweregrad von COVID-19 korreliert. Eine Studie aus China untersuchte die COVID-19 spezifischen IgM-Konzentrationen im Serum von schwer erkrankten COVID-19 Patienten und kam zu dem Ergebnis, dass eine IgM-Konzentration von über 50 U/ml mit einer höheren Mortalität assoziiert ist <sup>139</sup>. In Zukunft könnte die Konzentration bzw. der Titer von Anti-SARS-CoV-2-Immunglobulinen ein Indikator für den aktuellen Immunschutz eines Patienten gegen SARS-CoV-2 sein oder einen Hinweis auf die Notwendigkeit einer Auffrischungsimpfung geben. Einige Zusammenhänge sind jedoch noch nicht ausreichend erforscht: Je nachdem, wie stark und spezifisch die Immunantwort einer infizierten Person ausfällt, ist die Immunität interindividuell unterschiedlich <sup>140</sup>. Wie eine Longitudinalstudie zeigte, schwanken die Antikörperkonzentrationen während und nach der Infektion stark <sup>141</sup>. Darüber hinaus fehlen noch Referenzwerte für eine Antikörperkonzentration, die zuverlässig vor einer Infektion bzw. einem schweren Verlauf von COVID-19 schützt. Es gibt auch Hinweise darauf, dass einige Antikörper gegen SARS-CoV-2 zwar an das Virus

binden, es aber nicht neutralisieren können. Daher ist nicht nur die Konzentration und Bindungsfähigkeit der Antikörper, die sich im Antikörpertiter widerspiegelt, von Bedeutung, sondern auch ihre neutralisierende Aktivität. Darüber hinaus sind T-Zellen an der Immunantwort gegen SARS-CoV-2 beteiligt, indem sie infizierte Zellen direkt angreifen und eliminieren. Diese Immunantwort läuft unabhängig von Antikörpern ab, sodass auch ohne hohe Antikörpertiter eine hohe Immunität durch die T-Zellen vorhanden sein kann.

#### **4.4 Limitationen**

Die Ergebnisse der durchgeführten Studie berücksichtigen nicht die Krankheitsgeschichte mit möglichen Vorerkrankungen der Patienten. Diese könnten einen maßgeblichen Einfluss sowohl auf verschiedene Biomarker als auch auf den Krankheitsverlauf von COVID-19 haben. Eine weitere Limitation der Studie ist das Studiendesign als Querschnittsstudie mit dem Beobachtungszeitpunkt bei stationärer Aufnahme. Eine Längsschnittstudie könnte weitere wichtige Erkenntnisse über den Verlauf von COVID-19 im Zusammenhang mit LL-37 und weiteren Biomarkern liefern.

Es erfolgte keine Differenzierung von unterschiedlichen Virusvarianten, die entscheidenden Einfluss auf das Krankheitsgeschehen bei COVID-19 nehmen. Die Studie wurde vor der Ausbreitung der Delta- und Omikron-Varianten und vor Beginn der Impfkampagnen durchgeführt.

Eine gesunde Kontrollgruppe stand nicht zur Verfügung, wodurch sich die Bewertung absoluter Konzentrationen – insbesondere von LL-37 – erschwerte.

#### **4.5 Ausblick**

Auch wenn das Infektionsgeschehen durch SARS-CoV-2 in den letzten Monaten deutlich zurückgegangen ist, bleibt die Erkrankung weiterhin von Bedeutung. Die derzeit dominierende Omikron-Variante weist eine erhöhte Übertragbarkeit bei gleichzeitig meist mildem Verlauf auf. Hinzu kommt, dass ein Großteil der Bevölkerung mittlerweile geimpft oder durchgemacht infiziert ist, was das klinische Bild verändert hat. Dennoch treten weiterhin schwere Verläufe auf – insbesondere bei vulnerablen Gruppen –, sodass COVID-19 auch künftig eine Herausforderung für das Gesundheitssystem darstellen kann. Mit Blick in die Zukunft sollten Gesellschaft und Wissenschaft auf die Ausbreitung neuer Viren vorbereitet sein. Es ist von entscheidender Bedeutung, dass wir uns auf zukünftige Bedrohungen vorbereiten, indem wir die Forschung und Entwicklung von medizinischen Behandlungsmöglichkeiten fortsetzen, um eine schnelle und effektive Reaktion auf zukünftige Pandemien zu ermöglichen. Die

Identifikation verlässlicher Biomarker zur frühzeitigen Einschätzung des Krankheitsverlaufs könnte dabei helfen, Risikopatienten schneller zu erkennen und die Versorgung individueller anzupassen. LL-37 wurde in dieser Arbeit als möglicher Kandidat untersucht. Darüber hinaus könnten antimikrobielle Peptide wie LL-37 künftig auch therapeutisch von Bedeutung sein – sowohl im Rahmen präventiver Strategien als auch als Ergänzung bestehender Behandlungskonzepte. Zukünftige Studien sollten die vorgestellten Ansätze in größeren Kohorten validieren, funktionelle Analysen zur Aktivität von LL-37 einbeziehen und auch alternative Probenmaterialien wie bronchoalveoläre Lavage berücksichtigen, um die lokale Immunantwort besser erfassen zu können.

## 5 Literaturverzeichnis

1. Dong E, Du H, Gardner L. An interactive web-based dashboard to track COVID-19 in real time. *Lancet Infect Dis* 2020; **20**(5): 533-4.
2. Yan H, Ding Y, Guo W. Epidemiological, Radiographical, and Laboratorial Characteristics of Chinese Asymptomatic Cases With COVID-19: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Front Public Health* 2022; **10**: 808471.
3. Schilling J, Tolksdorf K, Marquis A, et al. [The different periods of COVID-19 in Germany: a descriptive analysis from January 2020 to February 2021]. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz* 2021; **64**(9): 1093-106.
4. Ahammed T, Anjum A, Rahman MM, Haider N, Kock R, Uddin MJ. Estimation of novel coronavirus (COVID-19) reproduction number and case fatality rate: A systematic review and meta-analysis. *Health Sci Rep* 2021; **4**(2): e274.
5. Zheng F, Liao C, Fan QH, et al. Clinical Characteristics of Children with Coronavirus Disease 2019 in Hubei, China. *Curr Med Sci* 2020; **40**(2): 275-80.
6. Viner RM, Mytton OT, Bonell C, et al. Susceptibility to SARS-CoV-2 Infection Among Children and Adolescents Compared With Adults: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Pediatr* 2021; **175**(2): 143-56.
7. Qi H, Xiao S, Shi R, et al. COVID-19 transmission in Mainland China is associated with temperature and humidity: A time-series analysis. *Sci Total Environ* 2020; **728**: 138778.
8. The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nat Microbiol* 2020; **5**(4): 536-44.
9. Kim D, Lee JY, Yang JS, Kim JW, Kim VN, Chang H. The Architecture of SARS-CoV-2 Transcriptome. *Cell* 2020; **181**(4): 914-21.e10.
10. Wrapp D, Wang N, Corbett KS, et al. Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. *Science* 2020; **367**(6483): 1260-3.
11. Jackson CB, Farzan M, Chen B, Choe H. Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2022; **23**(1): 3-20.
12. Nguyen HT, Zhang S, Wang Q, et al. Spike glycoprotein and host cell determinants of SARS-CoV-2 entry and cytopathic effects. *J Virol* 2020; **95**(5).
13. Cao Y, Yang R, Lee I, et al. Characterization of the SARS-CoV-2 E Protein: Sequence, Structure, Viroporin, and Inhibitors. *Protein Sci* 2021; **30**(6): 1114-30.
14. Kadam SB, Sukhramani GS, Bishnoi P, Pable AA, Barvkar VT. SARS-CoV-2, the pandemic coronavirus: Molecular and structural insights. *J Basic Microbiol* 2021; **61**(3): 180-202.
15. McBride R, van Zyl M, Fielding BC. The coronavirus nucleocapsid is a multifunctional protein. *Viruses* 2014; **6**(8): 2991-3018.
16. Valle C, Martin B, Touret F, et al. Drugs against SARS-CoV-2: What do we know about their mode of action? *Rev Med Virol* 2020; **30**(6): 1-10.

17. Ciotti M, Ciccozzi M, Pieri M, Bernardini S. The COVID-19 pandemic: viral variants and vaccine efficacy. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2022; **59**(1): 66-75.
18. Korber B, Fischer WM, Gnanakaran S, et al. Tracking Changes in SARS-CoV-2 Spike: Evidence that D614G Increases Infectivity of the COVID-19 Virus. *Cell* 2020; **182**(4): 812-27.e19.
19. Liu Y, Liu J, Plante KS, et al. The N501Y spike substitution enhances SARS-CoV-2 transmission. *bioRxiv* 2021.
20. Zhu N, Zhang D, Wang W, et al. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *N Engl J Med* 2020; **382**(8): 727-33.
21. Control ECfDPa. COVID-19 and farmed and domestic animals, Questions and Answers  
Crisis management in food, animals and plants, 2020.
22. Oh D-Y, Böttcher S, Kröger S, von Kleist M. SARS-CoV-2-Übertragungswege und Implikationen für den Selbst- und Fremdschutz. *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz* 2021; **64**(9): 1050-7.
23. Carraturo F, Del Giudice C, Morelli M, et al. Persistence of SARS-CoV-2 in the environment and COVID-19 transmission risk from environmental matrices and surfaces. *Environ Pollut* 2020; **265**(Pt B): 115010.
24. Xiao F, Tang M, Zheng X, Liu Y, Li X, Shan H. Evidence for Gastrointestinal Infection of SARS-CoV-2. *Gastroenterology* 2020; **158**(6): 1831-3.e3.
25. He X, Lau EHY, Wu P, et al. Temporal dynamics in viral shedding and transmissibility of COVID-19. *Nature Medicine* 2020; **26**(5): 672-5.
26. Wölfel R, Corman VM, Guggemos W, et al. Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019. *Nature* 2020; **581**(7809): 465-9.
27. Lauer SA, Grantz KH, Bi Q, et al. The Incubation Period of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) From Publicly Reported Confirmed Cases: Estimation and Application. *Ann Intern Med* 2020; **172**(9): 577-82.
28. Tanaka H, Ogata T, Shibata T, et al. Shorter Incubation Period among COVID-19 Cases with the BA.1 Omicron Variant. *Int J Environ Res Public Health* 2022; **19**(10).
29. Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, et al. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell* 2020; **181**(2): 271-80.e8.
30. Lukassen S, Chua RL, Trefzer T, et al. SARS-CoV-2 receptor ACE2 and TMPRSS2 are primarily expressed in bronchial transient secretory cells. *Embo j* 2020; **39**(10): e105114.
31. Scherr J. Pathophysiologie von COVID-19 und deren mögliche Bedeutung für Long-COVID. *Sports Orthopaedics and Traumatology* 2021; **37**.
32. Nelson CE, Namasivayam S, Foreman TW, et al. Mild SARS-CoV-2 infection in rhesus macaques is associated with viral control prior to antigen-specific T cell responses in tissues. *Science Immunology* 2022; **7**(70): eabo0535.

33. Blanco-Melo D, Nilsson-Payant BE, Liu WC, et al. Imbalanced Host Response to SARS-CoV-2 Drives Development of COVID-19. *Cell* 2020; **181**(5): 1036-45.e9.
34. West R, Kobokovich A, Connell N, Gronvall GK. COVID-19 Antibody Tests: A Valuable Public Health Tool with Limited Relevance to Individuals. *Trends Microbiol* 2021; **29**(3): 214-23.
35. Grifoni A, Weiskopf D, Ramirez SI, et al. Targets of T Cell Responses to SARS-CoV-2 Coronavirus in Humans with COVID-19 Disease and Unexposed Individuals. *Cell* 2020; **181**(7): 1489-501.e15.
36. Kellam P, Barclay W. The dynamics of humoral immune responses following SARS-CoV-2 infection and the potential for reinfection. *J Gen Virol* 2020; **101**(8): 791-7.
37. Tillett RL, Sevinsky JR, Hartley PD, et al. Genomic evidence for reinfection with SARS-CoV-2: a case study. *Lancet Infect Dis* 2021; **21**(1): 52-8.
38. Schultze JL, Aschenbrenner AC. COVID-19 and the human innate immune system. *Cell* 2021; **184**(7): 1671-92.
39. Zhang JJ, Dong X, Cao YY, et al. Clinical characteristics of 140 patients infected with SARS-CoV-2 in Wuhan, China. *Allergy* 2020; **75**(7): 1730-41.
40. Goel H, Gupta I, Mourya M, et al. A systematic review of clinical and laboratory parameters of 3,000 COVID-19 cases. *Obstet Gynecol Sci* 2021.
41. Huang C, Wang Y, Li X, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet* 2020; **395**(10223): 497-506.
42. Lechien JR, Chiesa-Estomba CM, De Siati DR, et al. Olfactory and gustatory dysfunctions as a clinical presentation of mild-to-moderate forms of the coronavirus disease (COVID-19): a multicenter European study. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2020; **277**(8): 2251-61.
43. Yang X, Yu Y, Xu J, et al. Clinical course and outcomes of critically ill patients with SARS-CoV-2 pneumonia in Wuhan, China: a single-centered, retrospective, observational study. *The Lancet Respiratory Medicine* 2020; **8**(5): 475-81.
44. Puta C, Haunhorst S, Bloch W. Post-akutes COVID-19 ("long-COVID"): Andauernde Symptome, mögliche Ursachen und symptomgeleitetes post-akut COVID-19 Management zur Wiedererlangung der körperlichen Leistungsfähigkeit (Scoping Review). *Sports Orthopaedics and Traumatology* 2021; **37**.
45. Dragioti E, Li H, Tsitsas G, et al. A large-scale meta-analytic atlas of mental health problems prevalence during the COVID-19 early pandemic. *J Med Virol* 2022; **94**(5): 1935-49.
46. Yüce M, Filiztekin E, Özkaya KG. COVID-19 diagnosis -A review of current methods. *Biosens Bioelectron* 2021; **172**: 112752.
47. Zhao J, Yuan Q, Wang H, et al. Antibody Responses to SARS-CoV-2 in Patients With Novel Coronavirus Disease 2019. *Clin Infect Dis* 2020; **71**(16): 2027-34.
48. Robinson PC, Liew DFL, Tanner HL, et al. COVID-19 therapeutics: Challenges and directions for the future. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2022; **119**(15): e2119893119.
49. Glebov OO. Understanding SARS-CoV-2 endocytosis for COVID-19 drug repurposing. *Febs j* 2020; **287**(17): 3664-71.

50. Borgio JF, Alsuwat HS, Al Otaibi WM, et al. State-of-the-art tools unveil potent drug targets amongst clinically approved drugs to inhibit helicase in SARS-CoV-2. *Arch Med Sci* 2020; **16**(3): 508-18.
51. Ramakrishnan S, Nicolau DV, Jr., Langford B, et al. Inhaled budesonide in the treatment of early COVID-19 (STOIC): a phase 2, open-label, randomised controlled trial. *Lancet Respir Med* 2021; **9**(7): 763-72.
52. Gupta A, Gonzalez-Rojas Y, Juarez E, et al. Early Treatment for Covid-19 with SARS-CoV-2 Neutralizing Antibody Sotrovimab. *N Engl J Med* 2021; **385**(21): 1941-50.
53. Gottlieb RL, Vaca CE, Paredes R, et al. Early Remdesivir to Prevent Progression to Severe Covid-19 in Outpatients. *N Engl J Med* 2022; **386**(4): 305-15.
54. Snow TAC, Saleem N, Ambler G, Nastouli E, Singer M, Arulkumaran N. Tocilizumab in COVID-19: a meta-analysis, trial sequential analysis, and meta-regression of randomized-controlled trials. *Intensive Care Med* 2021; **47**(6): 641-52.
55. Sterne JAC, Murthy S, Diaz JV, et al. Association Between Administration of Systemic Corticosteroids and Mortality Among Critically Ill Patients With COVID-19: A Meta-analysis. *Jama* 2020; **324**(13): 1330-41.
56. Marovich M, Mascola JR, Cohen MS. Monoclonal Antibodies for Prevention and Treatment of COVID-19. *Jama* 2020; **324**(2): 131-2.
57. Sharun K, Tiwari R, Iqbal Yatoo M, et al. Antibody-based immunotherapeutics and use of convalescent plasma to counter COVID-19: advances and prospects. *Expert Opin Biol Ther* 2020; **20**(9): 1033-46.
58. Bonam SR, Kaveri SV, Sakuntabhai A, Gilardin L, Bayry J. Adjunct Immunotherapies for the Management of Severely Ill COVID-19 Patients. *Cell Rep Med* 2020; **1**(2): 100016.
59. Pillaiyar T, Meenakshisundaram S, Manickam M. Recent discovery and development of inhibitors targeting coronaviruses. *Drug Discov Today* 2020; **25**(4): 668-88.
60. Mahendran ASK, Lim YS, Fang CM, Loh HS, Le CF. The Potential of Antiviral Peptides as COVID-19 Therapeutics. *Front Pharmacol* 2020; **11**: 575444.
61. Anand U, Jakhmola S, Indari O, et al. Potential Therapeutic Targets and Vaccine Development for SARS-CoV-2/COVID-19 Pandemic Management: A Review on the Recent Update. *Front Immunol* 2021; **12**: 658519.
62. Zheng C, Shao W, Chen X, Zhang B, Wang G, Zhang W. Real-world effectiveness of COVID-19 vaccines: a literature review and meta-analysis. *Int J Infect Dis* 2022; **114**: 252-60.
63. Feikin DR, Higdon MM, Abu-Raddad LJ, et al. Duration of effectiveness of vaccines against SARS-CoV-2 infection and COVID-19 disease: results of a systematic review and meta-regression. *Lancet* 2022; **399**(10328): 924-44.
64. Tabatabaeizadeh SA. Airborne transmission of COVID-19 and the role of face mask to prevent it: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Med Res* 2021; **26**(1): 1.
65. Sugimura M, Chimed-Ochir O, Yumiya Y, et al. The Association between Wearing a Mask and COVID-19. *Int J Environ Res Public Health* 2021; **18**(17).

66. Iezadi S, Gholipour K, Azami-Aghdash S, et al. Effectiveness of non-pharmaceutical public health interventions against COVID-19: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One* 2021; **16**(11): e0260371.
67. Sørensen O, Bratt T, Johnsen AH, Madsen MT, Borregaard N. The human antibacterial cathelicidin, hCAP-18, is bound to lipoproteins in plasma. *J Biol Chem* 1999; **274**(32): 22445-51.
68. Gudmundsson GH, Agerberth B, Odeberg J, Bergman T, Olsson B, Salcedo R. The human gene FALL39 and processing of the cathelin precursor to the antibacterial peptide LL-37 in granulocytes. *Eur J Biochem* 1996; **238**(2): 325-32.
69. Büchau AS, Schaubert J, Hultsch T, Stuetz A, Gallo RL. Pimecrolimus enhances TLR2/6-induced expression of antimicrobial peptides in keratinocytes. *J Invest Dermatol* 2008; **128**(11): 2646-54.
70. Scott MG, Davidson DJ, Gold MR, Bowdish D, Hancock RE. The human antimicrobial peptide LL-37 is a multifunctional modulator of innate immune responses. *J Immunol* 2002; **169**(7): 3883-91.
71. Medina Santos CE, López Hurtado CN, Rivas Santiago B, et al. LL-37, HNP-1, and HBD2/3 modulate the secretion of cytokines TNF- $\alpha$ , IL-6, IFN- $\gamma$ , IL-10 and MMP1 in human primary cell cultures. *Eur Cytokine Netw* 2016; **27**(3): 68-74.
72. Lande R, Botti E, Jandus C, et al. The antimicrobial peptide LL37 is a T-cell autoantigen in psoriasis. *Nat Commun* 2014; **5**: 5621.
73. Majewski K, Kozłowska E, Żelechowska P, Brzezińska-Błaszczak E. Serum concentrations of antimicrobial peptide cathelicidin LL-37 in patients with bacterial lung infections. *Central European Journal of Immunology* 2018; **43**(4): 453-7.
74. Mansbach JM, Hasegawa K, Ajami NJ, et al. Serum LL-37 Levels Associated With Severity of Bronchiolitis and Viral Etiology. *Clinical Infectious Diseases* 2017; **65**(6): 967-75.
75. Fabisiak A, Murawska N, Fichna J. LL-37: Cathelicidin-related antimicrobial peptide with pleiotropic activity. *Pharmacological Reports* 2016; **68**(4): 802-8.
76. Roth A, Lütke S, Meinberger D, et al. LL-37 fights SARS-CoV-2: The Vitamin D-Inducible Peptide LL-37 Inhibits Binding of SARS-CoV-2 Spike Protein to its Cellular Receptor Angiotensin Converting Enzyme 2 In Vitro. Cold Spring Harbor Laboratory; 2020.
77. Nagaoka I, Hirata M, Sugimoto K, et al. Evaluation of the expression of human CAP18 gene during neutrophil maturation in the bone marrow. *Journal of Leukocyte Biology* 1998; **64**(6): 845-52.
78. Zanetti M, Gennaro R, Romeo D. Cathelicidins: a novel protein family with a common proregion and a variable C-terminal antimicrobial domain. *FEBS Letters* 1995; **374**(1): 1-5.
79. Holick MF. Vitamin D and bone health. *J Nutr* 1996; **126**(4 Suppl): 1159s-64s.
80. Schwalfenberg GK. A review of the critical role of vitamin D in the functioning of the immune system and the clinical implications of vitamin D deficiency. *Mol Nutr Food Res* 2011; **55**(1): 96-108.
81. Aranow C. Vitamin D and the Immune System. *Journal of Investigative Medicine* 2011; **59**(6): 881-6.

82. Azmi H, Hassou N, Ennaji MM. Chapter 22 - Vitamin D Immunomodulatory Role in Chronic and Acute Viral Diseases. In: Ennaji MM, ed. *Emerging and Reemerging Viral Pathogens*: Academic Press; 2020: 489-506.
83. Wang TT, Nestel FP, Bourdeau V, et al. Cutting edge: 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> is a direct inducer of antimicrobial peptide gene expression. *J Immunol* 2004; **173**(5): 2909-12.
84. Yang P, Ding Y, Xu Z, et al. Epidemiological and clinical features of COVID-19 patients with and without pneumonia in Beijing, China. *medRxiv* 2020: 2020.02.28.20028068.
85. Mehta P, McAuley DF, Brown M, Sanchez E, Tattersall RS, Manson JJ. COVID-19: consider cytokine storm syndromes and immunosuppression. *Lancet* 2020; **395**(10229): 1033-4.
86. Yan L, Zhang H-T, Goncalves J, et al. An interpretable mortality prediction model for COVID-19 patients. *Nature Machine Intelligence* 2020; **2**(5): 283-8.
87. Faruqi S, Wilmot R, Wright C, Morice AH. Serum LDH in chronic cough: a potential marker of airway inflammation. *Clin Respir J* 2012; **6**(2): 81-7.
88. Han X, Ye Q. Kidney involvement in COVID-19 and its treatments. *J Med Virol* 2021; **93**(3): 1387-95.
89. McConnell MJ, Kawaguchi N, Kondo R, et al. Liver injury in COVID-19 and IL-6 trans-signaling-induced endotheliopathy. *J Hepatol* 2021; **75**(3): 647-58.
90. Chai X, Hu L, Zhang Y, et al. Specific ACE2 Expression in Cholangiocytes May Cause Liver Damage After 2019-nCoV Infection. *bioRxiv* 2020: 2020.02.03.931766.
91. Ulloque-Badaracco JR, Hernandez-Bustamante EA, Herrera-Añazco P, Benites-Zapata VA. Prognostic value of apolipoproteins in COVID-19 patients: A systematic review and meta-analysis. *Travel Med Infect Dis* 2021; **44**: 102200.
92. Kurki SN, Kantonen J, Kaivola K, et al. APOE ε4 associates with increased risk of severe COVID-19, cerebral microhaemorrhages and post-COVID mental fatigue: a Finnish biobank, autopsy and clinical study. *Acta Neuropathologica Communications* 2021; **9**(1): 199.
93. Safdari Lord J, Soltani Rezaiezadeh J, Yekaninejad MS, Izadi P. The association of APOE genotype with COVID-19 disease severity. *Scientific Reports* 2022; **12**(1): 13483.
94. Denise Meinberger MK, Annika Roth, Gabriele Hermes, Jannik Stemler, Oliver A. Cornely, Thomas Streichert, Andreas R. Klatt. Analysis of IgM, IgA, and IgG Isotype Antibodies Directed Against SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein and ORF8 in the Course of COVID-19. *Research Square* 2021.
95. Keutmann M, Hermes G, Meinberger D, et al. The ratio of serum LL-37 levels to blood leucocyte count correlates with COVID-19 severity. *Scientific Reports* 2022; **12**(1): 9447.
96. Wang C, Wang S, Li D, et al. Human Cathelicidin Inhibits SARS-CoV-2 Infection: Killing Two Birds with One Stone. *ACS Infect Dis* 2021.
97. Duan Z, Zhang J, Chen X, et al. Role of LL-37 in thrombotic complications in patients with COVID-19. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2022; **79**(6): 309.
98. Adham Z, Al-Ghurabi B. Serum Level of Cathelicidin in Covid-19 Patients in Relation with Oral Health. *Journal of Research in Medical and Dental Science* 2021.

99. Wang Y, Johansson J, Agerberth B, Jörnvall H, Griffiths WJ. The antimicrobial peptide LL-37 binds to the human plasma protein apolipoprotein A-I. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2004; **18**(5): 588-9.
100. Bergman P, Walter-Jallow L, Broliden K, Agerberth B, Söderlund J. The antimicrobial peptide LL-37 inhibits HIV-1 replication. *Curr HIV Res* 2007; **5**(4): 410-5.
101. Tripathi S, Tecele T, Verma A, Crouch E, White M, Hartshorn KL. The human cathelicidin LL-37 inhibits influenza A viruses through a mechanism distinct from that of surfactant protein D or defensins. *J Gen Virol* 2013; **94**(Pt 1): 40-9.
102. Meyerholz DK, Reznikov LR. Influence of SARS-CoV-2 on airway mucus production: A review and proposed model. *Vet Pathol* 2021: 3009858211058837.
103. Liu Y, Lv J, Liu J, et al. Mucus production stimulated by IFN-AhR signaling triggers hypoxia of COVID-19. *Cell Res* 2020; **30**(12): 1078-87.
104. Chen CI, Schaller-Bals S, Paul KP, Wahn U, Bals R. Beta-defensins and LL-37 in bronchoalveolar lavage fluid of patients with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros* 2004; **3**(1): 45-50.
105. Papadaki M, Marmarinos A, Tsoia M, Gourgiotis D, Soldatou A. Cathelicidin levels in nasal secretions are associated with the severity of acute bronchiolitis. *Pediatr Pulmonol* 2021.
106. Pahar B, Madonna S, Das A, Albanesi C, Girolomoni G. Immunomodulatory Role of the Antimicrobial LL-37 Peptide in Autoimmune Diseases and Viral Infections. *Vaccines (Basel)* 2020; **8**(3).
107. Nagaoka I, Tamura H, Reich J. Therapeutic Potential of Cathelicidin Peptide LL-37, an Antimicrobial Agent, in a Murine Sepsis Model. *Int J Mol Sci* 2020; **21**(17).
108. Koçak Tufan Z, Kayaaslan B, Mer M. COVID-19 and Sepsis. *Turk J Med Sci* 2021; **51**(Si-1): 3301-11.
109. Lokhande KB, Banerjee T, Swamy KV, Ghosh P, Deshpande M. An in silico scientific basis for LL-37 as a therapeutic for Covid-19. *Proteins* 2021.
110. Cao L, Goreshnik I, Coventry B, et al. De novo design of picomolar SARS-CoV-2 miniprotein inhibitors. *Science* 2020; **370**(6515): 426-31.
111. Zhao Y, Zhang H, Zhao Z, et al. Efficacy and safety of Oral LL-37 against the Omicron BA.5.1.3 variant of SARS-COV-2: A randomized trial. *J Med Virol* 2023; **95**(8): e29035.
112. Vasheghani M, Jannati N, Baghaei P, Rezaei M, Aliyari R, Marjani M. The relationship between serum 25-hydroxyvitamin D levels and the severity of COVID-19 disease and its mortality. *Sci Rep* 2021; **11**(1): 17594.
113. Entrenas Castillo M, Entrenas Costa LM, Vaquero Barrios JM, et al. "Effect of calcifediol treatment and best available therapy versus best available therapy on intensive care unit admission and mortality among patients hospitalized for COVID-19: A pilot randomized clinical study". *J Steroid Biochem Mol Biol* 2020; **203**: 105751.
114. Al-Jarallah M, Rajan R, Dashti R, et al. In-hospital mortality in SARS-CoV-2 stratified by serum 25-hydroxy-vitamin D levels: A retrospective study. *J Med Virol* 2021; **93**(10): 5880-5.
115. Zafar M, Karkhanis M, Shahbaz M, et al. Vitamin D levels and mortality with SARS-COV-2 infection: a retrospective two-centre cohort study. *Postgrad Med J* 2021.

116. Wang T-T, Nestel FP, Bourdeau V, et al. Cutting Edge: 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> Is a Direct Inducer of Antimicrobial Peptide Gene Expression. *The Journal of Immunology* 2004; **173**(5): 2909-12.
117. Izcovich A, Ragusa MA, Tortosa F, et al. Prognostic factors for severity and mortality in patients infected with COVID-19: A systematic review. *PLoS One* 2020; **15**(11): e0241955.
118. Peckham H, de Gruijter NM, Raine C, et al. Male sex identified by global COVID-19 meta-analysis as a risk factor for death and ITU admission. *Nat Commun* 2020; **11**(1): 6317.
119. Ortolan A, Lorenzin M, Felicetti M, Doria A, Ramonda R. Does gender influence clinical expression and disease outcomes in COVID-19? A systematic review and meta-analysis. *Int J Infect Dis* 2020; **99**: 496-504.
120. Takahashi T, Ellingson MK, Wong P, et al. Sex differences in immune responses that underlie COVID-19 disease outcomes. *Nature* 2020; **588**(7837): 315-20.
121. Chen W, Zheng KI, Liu S, Yan Z, Xu C, Qiao Z. Plasma CRP level is positively associated with the severity of COVID-19. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2020; **19**(1): 18.
122. Liu F, Li L, Xu M, et al. Prognostic value of interleukin-6, C-reactive protein, and procalcitonin in patients with COVID-19. *J Clin Virol* 2020; **127**: 104370.
123. Broman N, Rantasärkkä K, Feuth T, et al. IL-6 and other biomarkers as predictors of severity in COVID-19. *Ann Med* 2021; **53**(1): 410-2.
124. Torsten Feldt WG, Katrin Heim, Christoph Lübbert, Agata Mikolajewska,, Michaela Niebank FP, Katja Rothfuss, Stefan Schmiedel, Miriam S. Stegemann,, August Stich IT, Susanne Weber, Timo Wolf. Notes on the identification, diagnosis and treatment of patients with COVID-19. Robert Koch-Institut, Ständiger Arbeitskreis der Kompetenz- und Behandlungszentren für Krankheiten durch hochpathogene Erreger; 2021. p. 28.
125. Santos J, Brierley S, Gandhi MJ, Cohen MA, Moschella PC, Declan ABL. Repurposing Therapeutics for Potential Treatment of SARS-CoV-2: A Review. *Viruses* 2020; **12**(7).
126. Salama C, Han J, Yau L, et al. Tocilizumab in Patients Hospitalized with Covid-19 Pneumonia. *N Engl J Med* 2021; **384**(1): 20-30.
127. Berlit MK, Haase R, Nothacker M, Marx G, Karagiannidis C. S3-Leitlinie-Empfehlungen zur stationären Therapie von Patienten mit COVID-19. 2021.
128. Kooistra EJ, van Berkel M, van Kempen NF, et al. Dexamethasone and tocilizumab treatment considerably reduces the value of C-reactive protein and procalcitonin to detect secondary bacterial infections in COVID-19 patients. *Critical Care* 2021; **25**(1): 281.
129. Fialek B, Pruc M, Smereka J, et al. Diagnostic value of lactate dehydrogenase in COVID-19: A systematic review and meta-analysis. *Cardiol J* 2022; **29**(5): 751-8.
130. Horby P, Lim WS, Emberson JR, et al. Dexamethasone in Hospitalized Patients with Covid-19. *N Engl J Med* 2021; **384**(8): 693-704.
131. Yoo EH, Chang SH, Song DY, et al. Comprehensive Laboratory Data Analysis to Predict the Clinical Severity of Coronavirus Disease 2019 in 1,952 Patients in Daegu, Korea. *Ann Lab Med* 2022; **42**(1): 24-35.

132. Guan W-j, Ni Z-y, Hu Y, et al. Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China. *New England Journal of Medicine* 2020; **382**(18): 1708-20.
133. Zhang C, Shi L, Wang FS. Liver injury in COVID-19: management and challenges. *Lancet Gastroenterol Hepatol* 2020; **5**(5): 428-30.
134. Lei F, Liu YM, Zhou F, et al. Longitudinal Association Between Markers of Liver Injury and Mortality in COVID-19 in China. *Hepatology* 2020; **72**(2): 389-98.
135. Bezerra R, Teles F, Mendonca PB, et al. Outcomes of critically ill patients with acute kidney injury in COVID-19 infection: an observational study. *Ren Fail* 2021; **43**(1): 911-8.
136. Xu Z, Zhang Y, Zhang C, Xiong F, Zhang J, Xiong J. Clinical Features and Outcomes of COVID-19 Patients with Acute Kidney Injury and Acute Kidney Injury on Chronic Kidney Disease. *Aging Dis* 2022; **13**(3): 884-98.
137. Su H, Yang M, Wan C, et al. Renal histopathological analysis of 26 postmortem findings of patients with COVID-19 in China. *Kidney Int* 2020; **98**(1): 219-27.
138. Moura DTH, McCarty TR, Ribeiro IB, et al. Diagnostic Characteristics of Serological-Based COVID-19 Testing: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Clinics (Sao Paulo)* 2020; **75**: e2212.
139. Liu X, Zheng X, Liu B, et al. Serum IgM against SARS-CoV-2 correlates with in-hospital mortality in severe/critical patients with COVID-19 in Wuhan, China. *Aging (Albany NY)* 2020; **12**(13): 12432-40.
140. Wu F, Liu M, Wang A, et al. Evaluating the Association of Clinical Characteristics With Neutralizing Antibody Levels in Patients Who Have Recovered From Mild COVID-19 in Shanghai, China. *JAMA Intern Med* 2020; **180**(10): 1356-62.
141. Chen Y, Tong X, Li Y, et al. A comprehensive, longitudinal analysis of humoral responses specific to four recombinant antigens of SARS-CoV-2 in severe and non-severe COVID-19 patients. *PLoS Pathog* 2020; **16**(9): e1008796.