

Charité – Universitätsmedizin Berlin
Campus Benjamin Franklin
Aus dem Institut für Molekularbiologie und Biochemie
Direktor: Prof. Dr. med. Werner Reutter

**Etablierung eines ELISA zum Nachweis von
Inter-alpha-Inhibitor
als diagnostischer Marker bei neonataler Sepsis**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung der
Medizinischen Doktorwürde
der Charité – Universitätsmedizin Berlin
Campus Benjamin Franklin

vorgelegt von
Sebastian Brokat
aus Berlin

Berlin 2005

Referent: Prof. Dr. med. Werner Reutter

1. Korreferent: Prof. Dr. A. Plagemann

2. Korreferent: Dr. E. Mildenberger

Gedruckt mit Genehmigung der Charité – Universitätsmedizin Berlin
Campus Benjamin Franklin

Promoviert am: 02.09.2005

Inhalt:

1.	Einleitung und Zielsetzung	5
1.1.	Sepsis bei Erwachsenen und Neugeborenen	5
1.1.1.	Ursachen und Verlauf der Sepsis	5
1.1.2.	Neugeborenensepsis	6
1.2.	Proteasen und deren Inhibitoren	8
1.2.1.	Proteasen	8
1.2.2.	Proteaseinhibitoren	8
1.2.3.	Inter- α -Inhibitor	9
1.2.3.1.	Struktur von Inter- α -Inhibitor	9
1.2.3.2.	Vorkommen und Funktion von Inter- α -Inhibitor	11
1.3.	Zielsetzung der Arbeit	12
2.	Material und Methoden	13
2.1.	Chemikalien	13
2.2.	Puffer	13
2.3.	Allgemeine proteinchemische Verfahren	14
2.3.1.	Proteinbestimmung	14
2.3.2.	Dialyse und Konzentration	14
2.4.	Elektrophoretische Verfahren	14
2.4.1.	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	14
2.4.2.	Western-Blotting	15
2.5.	Färbemethoden	16
2.5.1.	Färbung von PAGE-Gelen mit Coomassie-Blau G-250	16
2.5.2.	Färbung von Blotmatrizen mit Ponceau-Rot	16
2.6.	Immunologische Verfahren	16
2.6.1.	Antikörper	16
2.6.2.	Biotinylierung	17
2.6.3.	Immunblot	17
2.6.4.	ELISA	18
2.6.4.1.	Kompetitions-ELISA	18
2.6.4.2.	Sandwich-ELISA	19
2.7.	Chromatographische Verfahren (HPLC)	20
2.7.1.	Ionenaustausch (DEAE)	20
2.7.2.	Hydroxylapatit (HAC)	20
2.7.3.	Gelfiltration	21
2.7.4.	Immunaффinitäts-Chromatographie	21
2.7.4.1.	Protein A	21
2.7.4.2.	CNBr-Sepharose	22

3.	Ergebnisse.....	23
3.1.	Charakterisierung der Antikörper gegen Inter- α -Inhibitor	23
3.1.1.	Charakterisierung des monoklonalen Antikörpers 69.26	23
3.1.2.	Charakterisierung des polyklonalen Antikörpers R-16	25
3.2.	Reinigung von I α I aus humanem Plasma	26
3.2.1.	Ionenaustausch-Chromatographie (DEAE)	26
3.2.2.	Hydroxylapatit-Chromatographie	28
3.2.3.	Immunaffinitäts-Chromatographie	30
3.2.3.1.	Reinigung von MAb 69.26 durch Protein A-Sepharose	30
3.2.3.2.	Reinigung von I α I durch MAb 69.26-Sepharose	31
3.3.	Entwicklung und Optimierung des Sandwich-ELISA	31
3.3.1.	Nachweis der Bindungsaktivität von MAb 69.26 im ELISA	31
3.3.2.	Optimierung der Konzentration des biotinylierten Antiserums R-16	32
3.3.3.	Optimierung der Konzentration der Streptavidin-Peroxidase	33
3.3.4.	Optimierung der Inkubationszeit des ELISA-Substrats	34
3.4.	Quantifizierung von Inter- α -Inhibitor in Plasmaproben	35
3.4.1.	Vorversuche	35
3.4.1.1.	Inter- α -Inhibitor in maternalem im Vergleich zu neonatalem Plasma	36
3.4.1.2.	Inter- α -Inhibitor in Abhängigkeit vom Gestationsalter	37
3.4.1.3.	Inter- α -Inhibitor in umbilikalem im Vergleich zu peripherem Plasma	39
3.4.1.4.	Inter- α -Inhibitor in perinatalem im Vergleich zu postnatalem Plasma	40
3.4.2.	Korrelation von I α I-Plasmaspiegel und Sepsis	43
3.4.2.1.	Inter- α -Inhibitor im Plasma von Neugeborenen bei Sepsis	43
3.4.2.2.	Inter- α -Inhibitor im Plasma einzelner Sepsisfälle (Longitudinalstudie)	45
4.	Diskussion	47
4.1.	Methoden zur Etablierung des ELISA	47
4.2.	Inter- α -Inhibitor als diagnostischer Marker bei neonataler Sepsis	49
5.	Zusammenfassung	53
6.	Literaturverzeichnis	55
7.	Anhang	64
	Teile dieser Arbeit wurden publiziert	64
	Abkürzungsverzeichnis	65
	Lebenslauf	66
	Danksagungen	67