

4. Diskussion

4.1. Methoden zur Etablierung des ELISA

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob es einen Zusammenhang zwischen der Inter- α -Inhibitor-Konzentration im Plasma und der Diagnosestellung einer Sepsis bei Neugeborenen gibt. Die Analyse der Plasmaproben erfolgte dabei mittels Sandwich-ELISA, der hierfür zuerst etabliert wurde. Für die Durchführung des ELISA war es notwendig, sowohl den MAb 69.26 als auch den PAb R-16 über Protein A-Immunaффinitätschromatographie zu reinigen. Weiterhin war es erforderlich, I α I über mehrere Chromatographieschritte in ausreichenden Mengen zu isolieren, um Standardkurven im Rahmen der Messreihen erstellen zu können.

Für die Durchführung bestimmter biochemischer Untersuchungen (z.B. ELISA) haben sich Antikörper der Ig-Klasse G als besonders günstig erwiesen. Für die Isolierung dieser Immunglobuline aus Aszitesflüssigkeit oder Zellkulturüberstand kann die unterschiedliche Bindungsaffinität der verschiedenen Ig-Klassen zu Protein A bzw. Protein G genutzt werden [Josic et al., 1987]. Diese Bindungsaffinität ist vom Ig-Typ sowie Ig-Subtyp abhängig [MacKenzie et al., 1978; Ey et al., 1978; Bjork und Kronvall, 1984]. Aufgrund der guten Bindungsaffinität zu Protein A bzw. Protein G können IgG, z.B. im Rahmen von Chromatographien, von anderen Ig-Typen (z.B. IgM) getrennt werden, die weder an Protein A noch an Protein G binden. Auch in der vorliegenden Arbeit wurde eine Immunaффinitätschromatographie über Protein A dazu verwendet, sowohl den MAb 69.26 aus Aszites als auch die IgG-Fraktion aus dem Antiserum R-16 zu reinigen. Bei Ausbeuten von 1mg/ml IgG (für den MAb 69.26) bzw. 3mg/ml IgG (für den PAb R-16) lagen die Ausbeuten dieses Standardverfahrens ähnlich hoch wie sie in anderen Arbeiten erzielt wurden [Lim, 1990; Baum, 1994].

Durch Immunblotanalyse konnte gezeigt werden, dass der MAb 69.26 sich gegen die leichte Kette (Bikunin) der I α I-Proteine richtet. Daher wird in dem ELISA, der im Rahmen dieser Arbeit etabliert wurde, nicht nur die Konzentration der I α I-Proteine (d.h. kovalentgebundenes Bikunin im I α I und P α I) bestimmt, sondern auch die Konzentration von freiem Bikunin gemessen.

Die benötigten Mengen an I α I wurden aus humanem Plasma über drei verschiedene Chromatographieschritte gewonnen. Als erster Schritt wurde eine Anionenaustausch-Chromatographie durchgeführt, wodurch Plasmaproteine in Abhängigkeit von ihrer Ladung aufgetrennt werden. Durch diesen Reinigungsschritt konnte bereits ein Großteil weiterer Plasmabestandteile vom I α I getrennt werden. Im zweiten Schritt, der Hydroxylapatit-Chromatographie, durch die Proteine hauptsächlich nach ihrer spezifischen Wechselwirkung mit dem hydrophoben Säulenmaterial aufgetrennt werden, wurde I α I in einer späten Fraktion eluiert, sodass auch durch diesen Chromatographieschritt eine zusätzliche Anreicherung von I α I möglich war. Der dritte und für die endgültige Isolierung von I α I entscheidende Schritt der Reinigung war die Immunaффinitäts-Chromatographie. Hierfür wurde zunächst der aufgereinigte MAbs 69.26 kovalent an CNBr-Sepharose gekoppelt, damit im nächsten Schritt das I α I aus der vorgereinigten Lösung spezifisch an die Säulenmatrix gebunden und anschließend eluiert werden konnte. Die MAbs 69.26-Sepharose-Säule hatte allerdings eine geringe Kapazität, sodass dieser letzte Reinigungsschritt mehrmals wiederholt werden musste, um eine genügende Menge an gereinigtem I α I zu erhalten. Gemessen an dem Bandenmuster nach Auftrennung durch SDS-PAGE konnte I α I mit einer Reinheit von über 98% gewonnen werden.

Mit dem in dieser Arbeit vorgestellten dreistufigen Reinigungsverfahren steht erstmals ein Verfahren zur Verfügung, in dem systematisch die einzelnen Schritte zur Reinigung von I α I quantitativ dokumentiert wurden. Die dabei erzielten Ergebnisse der Isolierung (Ausbeute und Reinheit von I α I) liegen im Bereich von anderen Arbeiten, in denen die Reinigung von I α I-ähnlichen Plasmaproteinen beschrieben wurde. So waren z.B. mittels Dextransulfat-Chromatographie [Choi-Miura et al., 1995] oder 1A4-Sepharose-Chromatographie [Choi-Miura, 2001] mit 85% ähnlich hohe Ausbeuten wie in dieser Arbeit erzielt worden.

Mit den gereinigten Antikörpern und dem gereinigten I α I konnte ein Sandwich-ELISA aufgebaut werden. Die Etablierung erfolgte nach einem Standardprotokoll [Baum, 1994], wobei die einzelnen ELISA-Schritte in der Reihenfolge des Protokolls optimiert wurden. Hierbei wurden zu jedem Schritt serielle Verdünnungsreihen angefertigt, um die optimale Konzentration des jeweiligen Agens (einzusetzender 1. Antikörper, Sekundäntikörper, Substrat) zu ermitteln. Dabei war es wichtig, die Bedingungen so zu wählen, dass sich positive Messwerte deutlich von negativen unterscheiden, dass der Hintergrund durch unspezifische Bindungen bei zu hohen Substratkonzentrationen nicht zu groß wird und dass unterschiedliche I α I-Konzentrationen zu signifikant unterschiedlichen Extinktionen führen. Außerdem muss der ELISA reproduzierbare Ergebnisse liefern. Die in dieser Arbeit

ermittelten optimalen Konzentrationen der einzelnen Faktoren (MAb 69.26 1:100 verdünnt in Kopplungspuffer; Plasmaproben 1:500 verdünnt in PBS; biotinylierter PAb R-16 1:750 verdünnt in PBS; HRP-Streptavidin 1:2000 verdünnt in PBS) liegen im Bereich derjenigen Konzentrationen, die sich als günstig zur erfolgreichen Durchführung ähnlicher ELISA erwiesen haben [Lim, 1990; Baum, 1994]. In der vorliegenden Arbeit ließen sich unter diesen Umständen im ELISA-Ansatz I α I-Konzentration von 0,1-3,4 μ g/ml nachweisen. Durch diesen Sensitivitätsbereich können mit diesem ELISA-Protokoll I α I-Plasmakonzentration von 0,05-1,7mg/ml quantifiziert werden.

4.2. Inter- α -Inhibitor als diagnostischer Marker bei neonataler Sepsis

In der Arbeit wurde mit Hilfe des etablierten Sandwich-ELISA zunächst untersucht, wie sich die Konzentration von Inter- α -Inhibitor im Plasma von gesunden Neugeborenen verhält.

Zunächst konnte gezeigt werden, dass die I α I-Plasmakonzentration bei gesunden Neugeborenen zum Zeitpunkt der Geburt unabhängig vom Gestationsalter niedrig ist (im Mittel 0,44mg/ml bei einer Standardabweichung von 0,21mg/ml) und innerhalb der ersten Tage postpartum rasch und deutlich ansteigt (im Mittel auf 0,80mg/ml bei einer Standardabweichung von 0,25mg/ml). Dabei wurden I α I-Plasmakonzentrationen erreicht, die sich von denen gesunder Erwachsener nicht signifikant unterscheiden. Es konnte außerdem nachgewiesen werden, dass die I α I-Produktion der Neugeborenen unabhängig von der Mutter stattfindet. Diese Ergebnisse lassen zusammenfassend darauf schließen, dass Kinder pränatal bereits eine gewisse Menge an I α I selber herstellen, um die Produktion in den ersten Tagen nach der Geburt deutlich zu steigern. Hieraus ergab sich die Notwendigkeit, auf Nabelschnurblut für die Plasmaproben der Kontrollgruppe zu verzichten und stattdessen postnatales Plasma zu verwenden. Es ist noch unklar, ob es einen Zusammenhang zwischen dem Gestationsalter und dem Verlauf des Anstieges der I α I-Plasmakonzentration gibt. Möglicherweise steigt die I α I-Konzentration bei reif-geborenen Kindern schneller an.

Die relativ geringe I α I-Plasmakonzentration zum Zeitpunkt der Geburt und der deutliche Anstieg postpartum hängt vermutlich mit dem Reifen des Immunsystems zusammen, an dem I α I mitwirkt [Baek et al., 2003]. Obwohl das Immunsystem Wochen benötigt, um seine volle Funktionstüchtigkeit zu erlangen, kann man davon ausgehen, dass die verschiedenen Komponenten des Immunsystems unterschiedlich lange zur Reifung brauchen. I α I wäre in diesem Sinne ein rasch ausreifender Bestandteil der Immunabwehr.

In dieser Arbeit konnte eine signifikante Abnahme der I α I-Konzentration bei Neugeborenen mit einer bakteriologisch gesicherten Sepsis nachgewiesen werden. Diese Folge entspricht Befunden aus Sepsisstudien bei Erwachsenen [Lim et al., 2003]. Offenbar stellt I α I einen allgemeinen diagnostischen Sepsismarker dar, der als ein Basisindikator für die Initiierung oder Weiterführung einer antibiotischen Therapie verwendet werden könnte. Allerdings sollten zur Sicherung dieser Schlussfolgerung noch einige Fragen geklärt werden. So sollte z.B. analysiert werden, wie sich der I α I-Spiegel verhält, wenn ein klinischer Verdacht auf eine Sepsis besteht, aber die Blutkultur negativ ist, und die Sepsis nicht wie bei den Proben der Neugeborenen in dieser Studie mikrobiologisch gesichert wurde. Für eine entsprechende Studie zur Klärung dieser Fragen müssten Untergruppen gebildet werden, um eine Sepsis mit positiver Blutkultur von den Fällen mit negativer Blutkultur abzugrenzen. Bei negativer Blutkultur müsste weiterhin untersucht werden, ob tatsächlich keine Sepsis oder aber eine intermittierende bzw. transiente Bakteriämie vorliegt.

Die deutlich verringerte I α I-Plasmakonzentration bei neugeborenen und erwachsenen Patienten während einer Sepsis könnte durch eine vermutete, sepsis-abhängige proteolytische Spaltung zirkulierender I α I-Proteinkomplexe verursacht sein. Bei der zugrunde liegenden akuten Entzündungsreaktion wird aufgrund dieser Spaltung Bikunin freigesetzt, das dann rasch aus dem systemischen Blutstrom über die Harnwege eliminiert wird. Zusätzlich wird während einer schweren Entzündungsreaktion die hepatische I α I-Synthese herunterreguliert [Daveau et al., 1993].

Weiterhin konnte in der vorliegenden Arbeit in Längsschnittstudien von septischen Neugeborenen gezeigt werden, dass der I α I-Spiegel unter antibiotischer Therapie innerhalb von 4-12 Tagen schnell wieder ansteigt. Daher könnte I α I auch als prognostischer Marker in der Überwachung einer antibiotischen Therapie von Nutzen sein.

Die in dieser Studie beobachtete signifikante Reduktion der Gesamt-I α I-Protein-Plasmakonzentration, d.h. die Nettoabnahme von I α I und P α I bei Kindern mit neonataler, bakterieller Sepsis, entspricht dem Befund, dass beide Hauptformen der I α I-Proteine (I α I und P α I) als Akute-Phase-Proteine charakterisiert worden sind [Daveau et al., 1993]. In einer weiteren Studie wurde bei erwachsenen Patienten mit einer Sepsis eine signifikante Abnahme der I α I-Plasmakonzentration beobachtet, jedoch war es nicht möglich eine Prognose des Sepsisverlaufes aufgrund der initialen I α I-Konzentration zu machen. Allerdings war die I α I-Abnahme bei schwerer Sepsis und septischen Schock größer als bei unkomplizierten

Sepsisfällen [Balduyck et al., 2000]. In einer zweiten Studie ist bei Erwachsenen mit einer schweren Sepsis oder septischem Schock ebenfalls eine signifikante Abnahme der totalen I α I-Proteinkonzentration im Plasma beschrieben worden [Lim et al., 2000]. In dieser Arbeit verhielt sich die I α I-Plasmakonzentration umgekehrt proportional zur Mortalität bei Patienten mit schwerer Sepsis, weshalb den I α I-Proteinen eine potentielle klinische Bedeutung als prognostischer Marker bei Sepsis zugeschrieben wurde [Lim et al., 2000].

Bevor I α I als diagnostischer und prognostischer Marker verwendet werden kann, sollte zunächst überprüft werden, wie spezifisch die Abnahme der I α I-Konzentration für eine Sepsis ist bzw. bei welchen Erkrankungen sich ebenfalls die I α I-Plasmakonzentration ändert.

Von Vorteil bei der I α I-Diagnostik ist, dass nur eine sehr geringe Blutplasmamenge für die Quantifizierung im ELISA benötigt wird. Von Nachteil dagegen ist, dass eine I α I-Abnahme bzw. eine vermehrte Ausscheidung von I α I-Abbauprodukten möglicherweise nicht spezifisch für eine Sepsis ist, da bei Erwachsenen auch bei einigen Krebserkrankungen eine Verringerung der I α I-Plasmakonzentration beobachtet wurde [Trefz et al., 1991]. Weiterhin ist der Zeitaufwand, der mit einem ELISA einhergeht, von Nachteil für die Verwendung von I α I als Marker. So könnten Ergebnisse bei vorbereiteten ELISA-Platten zwar innerhalb von sechs Stunden und somit wesentlich schneller als bakteriologische Ergebnisse erhalten werden, aber für eine Erstdiagnostik im klinischen Alltag ist auch dieser Zeitraum zu lang, sodass eine antibiotische Therapie trotzdem vor Eingang der ELISA-Ergebnisse begonnen werden müsste. Die Ergebnisse der I α I-Messung würden sich dann auf die Weiterführung oder Einstellung der antibiotischen Therapie auswirken.

Inter- α -Inhibitor könnte nicht nur zur Diagnose, sondern auch zur Behandlung einer Sepsis eingesetzt werden. So wurde in einem Rattenmodell der Effekt von I α I-Verabreichungen bei polymikrobieller Sepsis untersucht, die mittels zäkaler Ligatur und Punktion induziert wurde [Yang et al., 2002]. Bei fortschreitender Sepsis konnten durch diese I α I-Gaben die hämodynamische Stabilität aufrechterhalten, Organschäden verhindert und die Überlebenschancen signifikant verbessert werden. Diese Ergebnisse legen nahe, dass I α I an der Pathogenese bzw. an der Immunantwort des Körpers auf eine Sepsis beteiligt ist. Aufgrund dieser Befunde ist es vorstellbar, dass eine I α I-Gabe die Balance zwischen Proteasen und deren natürlichen Inhibitoren positiv beeinflusst und so zur Senkung sepsisbedingter Todesfälle beiträgt.

Bisher ist es noch nicht gelungen, erfolgreiche Therapiemöglichkeiten gegen Sepsis zu entwickeln. Allerdings zeigten neue Studien mit Procalcitonin ermutigende Ergebnisse [Leclerc et al., 2003; Luzzani et al., 2003]. Auch aktiviertes Protein C scheint bei ersten klinischen Versuchsreihen sepsis-limitierend zu sein [Bernard et al., 2001]. Unglücklicherweise führt die antikoagulative Aktivität von Protein C zu massiven Nebenwirkungen (z.B. zu schweren Blutungen) bei Kindern, immunsupprimierten Patienten und Patienten mit einem erhöhten Blutungsrisiko sowie speziell bei Patienten, die an einer Thrombozytopenie oder einer Neutropenie leiden [Matthay, 2001]. Aktiviertes Protein C hat somit nur einen begrenzten klinischen Wert zur Behandlung von Neugeborenen, im speziellen zur Therapie von untergewichtigen Frühgeborenen, für welche schwere Blutungen wie intraventrikuläre Hämorrhagien eine große Gefahr darstellen.

Ein effektives und sicheres Agens zur Therapie einer Sepsis bei Kleinkindern und Neugeborenen wird dringend benötigt. Da eine Abnahme der $\text{I}\alpha\text{I}$ -Plasmakonzentration bei neonataler Sepsis demonstriert wurde, sollte in einer Longitudinalstudie untersucht werden, ob die Gabe von $\text{I}\alpha\text{I}$ in einem experimentellen neonatalen Sepsismodell zu einer anhaltenden Konzentrationserhöhung von $\text{I}\alpha\text{I}$ im Plasma führt und damit vielleicht den Krankheitsverlauf und die Letalität der neonatalen Sepsis günstig beeinflusst.

Außerdem sollte detaillierter analysiert werden, wie sich der $\text{I}\alpha\text{I}$ -Spiegel bei neonataler Sepsis mit verschiedenen Keimen verhält.