

1. Einleitung und Zielsetzung

1.1. Sepsis bei Erwachsenen und Neugeborenen

1.1.1. Ursachen und Verlauf der Sepsis

Als Sepsis oder Septikämie („echte“ Blutvergiftung) wird der pathophysiologische Zustand eines Organismus bezeichnet, der durch eine Allgemeininfektion infolge konstanter oder periodischer Aussaat von Mikroorganismen (meist Bakterien; seltener Pilze, Viren oder Parasiten) von einem Herd aus in die Blutbahn verursacht wird [Fourrier et al., 1992].

Mögliche Sepsisherde sind Nabel (bei Neugeborenen), Urogenitaltrakt (z.B. bei Harnwegsinfektionen, postpartale Infektionen), Haut (z.B. bei Wundinfektionen, Pyodermien), HNO-Bereich (z.B. bei Tonsillitis, Sinusitis, Otitis), Lunge (z.B. bei Pneumonie), Darm (z.B. bei Peritonitis) und Gallenwege (z.B. bei Cholangitis). Zu den klassischen Symptomen der Sepsis zählen intermittierendes Fieber ($>38,5^{\circ}\text{C}$) mit Schüttelfrost, positive Blutkultur (Bakteriämie) sowie manchmal Milztumor, toxische Reaktionen des Knochenmarks bzw. des Blutes (Leukozytose, Anämie, Thrombopenie, Gerinnungsstörungen) und toxische Kreislaufreaktionen mit Tachykardie, Zentralisation, Ödemen und Oligurie. Als die hauptsächlichen Erreger der Sepsis sind gramnegative Bakterien wie *Escherichia coli* sowie andere Enterobakterien (wie *Klebsiella*, *Proteus*, *Enterobacter*), *Pseudomonas aeruginosa*, Meningokokken und *Bacteroides* identifiziert worden. Durch Endotoxine gram-negativer Erreger kann es zur Verbrauchskoagulopathie kommen, die dann zum septischen Schock, Multiorganversagen und letztlich zum Tod führt [Parillo et al., 1993; Geppert et al., 2002; Gilbert et al., 2002].

Nachdem Robert Koch in den späten 1870er Jahren herausfand, dass jede Infektionskrankheit von einem spezifischen Erreger verursacht wird und nachdem innerhalb der darauf folgenden Dekade Wissenschaftler zeigen konnten, dass Bakterien Krankheiten oft durch sezernierte Toxine (Exotoxine) verursachen, entdeckte 1892 Richard Pfeiffer, einer von Koch's Studenten, neben dem hitzelablen Exotoxin des *Vibrio cholerae* (Erreger der Cholera) eine hitzestabile Substanz, die Bestandteil der bakteriellen Zellmembran ist. Dieses so genannte Endotoxin wird beim Tod sowie bei der Reproduktion der Bakterienzellen freigesetzt und wird danach erst aktiv. Strukturell handelt es sich bei den Endotoxinen um Lipopolysaccharide (LPS) mit Lipid A als funktionell wichtigem Bestandteil [Rietschel und Brade, 1992].

Endotoxine binden an ein so genanntes Lipopolysaccharid-bindendes-Protein (LBP). Dieser LPS-LBP-Komplex wird durch CD14-Rezeptoren von Makrophagen, Monozyten und endothelialen Zellen erkannt und führt zur Produktion sowie Sekretion von Zytokinen und proinflammatorischen Substanzen wie $\text{TNF}\alpha$, IL-1, IL-6, IL-8, Sauerstoffradikalen, Prostaglandin E_2 , Thromboxan A_2 und PAF [Kishimoto, 1989; De Bont et al., 1992; Rietschel und Brade, 1992]. Diese Zytokine haben wiederum chemotaktische Eigenschaften und locken Leukozyten in großer Zahl an, die dann Eikosanoide wie Leukotriene, Thromboxan A_2 , Prostaglandin E_2 und Prostacyclin freisetzen [Parillo et al., 1990]. Diese Mediatoren modulieren eine Reihe von intra- und extrazellulären Prozessen, wie die Gefäßpermeabilität, das Komplementsystem und die Blutgerinnung [Lorente et al., 1993; Caliezi et al., 2000]. Außerdem aktivieren sie neutrophile Granulozyten, woraufhin diese reaktive Sauerstoffradikale und Proteasen sezernieren [Jochum et al., 1994].

Unmittelbare Folgen dieser Veränderungen sind unkontrollierte Aktivierungen der Koagulation und des fibrinolytischen Systems mit der Folge einer disseminierten intravasalen Verbrauchskoagulopathie (DIC) [Machovich und Owen, 1990; Okajima et al., 1994].

Die DIC und die destruktiven Eigenschaften der sezernierten Proteasen sind beteiligt an der Entstehung eines Multiorganversagens und dadurch für die schlechte Prognose der Sepsis mitverantwortlich [Suffredini et al., 1989; Fourrier et al., 1992; Salier et al., 1996].

Zur Sepsis kommt es vermehrt bei geschwächter Abwehrlage, wie z.B. bei schweren Infektionskrankheiten, AIDS, Krebs sowie nach Operationen und Verbrennungen. Außerdem sind Neugeborene und besonders Frühgeborene durch Sepsis gefährdet, da ihr Immunsystem noch nicht ausgereift ist und sie somit anfälliger für Infektionen sind.

Trotz intensivmedizinischer Betreuung sterben durch Sepsis immer noch ein großer Anteil der Patienten am Multiorganversagen [Rangel-Frausto et al., 1995].

1.1.2. Neugeborenensepsis

Sepsis, bedingt durch neonatale Infektionen, stellt eine wichtige Ursache für Morbidität und Mortalität neugeborener Kinder dar, da diese ein nur unvollkommenes Immunsystem und geringe physische Reserven besitzen. Neugeborenensepsis hatte im Jahr 1993 (in den USA) eine Inzidenz von 1-10 Fällen pro 1000 Lebendgeborenen mit einer Letalität von 15-50% [Klein und Marcy, 1995]. Bei Neugeborenen mit sehr niedrigem Geburtsgewicht liegt die Inzidenz für Sepsis noch deutlich höher [Vermont-Oxford Neonatal Network, 1996]. „Ausschluss einer Sepsis“ stellt somit eine der häufigsten Differentialdiagnosen auf

neonatalen Intensivstationen dar [Escobar, 1999]. Wie die Formulierung nahe legt, geht es dabei um den Ausschluss einer Infektion bei Neugeborenen mit unspezifischen klinischen Zeichen und/oder perinatalen oder neonatalen Risikofaktoren für bakterielle Infektionen. Frühzeitiges Erkennen ist dabei sehr wichtig für eine erfolgreiche Behandlung der Neugeborenen-sepsis. Wird bei diesen Patienten eine Sepsis vermutet, so wird aufgrund der hohen Mortalität umgehend eine Therapie mit einem Breitspektrum-Antibiotikum eingeleitet bis die Blutkulturergebnisse eintreffen. Eine Vielzahl diagnostischer Tests (Blutkörperchenzählungen und –untersuchungen sowie Quantifizierung von Akute-Phase-Proteinen im Plasma) werden für gewöhnlich parallel zur Blutkultur durchgeführt, sodass die Antibiotikagabe in Abhängigkeit von diesen Ergebnissen und dem weiteren Krankheitsverlauf entweder fortgeführt oder abgesetzt wird. Verschiedene Gründe führen dazu, dass eine Sepsis mit dem Hauptdiagnosemittel, der Blutkultur, nicht erkannt wird. Zum einen führt Antibiotikagabe intrapartum zu einem nicht aussagekräftigen Ergebnis. Des Weiteren wird eine Bakteriämie in einem großen Teil der Fälle nicht nachgewiesen, da Bakteriämien transient oder intermittierend sein können. Gerade bei Neugeborenen ist häufig keine genügende Blutmenge für die standardisierten Blutkulturen verfügbar, oder die Verfahren sind für bestimmte Keime unzulänglich. Reife Neugeborene sowie Frühgeborene zeigen bereits zu einem sehr frühen Zeitpunkt einer Sepsis deutlich erhöhte Serumspiegel an IL-6, IL-8, IL-10 und C-reaktivem-Protein (CrP) [Martin et al., 2001; Gonzales et al., 2003]. Allerdings sind diese unspezifischen Entzündungsmediatoren auch bei anderen Infektionskrankheiten (z.B. bei einer nekrotisierenden Enterokolitis (NEC) oder einer Pneumonie) erhöht [Romagnoli et al., 2001]. So hat bislang kein klinischer Test (oder eine Kombination von Tests) einen positiven prädiktiven Wert von mehr als 40% [Gerdes, 1991], d.h. in weniger als 40% der Fälle liegt tatsächlich eine Sepsis vor, wenn diese mit den gängigen Verfahren erkannt wurde. Somit findet retrospektiv betrachtet bei den meisten Kindern eine unnötige antibiotische Therapie statt [Philip und Hewitt, 1980; Escobar et al., 1994]. Die Verbreitung multiresistenter Keime durch zu häufigen nicht-indizierten Einsatz von Antibiotika macht jedoch eine Beschränkung der antibiotischen Therapie auf wirklich infizierte Patienten erforderlich [Muray, 1994; Boyce, 1997]. Daher werden für eine möglichst frühe und effiziente antibiotische Therapie und damit eine günstige Prognose möglichst spezifische und sensitive Sepsisindikatoren gefordert [Baek et al., 2003].

1.2. Proteasen und deren Inhibitoren

1.2.1. Proteasen

Proteolytische Prozesse im Körper (z.B. limitierte Proteolyse zur Aktivierung oder Deaktivierung von Enzymen) werden durch Proteasen (Proteinasen) katalysiert.

Man unterscheidet nach ihrem Angriffsort Endopeptidasen und Exopeptidasen, wobei die vom Ende einer Peptidkette abspaltenden Exopeptidasen wiederum in Carboxy- und Aminopeptidasen unterteilt werden. Von ihrer physiologischen Bedeutung her kann man intrazelluläre und extrazelluläre Proteasen abgrenzen. Extrazelluläre Proteasen werden von Zellen sezerniert. Zu ihnen gehören die Proteasen des Verdauungstraktes und die Proteasen der extrazellulären Flüssigkeit mit spezifischen Funktionen im Blutgerinnungssystem, Komplementsystem und fibrinolytischen System.

Fast alle diese Proteasen gehören zur Klasse der Serinproteasen [Iarygin et al., 2001]. Serinproteasen sind an vielen biologischen Vorgängen, wie z.B. der unspezifischen humoralen Immunabwehr (Komplementaktivierung), der Hormonreifung, dem intrazellulären Prozessing von Proteinvorstufen, der Blutgerinnung und der Verdauung beteiligt [Powers et al., 1993].

Zu den wichtigsten Vertretern der Serinproteasen gehören Trypsin, Chymotrypsin, humane Leukozytenelastase (HLE), Plasmin und Cathepsin G. HLE und Cathepsin G werden von neutrophilen Granulozyten im Rahmen der physiologischen Immunantwort bei Entzündungen, bei Kontakt mit Fremdorganismen oder nichtlebenden Stoffen sowie bei Kontakt mit totem, geschädigtem oder entartetem körpereigenen Gewebe freigesetzt [Burg und Pillinger, 2001]. Entsprechend finden sich bei Krankheiten, die mit Entzündungsreaktionen vergesellschaftet sind (einschließlich Sepsis), erhöhte Blutspiegel dieser beiden Serinproteasen [Jochum et al., 1986].

1.2.2. Proteaseinhibitoren

Unter nicht-pathologischen Bedingungen stehen in höheren Organismen Proteasen unter der Kontrolle von im Blut zirkulierenden Inhibitoren. Diese in der Leber synthetisierten Inhibitoren binden und inaktivieren Proteasen, die von Entzündungsherden abdiffundieren [Jochum et al., 1994]. Diese Wechselwirkung von Aktivierung und Inhibition gerät im

Rahmen schwerer Erkrankungen aus dem Gleichgewicht, da es aufgrund erhöhter Sekretion von Proteasen und dadurch bedingtem Verbrauch von Inhibitoren zu einem Missverhältnis beider Gruppen kommt [Fritz et al., 1986].

Die Inhibitoren der Kazal-Genfamilie, die Inhibitoren der STI-Kunitz-Genfamilie („STI“ = Sojabohnen-Trypsin-Inhibitor), Hirudin und die Inhibitoren der Kunitz-Genfamilie können den Serinproteaseinhibitoren zugeordnet werden [Salier, 1990]. Inhibitoren vom Kunitztyp, deren Hauptvertreter der pankreatische Trypsininhibitor ist, besitzen für gewöhnlich eine geringe relative molare Masse, einen basischen isoelektrischen Punkt und mindestens eine inhibitorische Domäne. Zwei solcher Domänen vom Kunitztyp sind im Bikunin nacheinander angeordnet und zielen in ihrer Wirkung auf Enzyme wie Trypsin, Chymotrypsin, Cathepsin G, HLE, Acrosin und Plasmin ab [Salier, 1990].

1.2.3. Inter- α -Inhibitor

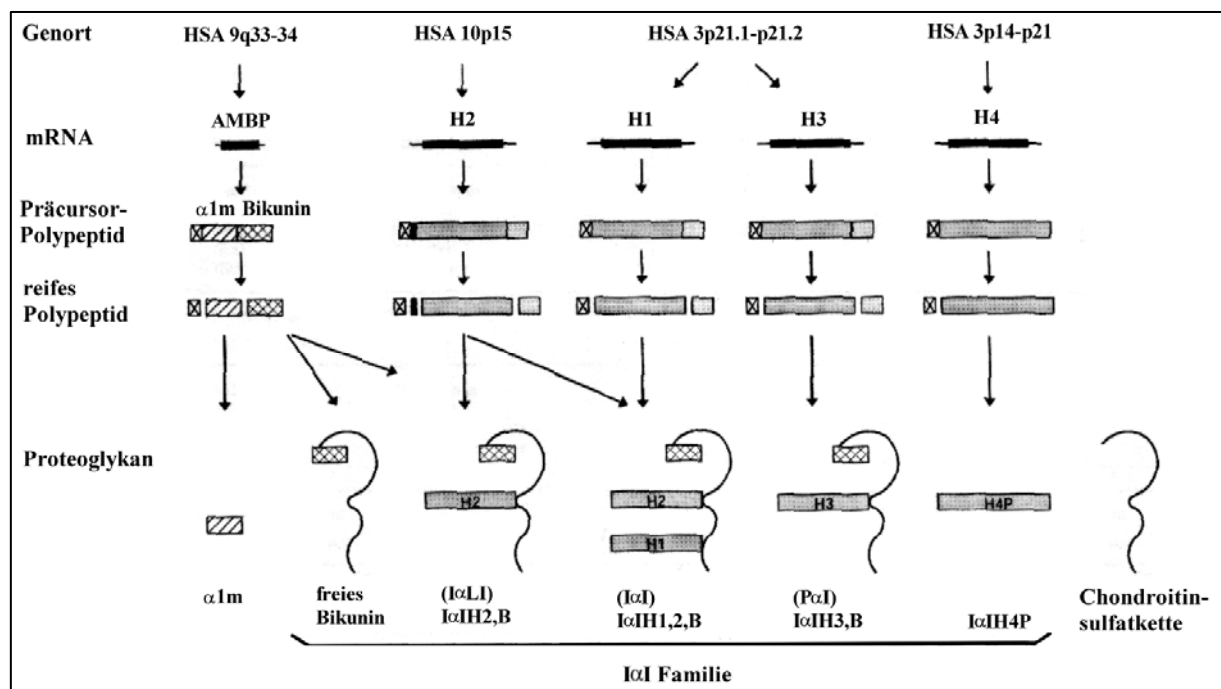
1.2.3.1. Struktur von Inter- α -Inhibitor

Die Inter- α -Inhibitor-Proteinfamilie umfasst eine Reihe von Serinproteaseinhibitoren. Im Gegensatz zu anderen Proteinaseninhibitoren besitzen die Mitglieder der Inter- α -Inhibitor-Proteinfamilie mehrere Polypeptidketten (leichte und schwere Ketten), die kovalent über Chondroitinsulfatketten miteinander verbunden sind [Enghild et al., 1993; Morelle et al., 1994]. Die beiden Hauptvertreter, die im menschlichen Blut gefunden werden, sind Inter- α -Inhibitor ($\text{I}\alpha\text{I}$; 250kDa), welches sich aus zwei schweren Ketten (H1 bzw. H2) und einer leichten Kette (Bikunin; 25kDa) zusammensetzt, sowie Prä- α -Inhibitor ($\text{P}\alpha\text{I}$; 125kDa), welches aus einer schweren Kette (H3) und ebenfalls Bikunin besteht. Bikunin (‘bikunin’ = bi-kunitz-inhibitor = Inhibitor mit zwei Domänen vom Kunitztyp) ist für seine Fähigkeit bekannt, verschiedene Serinproteasen wie zum Beispiel Trypsin (daher die alte Bezeichnung ‘ITI’ = Inter-Trypsin-Inhibitor), HLE, Plasmin und Cathepsin G zu inhibieren. Die Leber konnte als Hauptsyntheseort sowohl der leichten als auch der schweren Ketten der Inter- α -Inhibitor-Proteinfamilienmitglieder identifiziert werden, wobei H1, H2, H3, H4 und Bikunin durch mindestens vier verschiedene Gene kodiert werden [Heron et al., 1995; Salier et al., 1996].

Die von den cDNA-Sequenzen abgeleiteten Primärstrukturen dieser Gene weisen deutliche Homologien auf, was einen gemeinsamen Ursprung aus einem so genannten H-Gen vermuten lässt [Diarra-Mehrpour et al., 1989; Salier, 1990; Chan et al., 1995]. Jeder der vier H-Genorte

wurde auf je zwei homologen Chromosomenabschnitten sowohl beim Menschen als auch bei der Maus gefunden, was zur Überlegung führte, dass die Duplikation aller H-Gene vor der evolutionären Trennung von Mensch und Nagetieren stattfand [Salier et al., 1992].

Alle vier schweren H-Ketten besitzen eine so genannte „von Willebrand Type-A (vWA) Domäne“. Mit dieser Domäne können Proteine z.B. mit Integrinen, Kollagen, Proteoglykanen und Heparin in Wechselwirkung treten [Bork und Rohde, 1991]. Es wurde gezeigt, dass die H1- und H2-Ketten in vitro und in vivo mit Hyaluronsäuren verknüpft sind [Colombatti und Bonaldo, 1991]. Zusätzlich zu den drei Genen, die die vier H-Ketten kodieren, ist ein weiteres als α -1-Microglobulin (α 1m)/Bikunin-Präcursor (AMBP) bezeichnetes Gen mit Bikunin (und α -1-Microglobulin) als Produkt an der Synthese der meisten Mitglieder der Inter- α -Inhibitor-Proteinfamilie beteiligt. Freies Bikunin wurde im Plasma und Urin sowie im Medium von Leberzellkulturen gefunden [Chan et al., 1995]. Es wird aus praktischen Gründen zur Inter- α -Inhibitor-Proteinfamilie gerechnet, obwohl es nicht mit einer H-Kette verbunden ist.



Schema 1: Überblick über die Biosynthese und Struktur der Mitglieder der Inter- α -Inhibitor-Proteinfamilie [modifiziert nach Salier et al., 1996]

Die AMBP-Transkription findet ausschließlich in der Leber statt und unterliegt einer strengen Regulation. Auch das Expressionsmuster der H-Gene ist genau kontrolliert, wobei neben der Leber in geringerem Maße auch Großhirn und Kleinhirn zu einer Produktion der schweren Ketten in der Lage sind. H1-, H2- und H3-mRNA werden in der Leber annähernd gleich

exprimiert, während im Gehirn mehr H3- als H2- sowie keine H1-mRNA nachweisbar ist [Salier et al., 1993; Daveau et al., 1993].

In einer früheren Studie wurde in Patienten, die an verschiedenen Nephropathien litten, eine deutliche Korrelation zwischen dem Bikunin- und dem Kreatininplasmaspiegel gefunden, was nahe legte, dass die Niere der Haupteliminationsweg für Bikunin ist [Hochstrasser et al., 1974]. Dieselbe Schlussfolgerung konnte später auch nach Tierexperimenten gezogen werden, bei denen Mäusen und Ratten intravenös ^{125}I -markiertes Bikunin injiziert worden war [Sugiki et al., 1989; Sjöberg et al., 1995].

1.2.3.2. Vorkommen und Funktion von Inter- α -Inhibitor

Die Proteine der Inter- α -Inhibitor-Familie kommen in relativ hoher Konzentration (etwa 1mg/ml) im menschlichen Serum/Plasma vor [Salier et al., 1996]. Dieser hohe Blutspiegel deutet auf eine essentielle Bedeutung dieser Proteine hin; ebenso wurde noch keine Person mit einer völligen Abwesenheit dieser Inhibitoren entdeckt [Fries und Blom, 2000].

I α I war das erste Mitglied der Inter- α -Inhibitor-Proteinfamilie, das näher charakterisiert wurde [Steinbruch und Loeb, 1961; Salier et al., 1996].

I α I ist an Entzündungsreaktionen, der Wundheilung und Krebsmetastasierungen beteiligt [Bost et al., 1998], wobei eine eher schwache inhibitorische Aktivität gegenüber Proteasen in einer früheren Untersuchung beobachtet wurde [Potempa et al., 1989].

Im Rahmen einer akuten systemischen Entzündungsreaktion wird die Transkription von H3 und H4 gesteigert, während die H2- und AMBP-Transkription supprimiert ist. Die H1-Transkription scheint dagegen unbeeinflusst zu bleiben [Salier et al., 1996]. Folglich sind Bikunin, I α I und Inter- α -like-Inhibitor (I α LI) negative Akute-Phase-Proteine, während P α I ein positives Akute-Phase-Protein darstellt. Die Geninduktion wird durch die wichtigen proinflammatorischen Zytokine IL-1 und IL-6 vermittelt [Daveau et al., 1993].

I α I ist sehr empfindlich gegenüber der Aktivität von Proteasen, speziell solchen, die von polymorphkernigen Granulozyten freigesetzt werden [Albani et al., 1997]. Während infektiöser Erkrankungen, Krebs oder Pankreatitis steigt in den Patienten die Neutrophilendegranulation deutlich an. Daher sind die Leukozytenproteasen wenigstens teilweise für die Abnahme des I α I-Plasmaspiegels der Patienten bei diesen Erkrankungen verantwortlich [Witte et al., 1982; Chawla et al., 1984; Viedma et al., 1994].

Eine Vorinkubation von neutrophilen Granulozyten und Endothelzellen mit Bikunin führt zu einer Inhibierung des LPS-induzierten intrazellulären Anstiegs von Ca^{2+} im Zytoplasma, was möglicherweise auf eine Blockade von Calciumkanälen durch das Bikunin zurückgeht [Kanayama et al., 1995a]. Weiterhin wurde gezeigt, dass Bikunin die Noradrenalin-induzierte Kontraktion glatter Gefäßmuskeln ebenso wie die LPS-induzierte Kontraktion glatter uteriner Muskeln inhibieren kann [Kanayama et al., 1995b] und kultivierte Amnionzellen vor der Stimulation durch $\text{IL-1}\beta$ und $\text{TNF-}\beta$ schützt [Maradny et al., 1994]. Alle diese Effekte können mit einer Blockade des Ca^{2+} -Einflusses in Zellen durch das Bikunin erklärt werden [Kaga et al., 1996]. Die Beobachtung, dass der maximale inhibitorische Effekt von Bikunin bei einer Konzentration zustande kommt, die nahe der Konzentration von Bikunin im Plasma ist, und dass Inter- α -Inhibitor nicht aktiv ist [Kanayama et al., 1998], lässt außerdem vermuten, dass die proteolytische Freisetzung von Bikunin aus $\text{I}\alpha\text{I}$ eine modulierende Funktion hat.

1.3. Zielsetzung der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob Neugeborene, die an einer Sepsis erkrankt sind, eine im Vergleich zu nicht-septischen Neugeborenen veränderte Inter- α -Inhibitor-Plasmakonzentration aufweisen. Hierzu sollte zunächst ein ELISA-Verfahren etabliert werden, für das ein monoklonaler (MAb 69.26) und ein polyklonaler (PAb R-16) Antikörper zur Verfügung standen.

Im Einzelnen sollten:

1. beide Antikörper (MAb 69.26 und PAb R-16) in ausreichender Menge gereinigt werden.
2. $\text{I}\alpha\text{I}$ in ausreichender Menge für die Standardisierung des ELISA isoliert werden.
3. unter Verwendung der Antikörper und des gereinigten $\text{I}\alpha\text{I}$ ein ELISA im Sandwich-Verfahren zur Quantifizierung von $\text{I}\alpha\text{I}$ entwickelt und optimiert werden.
4. mit dem ELISA untersucht werden, ob es eine Korrelation zwischen dem $\text{I}\alpha\text{I}$ -Plasmaspiegel und der Diagnose einer Sepsis bei Neugeborenen gibt.