

Aus der Klinik und Poliklinik
für Psychiatrie und Psychotherapie der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. H.-J. Möller

Untersuchungen zur Monozytenaktivierung bei Schizophrenie

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

Vorgelegt von

Jenny Katharina Wagner

aus Bielefeld

2011

Mit Genehmigung der Ludwig-Maximilians-Universität München

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Dipl.-Psych. Norbert Müller

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Günter Stalla

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Helmut Diepolder

Priv. Doz. Dr. med. Peter Kufer

Mitbetreuung durch die Dr. med. Daniela Krause

promovierten Mitarbeiter: Prof. Dr. med. Rudolf Gruber

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 06. 10. 2011

Für Mama und Papa

1	EINLEITUNG	1
1.1	Schizophrenie	1
1.1.1	Von der Dementia praecox zur Erkrankung Schizophrenie	1
1.1.2	Diagnose nach ICD-10 und DSM IV	3
1.1.3	Epidemiologie	5
1.1.4	Ätiologie und weitere Theorien zur Entstehung	6
1.1.5	Infektionshypothesen- pränatal und lebenslang	9
1.1.6	Genetik	12
1.1.7	Therapie	12
1.2	Immunologie	14
1.2.1	Monozyten/ Makrophagen und HLA-DR	15
1.2.2	Angeborene Immunität und Toll-Like Rezeptoren	16
1.2.3	Erworbene Immunität und Zytokine	19
1.3	Zielsetzung	22
2	MATERIAL UND METHODEN	23
2.1	Untersuchtes Kollektiv	23
2.1.1	Studienteilnehmer	23
2.1.2	Blutproben: Durchflusszytometrie, Klinische Chemie und Differentialblutbild	24
2.2	Psychopathologie	25
2.2.1	Beurteilung des Schweregrads: PANSS	25
2.3	Durchflusszytometrie	27
2.3.1	Grundlagen- Definition und Funktion	27
2.3.2	Grundlagen- Physik	27
2.3.3	Immunfluoreszenz	28
2.3.4	Durchflusszytometer: Aufbau und Messung	29
2.3.5	Datenauswertung: Darstellung und Gating	29

2.4	Versuchsaufbau	31
2.4.1	Stimulation	31
2.4.2	Ansätze	31
2.5	Bestimmung der intrazellulären Zytokine TNF- α, IL-1β, IL-6 und IL-10	33
2.5.1	Prinzip	33
2.5.2	Antikörper, Labormaterialien und Geräte	33
2.5.3	Probenverarbeitung	36
2.5.4	Messung und Auswertung	38
2.6	Bestimmung des extrazellulären Zytokins IL-1β	42
2.6.1	Prinzip des High Sensitivity <u>E</u> nzyme- <u>L</u> inked- <u>I</u> mmunosorbent- <u>A</u> ssay (ELISA)	42
2.6.2	Labormaterialien und Geräte	43
2.6.3	Probenverarbeitung	43
2.6.4	Messung und Auswertung	44
2.7	Bestimmung der extrazellulären Toll-like Rezeptoren TLR-2, TLR-3 und TLR-4 und des Aktivierungsmarkers HLA-DR	44
2.7.1	Prinzip	44
2.7.2	Antikörper, Labormaterialien und Geräte	44
2.7.3	Probenverarbeitung	45
2.7.4	Messung und Auswertung	46
2.8	Statistische Auswertung	46
3	ERGEBNISSE	49
3.1	Anamnese	49
3.2	PANSS	52
3.3	CRP und Differentialblutbild	53
3.4	Gruppenvergleich ohne Stimulation	54
3.4.1	Intrazelluläre Zytokine TNF α , IL-1 β , IL-6 und IL-10	54
3.4.2	Extrazelluläres Interleukin IL-1 β	56

3.4.3	Extrazelluläre Toll-like Rezeptoren TLR-2, TLR-3 und TLR-4 und Aktivierungsmarker HLA-DR	57
3.5	Gruppenvergleich nach Stimulation	58
3.5.1	Bakterielles Lipopolysaccharid: Intrazelluläre Zytokine	59
3.5.2	Bakterielles Lipopolysaccharid: Extrazelluläres Zytokin IL-1 β	63
3.5.3	Bakterielles Lipopolysaccharid: Extrazelluläre Toll-like Rezeptoren und Aktivierungsmarker HLA-DR	64
3.5.4	Virales PolyI:C: Intrazelluläre Zytokine	67
3.5.5	Virales PolyI:C: Extrazelluläres Zytokin IL-1 β	69
3.5.6	Virales PolyI:C: Extrazelluläre Toll-like Rezeptoren und Aktivierungsmarker HLA-DR	70
3.6	Korrelationsanalyse der Schizophrenen: klinische Parameter und signifikante Messwerte	73
3.7	Korrelationsanalyse der Gesunden: Alter und signifikante Messwerte	75
4	DISKUSSION	76
4.1	Diskussion der Methodik	76
4.2	Diskussion der Ergebnisse	80
4.2.1	Keine Stimulation	82
4.2.2	Stimulation	87
4.2.3	Korrelationsanalyse der Schizophrenen: klinische Parameter und signifikante Messwerte	93
4.2.4	Korrelationsanalyse der Gesunden: Alter und signifikante Messwerte	95
4.3	Zusammenfassende Interpretation und Ausblick	95
5	ZUSAMMENFASSUNG	99
6	LITERATURVERZEICHNIS	101
7	ANHANG	114

7.1.1	Positive and Negative Syndrome Scale (PANSS)	114
8	DANKSAGUNG	116

1 Einleitung

1.1 Schizophrenie

1.1.1 Von der Dementia praecox zur Erkrankung Schizophrenie

Krankheitssymptome der Schizophrenie werden seit mehreren Jahrhunderten in der Literatur beschrieben. Emil Kraepelin (1856-1926) veröffentlichte 1899 mit der sechsten Auflage seines Lehrbuches eine klassifizierende Zweiteilung der endogenen Psychosen in Dementia praecox und manisch-depressives Irresein, die bis heute Grundlage für weitere Einteilungen ist (Hippius, Müller 2008). In seiner Nosologie (Krankheitslehre) beschrieb er Entitäten ausgehend von Ursachen, klinischen Symptomen, Verlauf und Ergebnis mit dem Ziel einer erfolgreichen Diagnose, Therapie und Prävention (Angst 2002). Er benannte mit dem Term Dementia praecox ein Syndrom, das seinen Beginn im Leben frühzeitig nimmt („praecox“) und fortschreitende und irreversible Beeinträchtigungen der kognitiven und persönlichen Fähigkeiten und Verhaltensweisen produziert („dementia“) (Andreasen, Carpenter, Jr. 1993; Gaebel, Zielasek 2008). Der chronische Verlauf und die schlechte Prognose waren für Kraepelin definierende Charakteristika. Im Dialog mit Eugen Bleuler gestand er später der Dementia praecox in bestimmten Fällen eine Reversibilität zu. Bleuler konzentrierte sich Anfang des 20. Jahrhunderts mehr auf Symptome, die er in grundlegende und akzessorische Symptome unterteilte. Zu den Grundsymptomen zählte er Assoziations- und Affektstörungen, sowie Autismus und Ambivalenz (Tabelle 1). Aufgrund der symptomatologischen Heterogenität schlug er 1911 die Bezeichnung „Gruppe der Schizophrenien“ vor. Der Begriff „Schizophrenie“, zusammengesetzt aus dem Altgriechischen („schizein= abspalten und „phren= Seele), sollte die Zersplitterung des Denkens und der Persönlichkeit betonen. Kurt Schneider unterteilte 1959 die Symptome aufgrund ihrer diagnostischen Wertigkeit in einen ersten und zweiten Rang, wobei die Symptome ersten Ranges als höchst spezifisch für die Diagnose Schizophrenie galten (Andreasen, Carpenter, Jr. 1993; Andreasen 1995). Dabei bezog er sich auf die vorrangigen abnormen Erlebnisse während Halluzinationen, z. B. dialogisierende oder kommentierende Stimmen sowie Gedankenlautwerden, -eingebung, -entzug, -

ausbreitung und Wahrnehmung. Diese Einteilung hatte großen Einfluss auf die Diagnosestellung, die Symptome ersten Ranges stellten sich aber nicht als pathognomisch (die Krankheit kennzeichnend) heraus (Andreasen, Carpenter, Jr. 1993). Karl Kleist unterteilte 1923 Schizophrenie in Subtypen wie paranoid-halluzinatorisch, katatonisch oder hebephren (Ban 2004). Heute gilt die Dementia praecox als eine Form der Schizophrenie mit einer langfristig schlechteren Prognose als eine manisch- depressive Erkrankung (Gaebel, Zielasek 2008).

Symptome	Äußerungen
Grundsymptome	<ul style="list-style-type: none"> • Denkzerfahrenheit (Assoziationsstörung) • Parathymie (Affektstörung) • Ambivalenz • Autismus • Störung des subjektiven Erlebens des eigenen Ichs (Depersonalisation)
Akzessorische Symptome	<ul style="list-style-type: none"> • Halluzinationen • Wahn • Katatone Symptomatik • Störungen der Schrift und der Sprache

Tabelle 1: Unterteilung schizophrener Symptomatik nach E. Bleuler. Grundsymptome kommen immer vor, wenn ein bestimmter Ausprägungsgrad der Erkrankung erreicht ist. Akzessorische Symptome kommen nur gelegentlich bzw. auch bei anderen Erkrankungen vor (Möller, Deister, Schaub, Riedel 2008)

Kraepelins Nosologie wurde im Laufe der Jahrzehnte kritisiert und angezweifelt. Sie bezog sich vor allem auf seinen ätiologischen Ansatz, starke, ursächliche Zusammenhänge zwischen klinischen Symptomen, Verlauf und Ergebnis, Hirnpathologie und anderen neuroanatomischen Veränderungen zu sehen (Jablensky 1999). Seine Kategorisierung durch - meist hypothetische- Ursachen als Grundlage der Klassifikation wurden durch Bonhoeffer 1912 erschüttert, der unterschiedliche somatische Ursachen für psychopathologische Veränderungen entdeckte und umgekehrt (Moller 2008). Bonhoeffer befand eine ätiologische Unterscheidung nur bei somatischen oder neurologischen Manifestationen und nicht bei psychiatrischen Symptomen als sinnvoll. Alfred Hoche wollte 1912 mit seinen Syndrom-Komplexen zeigen, dass gleiche Syndrome unterschiedliche Ursachen haben können und somit eine ätiologisch neutrale Beschreibung einführen (Jablensky 1999). Bis heute hält die Diskussion über die Klassifizierung der Schizophrenie an- im Angesicht neuer Studienergebnisse im Bereich der Epidemiologie, Klinik, Hirnpathologie, Neurophysiologie, Neuroendokrinologie,

Psychoneuroimmunologie, Genetik, Bildgebung und Psychopharmakologie (Boteva, Lieberman 2003; Muller, Schwarz 2008a).

1.1.2 Diagnose nach ICD-10 und DSM IV

Schizophrenie stellt sich als eine umfassende Beschädigung des kognitiven und emotionalen Systems des menschlichen Gehirns dar. Zu den typischen Symptomen zählen formale Denkstörungen, Wahrnehmungsstörungen (Halluzinationen), Wahnphänomene, Ich-Störungen und Störungen der Affektivität. Um die Reliabilität der Diagnose Schizophrenie und der Symptombeschreibung zu verbessern, wurden zwei Klassifikationssysteme entwickelt. Diese sind ICD-10, International Classification of Diseases (10. Auflage) der Weltgesundheitsorganisation WHO (1993), und DSM-IV, Diagnostic and Statistical Manual (4. Auflage) der American Psychiatric Association (1994) (Tabelle 2).

ICD-10	DSM-IV
Schizophrenie (F20) <ul style="list-style-type: none"> • Paranoide Schizophrenie (F20.0) • Hebephrene Schizophrenie (F20.1) • Katatone Schizophrenie (F20.2) • Undifferenzierte Schizophrenie (F20.3) • Postschizophrene Schizophrenie (F20.4) • Schizophrenes Residuum (F20.5) • Schizophrenia simplex (F20.6) • Sonstige Schizophrenie (F20.8) 	Schizophrenie (295.xx) <ul style="list-style-type: none"> • Paranoider Typus (295.30) • Desorganisierter Typus (295.10) • Katatoner Typus (295.20) • Undifferenzierter Typus (295.90) • Residualer Typus (295.60)

Tabelle 2: Klassifikation der Schizophrenie nach ICD-10 und DSM-IV (Möller, Deister, Schaub, Riedel 2008)

Konzept beider Systeme ist das Vorliegen von verschiedensten psychotischen Symptomen sowie Störungen der Affektivität (z. B. Gefühlsarmut, depressive Stimmung, Angst) und der sozialen Interaktion. Zum besseren Verständnis der Symptome wurden Subtypen entwickelt. Diese Unterteilung in „positiv“ und „negativ“ oder „Plus-“ und „Minus-“ Symptome beziehen sich auf eine Über- oder Unteraktivität bestimmter Funktionen. (Tabelle 3). Pathophysiologisch gesehen können so Positiv-Symptome Folge einer Neurotransmitter-Überaktivität sein (Dopamin). Negativ-Symptome sind dagegen durch den Verlust von Neuronen und damit Funktionen bedingt, was durch Computertomographie (CT) visualisiert werden konnte (Crow 1981; Andreasen 1995).

Positiv-Symptome	Negativ-Symptome
<ul style="list-style-type: none"> • Halluzinationen • Wahnphänome • (Positive) formale Denkstörungen (insbesondere Zerfahrenheit) • Bizarres oder desorganisiertes Verhalten 	<ul style="list-style-type: none"> • Alogie (Sprachverarmung) • Affektverarmung • Apathie (Interessen- und Initiativverlust) • Anhedonie (Verlust der Lebensfreude) • Aufmerksamkeitsstörungen

Tabelle 3: Positiv- und Negativ-Symptome schizophrener Psychosen ((Möller, Deister, Schaub, Riedel 2008)

Insgesamt ist zu beobachten, dass meist nicht ein Positiv- oder Negativ-Symptombild vorliegt, sondern die Symptome variieren und instabil sind, vor allem über einen längeren Zeitraum der Erkrankungsdauer (Marneros, Deister, Rohde 1992). Positiv-Symptome sind dabei oft Auslöser für Aufmerksamkeit und Behandlung. Sie gelten als besser therapierbar gegenüber Negativ-Symptomen, die zur Persistenz tendieren und starke Beeinträchtigungen in sozialen und beruflichen Bereichen bewirken können (Andreasen 1995). Merkmale beider Subtypen zählen zu den diagnostischen Kriterien der Klassifikationssysteme. Nach ICD-10 muss mindestens eines der folgenden Merkmale einmal vorhanden sein:

- a) Gedankenlautwerden, -eingebung, -entzug oder -ausbreitung
- b) Kontroll-, Beeinflussungswahn, Gefühl des Gemachten, Wahnwahrnehmung
- c) Kommentierende oder dialogisierende Stimmen oder andere Stimmen, die aus bestimmten Körperteilen kommen
- d) Anhaltender kulturell unangemessener Wahn.

Oder es müssen mindestens zwei der folgenden Merkmale vorhanden sein:

- e) Anhaltende Halluzinationen jeder Sinnesmodalität, begleitet von flüchtigen Wahngedanken oder von lang anhaltenden überwertigen Ideen
- f) Gedankenabreißen oder Einschiebungen in den Gedankenfluss, was zu Zerfahrenheit, Neologismen oder Danebenreden führt
- g) Katatone Symptome (wie Erregung, Haltungstereotypien, wächserne Biegsamkeit, Negativismus, Mutismus, Stupor)

- h) Negativ-Symptome (wie Apathie, Sprachverarmung, verflachte oder inadäquate Affekte).

Ausschlusskriterien sind: Symptome, die den affektiven Störungen (wie Depression oder Manie) zugeordnet werden müssen oder die Folge von Medikamenten oder psychotropen Substanzen darstellen. Unterschiede bei den Kriterien zur Diagnosestellung bestehen bezüglich des Zeitraumes einer psychotischen Episode: ICD-10 erfordert einen Mindestzeitraum von einem Monat, DSM-IV 6 Monate (Möller, Deister, Schaub, Riedel 2008). Außerdem beschreibt DSM-IV eine Verschlechterung der Fähigkeiten im sozialen und beruflichen Bereich („funktionieren“) (Andreasen 1995). ICD-10 wird vor allem in Europa verwendet, DSM-IV im angloamerikanischen Raum.

1.1.3 Epidemiologie

Um die Ursachen und Folgen einer Erkrankung für die Betroffenen und die Gemeinschaft zu ermitteln, werden epidemiologische Forschungen durchgeführt. Die Inzidenz (Anzahl der Neuerkrankungen) der Schizophrenie liegt jährlich bei ca. 8-40/100.000, die Punktprävalenz (Anzahl der erkrankten Individuen zu einem bestimmten Zeitpunkt) liegt bei ca. 2-10/1000 und das Lebenszeitrisiko zu erkranken bei ca. 0,7% (Tandon, Keshavan, Nasrallah 2008b; Tandon, Keshavan, Nasrallah 2008c). Frauen und Männer sind etwa gleich häufig betroffen, wobei die Erkrankung bei Männern früher auftritt (ca. 5 Jahre), häufiger Hirnabnormalitäten zu finden sind und die Prognose schlechter ist (Jablensky 2000a; Boteva, Lieberman 2003). Die drei typischen Altersgruppen, in denen die Erkrankung beginnt, sind: 15-24 Jahre, 25-34 Jahre und 35-59 Jahre. Hier kommen dominierende Symptome vor, wie nicht-spezifische psychotische Symptome in der Pubertät und frühen Adoleszenz, Wahnphänomene und Störungen der Affektivität im Erwachsenenalter und paranoid-halluzinatorische Wahnphänomene und Negativ-Symptome in der letzten Altersgruppe (Hafner, Riecher-Rossler, An Der, Maurer, Fatkenheuer, Loffler 1993). Über 50% der Patienten erkranken vor dem 25. Lebensjahr (Hafner, Maurer, Loffler, Riecher-Rossler 1991). Folgende Umweltfaktoren werden mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko assoziiert: pränatale und frühe Infektionen, perinatale Komplikationen, Geburten

im Winter/Frühling, Epilepsie, Entwicklungsverzögerungen oder – abnormalitäten im motorischen, verbalen oder koordinativen Bereich, Defizite in sozialer Kompetenz, Cannabiskonsum, Migration und Leben in der Großstadt (Mednick, Machon, Huttunen, Bonett 1988; Jablensky 2000a; Jablensky 2000b; Boteva, Lieberman 2003; Davies, Welham, Chant, Torrey, McGrath 2003; Semple, McIntosh, Lawrie 2005; Fearon, Kirkbride, Morgan et al. 2006; Tandon, Keshavan, Nasrallah 2008a).

Betrachtet man die Erkrankung Schizophrenie unter sozialen und volkswirtschaftlichen Aspekten, ist Schizophrenie eine nachhaltige und belastende Erkrankung, für den Einzelnen, seine Familie und für die Gesellschaft insgesamt. Weltweit ist etwa 1% der Bevölkerung betroffen. Aufgrund des meist frühen Beginns (15-25 Jahre) können die Betroffenen oft kein altersentsprechendes Leben führen: Schulabschluss, Studium, Berufsleben, Heirat und Kinder. „Die Opfer der Schizophrenie fühlen sich oft, als hätten sie ihre Identität, Autonomie und mentale Kapazität verloren“ (Andreasen 1995). Die Mortalität ist insgesamt hoch (Tandon, Belmaker, Gattaz et al. 2008). 5% der Erkrankten versterben durch Suizid (Melle, Johannesen, Friis et al. 2006). 1980 betrug in den USA die Kosten von Schizophrenie verursacht durch Produktionsausfall ca. 20 Billionen Dollar¹, die Kosten der weiteren medizinischen Versorgung und der sozialen Unterstützung zusätzliche 11 Billionen Dollar (Andreasen 1995). Die Kosten für die antipsychotische Therapie vervielfachten sich im letzten Jahrzehnt von rund 0,5 Billionen auf mehr als 15 Billionen Dollar (Hoenberg, Goetz 2006).

1.1.4 Ätiologie und weitere Theorien zur Entstehung

Die Ätiologie der Schizophrenie ist multifaktoriell, die Pathophysiologie ist bis heute nicht abschließend und allumfassend geklärt. Genetik, exogene Einflüsse und biochemische Abnormalitäten können zur so genannten Neuroentwicklungsstörung führen (Abbildung 1).

¹ Amerikanische Billionen entsprechen den deutschen Milliarden.

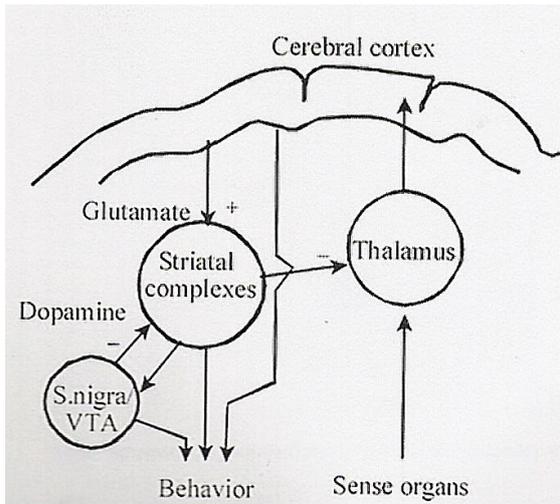


Abbildung 1: Schizophrenierelevanter Regelkreis der Neurotransmitter auf Verhalten und damit Produktion von Symptomatik. Dopamin entstammt dem ventralen Mittelhirn (Substantia nigra und ventrale tegmentale Region (VTA)), Glutamat kommt ubiquitär vor. Quelle: The neurochemical Circuitry of Schizophrenia (Carlsson 2006b)

Den Neurotransmittern wird seit über 40 Jahren eine wichtige Rolle zugeschrieben, vor allem dem Dopamin (Iversen, Iversen 2007). Die Schaltkreise des Gehirns stehen im Gleichgewicht von Aktivierung und Hemmung. Durch eine Überaktivität dopaminergischer und eine Unterfunktion glutaminerger Strukturen im mesolimbischen System (cortico-striatale-thalamo-corticale Bahn) wird dieses Gleichgewicht gestört. Der Thalamus, der Filter der sensorischen Information, ist bei Schizophrenie betroffen. Dopamin wirkt unterschiedlich; die schizophrenierelevanten Wirkungen sind Beeinflussungen der Emotionalität und Gedächtnisfunktion (mesolimbisch) sowie der kognitiven Funktionen (mesokortikal). Ein hyperaktives mesolimbisches dopaminerges System kann vor allem positive Symptome verursachen, ein hypoaktives mesokortikales System vor allem negative und kognitive Symptome (Weinberger 1987; Davis, Kahn, Ko, Davidson 1991). Glutamat ist der wichtigste exzitatorisch wirksame Transmitter für efferente und afferente Informationen intrakortikal und thalamisch-kortikal. Glutaminerge Störungen führen also zu erheblicher Desorganisation höherer Hirnfunktionen (Bogerts 2008a). Die Informationsverarbeitung und -weitergabe von inneren und äußeren Reizen an den Kortex ist übersteigert und inkorrekt, was psychotische Symptome verursacht (Carlsson 2006a; Muller, Schwarz 2008b). Unterstützt wird diese Theorie durch die Wirksamkeit der Neuroleptika am Dopamin-D2-Rezeptor, durch erniedrigte Glutamatkonzentrationen im Liquor (Carlsson 2006d; Muller, Schwarz 2008b) und durch die Fähigkeit von Phencyc-

lidine (PCP) oder anderen Halluzinogenen durch Blockade des Glutamat- N-methyl-d-aspartate (NMDA)-Rezeptors psychotische Symptome auszulösen (Carlsson 2006c; Stone, Morrison, Pilowsky 2007). Des Weiteren bestehen Abnormalitäten in weiteren Neurotransmittersystemen wie bei der zentralen GABA-Neurotransmission und im cholinergen sowie serotonergen System (Lewis, Hashimoto 2007; bi-Dargham 2007; Raedler, Bymaster, Tandon, Copolov, Dean 2007).

Neuropathologische und bildgebende Untersuchungen zeigen hirnstrukturelle Abnormalitäten. Bei 30-50 % der Schizophrenen liegen nach computertomographischen Darstellungen Erweiterungen der Seitenventrikel, des 3. Ventrikels und der zerebralen Sulci vor. Im MRT zeigte sich eine Verminderung des Gesamthirnvolumens (Lawrie, Abukmeil 1998). Der mediale Temporallappen, Lokalisation des limbischen Systems mit Thalamus, ist die Konvergenzstelle von Informationen aus dem gesamten Gehirn (höhere assoziative Kortexareale, Frontal-, Parietal- und Temporallappen) (Bogerts 2008b). Hier fanden sich Veränderungen, ebenso Unterschiede der Hemisphärensymmetrie und Hippocampusabnormalitäten (Harrison 1999; Heckers 2001; Iritani 2007). Strukturelle Veränderungen führen zu erheblichen funktionellen Veränderungen in Bezug auf situative Analysefähigkeiten, Reizausfilterung, Gedächtnis, Urteilsvermögen über Vergangenheit und Gegenwart sowie Assoziationsfähigkeiten.

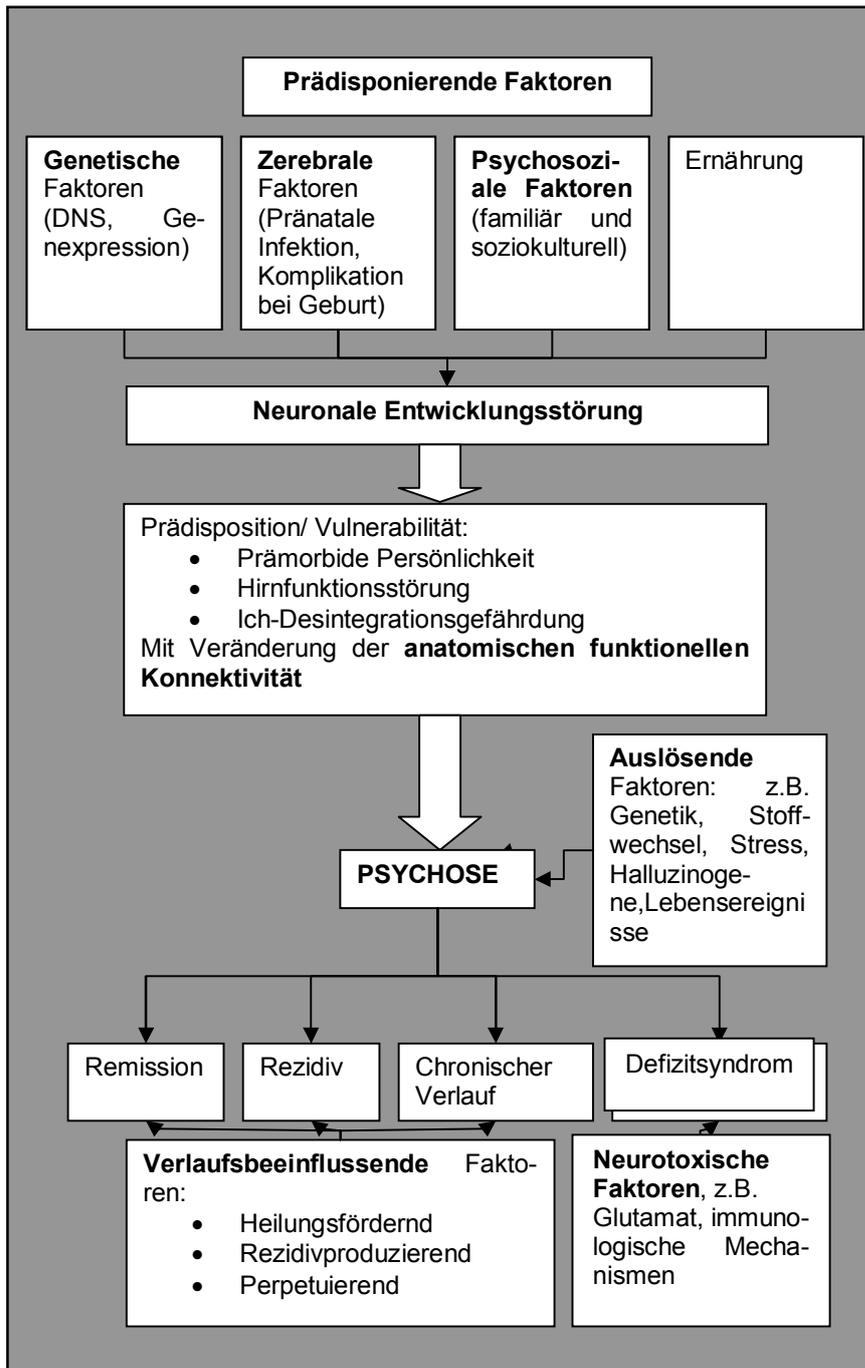


Abbildung 2: Multifaktorielle Ätiopathogenese der psychotischen Symptomatik unter Einbeziehung der Hirnentwicklungsstörung und Ausgang der Psychose (Remission bis Fortschreiten). (Modifikation:(Möller H-J 2005; Möller, Deister, Schaub, Riedel 2008)

1.1.5 Infektionshypothesen- pränatal und lebenslang

Infektionen mit Viren oder Bakterien werden seit längerer Zeit als Risikofaktoren für den Ausbruch und die Unterhaltung der Erkrankung Schizophrenie diskutiert. Dabei wurden sowohl die pränatalen Infektionen des Feten durch die Mut-

ter berücksichtigt, als auch Infektionen während der Kindheit und des Erwachsenenlebens (Brown 2008).

Brown zeigte in einer Geburtenkohortenstudie, dass die pränatale Infektion mit dem Rubellavirus, Influenzavirus oder dem Protozoon *Toxoplasma gondii* das Erkrankungsrisiko steigern. Dabei erhöhte Rubella das Erkrankungsrisiko 10-20fach, Influenza abhängig vom Zeitpunkt der Infektion 7-fach (1. Trimenon) und 3-fach (2. Trimenon) und *T. gondii* 2 ½-fach. Rubella und *T. gondii* wirken im zentralen Nervensystem teratogen, so dass die Infektionen Einflüsse auf die zentrale Gehirnentwicklung haben können (Muller 2004; Brown, Schaefer, Quisenberry, Jr., Liu, Babulas, Susser 2005). Insbesondere *T. gondii* stellt eine ätiologische Verbindung zur Schizophrenie dar; es ist neurotrop, beeinflusst Neurotransmitter, ist durch antipsychotische Medikamente supprimierbar und die Infektion ist genetisch prädisponiert (Torrey, Yolken 2007). Das fetale Gehirn ist während der Schwangerschaft besonders anfällig; gestörte neuronale Entwicklung kann neben Infektionen als Ursachen mit Umweltfaktoren, neuropsychologischen, genetischen und immunologischen Faktoren zusammenhängen. Virale Infektionen können durch direkte Gehirnläsion oder durch Triggerung von autoimmunen Reaktionen während der Reifung eines genetisch anfälligen Gehirns Schäden und Einschränkungen bewirken (Fruntes, Limosin 2008). Im Tiermodell wurden virale und bakterielle Infektionen simuliert, um die pränatalen Infektionshypothesen zu testen. Zuckermann und Weiner bewirkten 2003 eine veränderte Immunantwort in den Muttertieren nach PolyI:C-Stimulation im 2. Trimenon. Die Nachkommen zeigten schizophrenie-typisches Verhalten, dopaminerge Überfunktion und veränderte Strukturen im limbischen System, mit Besserung der Symptomatik durch Clozapin (Zuckerman, Rehavi, Nachman, Weiner 2003). Dopamin-Überfunktion und kognitive Beeinträchtigungen bei erwachsenen Nachkommen von (PolyI:C-) immunaktivierten Müttertieren zeigten auch Ozawa et al (Ozawa, Hashimoto, Kishimoto, Shimizu, Ishikura, Iyo 2006). Es konnte ein Ungleichgewicht zwischen Aktivierung und Hemmung der Neurotransmitter während der Fetalperiode viral infizierter Rattenfeteten (LCMV=lymphozytäres Chorionmeningitis Virus) nachgewiesen werden (Fruntes, Limosin 2008). Fourtier et al stimulierten 2004 schwangere Ratten mit bakteriellem Lipopolysaccharid (LPS) und induzierten die mütterliche Immun-

antwort. Die Nachkommen zeigten daraufhin erhöhte Schreckreaktionen und erhöhte Amphetamin-induzierte Bewegungen (Fortier, Jooper, Luheshi, Boksa 2004). Pro-inflammatorisch wirkende Zytokine könnten Infektion und Schizophrenie verbinden. Brown zeigte zweifach erhöhte Interleukin-8 (IL-8)-Serumlevel bei Müttern von Kindern, die später an Schizophrenie erkrankten. Ashdown et al beobachteten im Tiermodell Anstiege von TNF α , IL-1 und IL-6 im mütterlichen Plasma und Plazenta nach pränataler LPS-Stimulation. Der Fetus zeigte dagegen nur einen IL-1-Anstieg in seinem Plasma. Es liegt die Annahme nahe, dass eine mütterliche Exposition zum bakteriellen Antigen nicht direkt die kindliche Gehirnentwicklung beeinflusst, sondern durch indirekte Mechanismen auf Ebene der Zirkulation und Plazenta (Ashdown, Dumont, Ng, Poole, Boksa, Luheshi 2006). Die Veränderung der Zytokinlevel im fetalen Entwicklungsbereich aber (Fruchtwasser, Plazenta, Gehirn), kann erhebliche Einflüsse auf die Gehirnentwicklung haben (Urakubo, Jarskog, Lieberman, Gilmore 2001). Auch pränatale Malnutrition führte bei unterversorgten schwangeren Ratten zu Anstiegen von TNF α und IL-6 in der Plazenta und der fetalen Leber, hingegen zu einem Abfall im fetalen Gehirn (Shen, Li, Sun et al. 2008).

Dalman et al veröffentlichten 2008 eine Kohortenstudie mit rund 1,2 Millionen Kindern, die einen Zusammenhang zwischen viralen ZNS-Infektionen während der Kindheit und der späteren Ausbildung einer Schizophrenie herstellte. Den beiden spezifischen Viren Mumps und CMV wurde dabei die Fähigkeit der direkten Gehirnparenchyminvasion zugeschrieben (Dalman, Allebeck, Gunnell et al. 2008). Die bakteriellen Infektionshypothesen wurden durch eine Assoziation zwischen Chlamydieninfektionen und Schizophrenie unterstützt (Fellerhoff, Laumbacher, Mueller, Gu, Wank 2007). *T.gondii* wird eine Verursachung von latenten Infektionen in Neuronen und Gliazellen zugeschrieben, die Schizophrenie begünstigen können (Carruthers, Suzuki 2007). Niebuhr et al fanden eine signifikante positive Assoziation zwischen *T. gondii* IgG-Antikörpern bei schizophrenen US-Soldaten in Serumproben im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe (Niebuhr, Millikan, Cowan, Yolken, Li, Weber 2008).

1.1.6 Genetik

Die genetische Vulnerabilität spielt eine bedeutende Rolle in der Entwicklung einer Schizophrenie. Das Erkrankungsrisiko steigt bei zunehmendem Verwandtschaftsgrad zu einem schizophrenen Familienmitglied. In Zwillingsstudien zeigten sich Konkordanzraten von ca. 50% für eineiige Zwillinge, allerdings nur 10-15% bei Zweieiigen (Jablensky 2000a). In Adoptionsstudien fiel auf, dass adoptierte Kinder mit einem schizophrenen leiblichen Elternteil ihr Erkrankungsrisiko nicht verringern- obwohl vermehrt umwelt- und psychosoziale Faktoren Einfluss nehmen (Tienari 1991). Durch die familiengenetischen Studien geht man von einem polygenen Erbgang aus (Propping, Nothen, Korner, Rietschel, Maier 1994); so fanden sich durch die Molekulargenetik mehrere Genloki, die als schizophrenierelevant gelten. Diese sind:

- Dysbindin- Gen auf Chromosom 6p (DTNBP1)
- Neuroregulin-1-Gen auf Chromosom 8p (NRG1)
- Genlokus auf 13q (G72/G30)
- Mikrodeletion auf Chromosom 22q (bei 1-3% der Schizophrenen)

Ihre Funktionen werden zunehmend bekannt. Dysbindin wirkt bei der Expression präsynaptischer Proteine und Glutamat sowie dem Untergang kortikaler Zellen mit (Maier, Lichtermann, Rietschel et al. 1999). Neuroregulin-1 und Genprodukte von G72/G30 beeinflussen den glutaminergen NMDA-Rezeptor und postsynaptische Proteine im glutaminergen System im Hippocampus (Bassett, Chow 1999; Maier 2008; Fruntes, Limosin 2008). Neuroregulin kontrolliert während der neuronalen Entwicklung Myelinisierung und Oligodendroglia und beeinflusst Konnektivität und Signalübertragung (Corfas, Roy, Buxbaum 2004; Chen, Velardez, Warot et al. 2006).

1.1.7 Therapie

Die Therapie der Schizophrenie wird in Psychopharmakotherapie und psychosoziale Therapie unterteilt. Die Neuroleptika (Antipsychotika) bilden die Basis für die pharmakologische Behandlung. Die antipsychotischen Wirkmechanismen der synaptischen Erregungshemmung zielen alle auf das dopaminerge System (Dopaminrezeptorblockade (D1/D2) im limbischen System und fronta-

len Kortex). Im unterschiedlichen Ausmaß werden ebenfalls noradrenerge $\alpha 1$ – und $\alpha 2$ - sowie serotinerge 5-HT₂-Rezeptoren und Histamin-H₁- und muskari-nerge Acetylcholinrezeptoren blockiert. Unterteilt werden sie in zwei Klassen: typische (klassische, alte, Antipsychotika der 1. Generation, first generation antipsychotics= FGAs) und atypische Neuroleptika (neue, Antipsychotika der 2. Generation, second generation antipsychotics= SGAs) (Miyamoto, Duncan, Marx, Lieberman 2005; Möller, Deister, Schaub, Riedel 2008). Zu den typischen Neuroleptika zählen Chlorpromazin und Reserpin, deren Entdeckung und Charakterisierung in den 40iger und 50iger Jahren die Psychiatrie revolutionierten (Grunder, Hippus, Carlsson 2009). Insgesamt existieren 51 typische Neuroleptika (Tandon et al. 2008). Die Entwicklung der atypischen Neuroleptika begann in den 70er Jahren mit Clozapin, es kamen weitere 10 hinzu wie z.B. Risperidon, Olanzapin, Quetiapine, Ziprasidon, Sertindol und Zotepin (Miyamoto, Duncan, Marx, Lieberman 2005). Die Kriterien in der Auswahl des Neuroleptikums beziehen sich auf das Wirk- und Nebenwirkungsprofil. Die Typika sollen eher auf die Positivsymptomatik wirken, beeinflussen weniger gut die kognitiven Störungen und führen zu mehr Nebenwirkungen, vor allem zu den extrapyramidal-motorischen Begleitwirkungen (= EPS: Frühdiskinesie, Parkinson-Syndrom, Akathisie, Spätdiskinesie). Die Atypika sollen erfolgreicher Negativsymptomatik, kognitive Störungen und Affektivität beeinflussen, werden zur Rückfallprävention eingesetzt und verbessern die Lebensqualität durch weniger EPS im Vergleich zu den Typika. Die sedierenden und axiolytischen Effekte sind abhängig vom Neuroleptikum und der Dosierung. Die unerwünschten Begleitwirkungen werden durch die verschiedenen zentralnervösen Rezeptorblockaden verursacht. Sie sind vor allem EPS, endokrine Störungen durch den Prolaktinanstieg, anticholinerge Nebenwirkungen, Gewichtszunahme, Hyperlipidämie, Sedierung und Blutdruckabfall (Richelson, Nelson 1984; Miyamoto, Duncan, Marx, Lieberman 2005; Möller, Deister, Schaub, Riedel 2008; Leucht, Corves, Arbter, Engel, Li, Davis 2009). Insgesamt wird über die Vor- und Nachteile der typischen und atypischen Neuroleptika stetig diskutiert. Auffällig ist, dass die Positivsymptomatik weit besser therapierbar ist als die Negativsymptomatik. Hier gelten beide Neuroleptikagruppen als etwa gleich effektiv (Carpenter, Jr. 2004; Keefe, Bilder, Davis et al. 2007; Goldberg, Goldman, Burdick et al. 2007).

Zusätzliche Medikamentengruppen, die außerdem therapeutisch verwendet werden, sind Benzodiazepine bei Agitation/Aggression, Angst oder Schlaflosigkeit, Antidepressiva und Antikonvulsiva (Möller, Deister, Schaub, Riedel 2008; Citrome 2009).

Die psychosoziale Therapie umfasst Psychotherapie und Soziotherapie. Zur Psychotherapie gehören supportive Therapiemaßnahmen, eine funktionierende Arzt-Patient-Beziehung, Verhaltenstherapie, analytische Verfahren und andere psychotherapeutische Verfahren. Zur Soziotherapie zählen Milieugestaltung, Tagesstrukturierung, Beschäftigungstherapie und Rehabilitation im beruflichen und sozialen Bereich (Deister, Marneros 1993; Patterson, Leeuwenkamp 2008). Ziel aller Therapieformen ist, die Gesamtbelastung durch die Erkrankung Schizophrenie zu verringern und „Recovery“ zu erreichen: Optimale Gesundheit und Wohlbefinden individuell für jeden Patienten. Dazu gehören Funktionalität im Alltag/Arbeitsleben, selbstständige Lebensführung, physische Gesundheit, soziale Integration und Lebensqualität (Tandon, Targum, Nasrallah, Ross 2006; Tandon et al. 2008)

Der Therapieerfolg hängt von vielen verschiedenen Faktoren ab wie Ansprechen auf die Medikation, Compliance, meist beeinflusst durch die unerwünschten Begleitwirkungen, die soziale Umgebung, Erkrankungsbeginn und Dauer der Symptomatik sowie vom Ausprägungsgrad der psychiatrischen Symptome (May, Goldberg SC 1978; Möller, Deister, Schaub, Riedel 2008). Je eher die Behandlung der ersten Episode einer Schizophrenie durchgeführt wird, desto besser wird die Prognose (Wyatt, Henter 2001; Perkins, Gu, Boteva, Lieberman 2005; McGlashan 2006).

Die multifaktorielle Ätiopathogenese der Schizophrenie führt zu hohen An- und Herausforderungen, aber auch Möglichkeiten in der Therapie.

1.2 Immunologie

Das Immunsystem des menschlichen Körpers ist eines der komplexesten Systeme überhaupt. Das Zusammenspiel der unterschiedlichen Systeme mit ihren Komponenten, Rezeptoren, Molekülen und Markern stellt weiterhin eine Her-

ausforderung an die wissenschaftliche Forschung dar. Im Folgenden wird ein fokussierter Überblick und damit über die für diese Arbeit relevantesten Aspekte zum Immunsystem gegeben.

1.2.1 Monozyten/ Makrophagen und HLA-DR

Monozyten gehören zur angeborenen Immunität, stammen aus der myeloiden Zellreihe des Knochenmarks und zirkulieren im Blut. Ihre proliferative Kapazität macht sie zu Vorläufern von Makrophagen und dendritischen Zellen in allen Geweben. Monozyten können außerdem in ständige phagozytische Zellen sowie Histozyten in der Niere, Leber, Lunge oder anderen Geweben differenzieren. Sie und ihre Differenzierungen spielen wichtige regulative und effektive Rollen sowohl bei der angeborenen als auch der erworbenen Immunität. Die drei Hauptfunktionen sind Antigenpräsentation, Phagozytose und Immunmodulation (Dale, Boxer, Liles 2008).

Die Zellen des Immunsystems besitzen Rezeptoren und Oberflächenmoleküle, die es ihnen ermöglichen, auf fremdes Zellmaterial oder Signale von anderen Zellen zu reagieren. Die Leukozyten sind durch charakteristische Differenzierungscluster (CD= cluster of differentiation) auf ihrer Oberfläche speziell gekennzeichnet. Klassische Monozyten exprimieren CD45 (Panleukozytenmarker), CD14, CD33 und HLA-DR (HLA = Human Leucocyte Antigen) (Tabelle 4). Durch Phagozytose des Antigens kann anschließend dieses auf der Oberfläche der Monozyten präsentiert und somit die folgende Abwehrreaktion aktiviert werden.

CD	Expression auf Zelltyp	Funktion
CD14	Monozyten	Bindung von Lipopolysaccharid (LPS)
CD33	Monozyten, myeloische Vorläuferzellen	Unbekannt
CD45	alle hämatopoetischen Zellen	Tyrosinphosphatase

Tabelle 4: Oberflächenmoleküle auf Monozyten (Auswahl)

Die Immunmodulation und damit Antwort auf infektiöse Pathogene werden vor allem durch die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen bewirkt. Speziell von Monozyten ausgeschüttete Zytokine sind TNF α , IL-1 β und IL-6, die beide Komponenten der angeborenen Immunantwort aktivieren (siehe unten) (Muller, Schwarz 2006; Steinke, Borish 2006).

Humane Leukozyten Antigene (HLA) werden auf allen kernhaltigen Zellen exprimiert und haben wichtige Funktionen in der lymphozytären Immunantwort (Sette, Buus, Colon, Smith, Miles, Grey 1987). Es existieren 2 HLA-Klassen: HLA Klasse I Antigene (A, B und C) und HLA-Klasse II Antigene (DR, DP und DQ). Die Klasse der HLA-II-Antigene präsentieren Antigene, die nach Endocytose von extrazellulären Proteinen präsentabel gemacht wurden. Die entstandenen HLA- und Antigen-Komplexe stimulieren T-Helferzellen zur Zytokinproduktion und –ausschüttung. Je nach Eigenschaft der antigenpräsentierenden Zelle wird entweder die antigenpräsentierende Zelle selbst weiter aktiviert, der Makrophage wird zur Antigenzerstörung angeregt oder der B-Lymphozyt produziert Antikörper. HLA-II-Antigene kontrollieren so vor allem die Antikörper-vermittelte Immunantwort.

HLA ist im Jahre 2009 wieder vermehrt in den Fokus der Schizophrenieforschung gerückt, da Genomstudien signifikante Assoziationen zwischen Schizophrenie und bestimmten Markern im Bereich der Major Histocompatibility Complex (MHC) Region auf Chromosom 6p22.1 fanden. Diese Region beinhaltet verschiedene auf das Immunsystem bezogene Gencluster, so dass Immunkomponenten und Schizophrenierisiko mit der MHC Region in Verbindung gebracht wurden (Stefansson, Ophoff, Steinberg et al. 2009). Zusätzlich zeigte das internationale Schizophrenie Konsortium eine Assoziation zwischen dem Major Histocompatibility Complex und Schizophrenie und bezogen mögliche ätiologische Mechanismen wie Autoimmunität und Infektionen darauf (Purcell, Wray, Stone et al. 2009). Am häufigsten wurde HLA-DRB1 oder seine Allele in der Literatur beschrieben (Arinami, Otsuka, Hamaguchi et al. 1998; Akaho, Matsushita, Narita et al. 2000). In einer gepoolten Datenanalyse von japanischen Genotypen berichteten Sasaki et al. von signifikant erhöhten HLA-DRB1-Allel-Häufigkeiten bei fast 600 schizophrenen Patienten im Vergleich zu rund 900 gesunden Kontrollen (Akaho et al. 2000).

1.2.2 Angeborene Immunität und Toll-Like Rezeptoren

Die angeborene Immunität („Innate Immunity“) schützt den Organismus vor Infektionen mit Pathogenen. Infektionen bewirken eine sehr schnelle Aktivierung der angeborenen und anschließend auch der erworbenen Immunität. Die Ab-

wehr der angeborenen Immunität ist unspezifisch und wird auf zwei Ebenen realisiert- der zellulären und humoralen. Zu den Zellen der angeborenen Immunität gehören Monozyten, Makrophagen, neutrophile Granulozyten, natürliche Killerzellen (NK), dendritische Zellen (DC) und γ/δ T-Zellen. Die humoralen Faktoren sind Plasmaproteine wie das Komplementsystem und akute-Phase-Proteine (z.B. CRP). C-reaktives Protein (CRP) wird in der Leber gebildet und ist ein unspezifischer Entzündungsmarker. Die Konzentration kann unter verschiedensten Bedingungen erhöht sein, wie z.B. bei (bakteriellen) Infektionen, akuten und chronischen Entzündungen und Stress (Rothermundt, Arolt, Bayer 2001). Es aktiviert das Komplementsystem und gilt wegen seiner kurzen Halbwertszeit (Stunden) als zuverlässiger klinischer Überwachungsparameter zur Diagnostik, Bewertung von Komplikationen und Einschätzung der Krankheitsursache (Pepys MB, Baltz MC 1983). Weitere Eigenschaften und die Funktionen der angeborenen Immunität gibt Tabelle 5 wieder.

Angeborene Immunität	
Erkennungssystem	
<ul style="list-style-type: none"> • Rezeptoren • Pathogenstrukturen 	<p>Entwicklung während der Evolution</p> <ul style="list-style-type: none"> • "pathogen-associated molecular pattern"= PAMPS • unveränderte Strukturen • Vorhandensein bei einer großen Gruppe von Pathogenen, z.B. LPS in allen gram-negativen Bakterien
Funktionen	<ul style="list-style-type: none"> • unspezifische Zytokin-abhängige Immunität der Zellen gegen Bakterien, Viren und Tumoren • Zytotoxizität von NK-Zellen, Monozyten/Makrophagen, DCs und Komplement • Produktion von Zytokinen, Lymphokinen und Chemokinen • Phagozytose, "Oxygen burst" • Produktion von natürlichen IgM-Antikörpern mit unbekannter Spezifität

Tabelle 5: Eigenschaften und Funktionen der angeborenen Immunität (Blach-Olszewska 2005)

Verschiedene Rezeptoren auf den Zellen der angeborenen Immunität sind dafür verantwortlich, dass körperfremde Stoffe und Zellen erkannt und die Invasion von Mikroorganismen bekämpft werden. Diese sind Mannoserezeptoren, Phagozytoserezeptoren und NK-aktivierende Rezeptoren. Die wichtigsten Rezeptoren allerdings gehören zur Familie der Toll-like Rezeptoren, von denen verschiedene Typen existieren (TLR-2 bis TLR-9). Die Toll-like Rezeptoren können unterschiedlichste mikrobielle Pathogene und deren Produkte erkennen. Außerdem geht man davon aus, dass sie als Hauptrezeptoren zur Erkennung von

Pathogen-assoziierten molekularen Mustern („PAMPs“) fungieren. Sie werden vor allem auf Monozyten exprimiert (Blach-Olszewska 2005; Dale, Boxer, Liles 2008). Für eine Übersicht siehe Tabelle 6.

	Expression auf Zelltyp	Liganden	Funktion	
Toll-like Rezeptor	Monozyten	Lipoproteine	antibakteriell	
	Makrophagen	Peptidoglycane	antiviral	
	DCs	Zymosan	antitumorös	
	Epitheliale Zellen	LPS		
	Mastzellen	Flagellin		
	Neutrophile		CpG DANN	
			Virale dsRNA	
		Virale Hüllenstrukturen		

Tabelle 6: Eigenschaften, Liganden und Funktion der Toll-like Rezeptoren (Akira 2003)

An die verschiedenen Typen der TLRs binden unterschiedliche Liganden. Nach Ligandenbindung gelingt die Signalweiterleitung der TLRs über das Adaptorprotein MyD88 (myeloid differentiation 88) vor allem bei Pseudomonasinfektionen oder MyD88-unabhängig bei Staphylokokken- und viralen Infektionen über die IL-1- Rezeptor-assoziierte Kinase (IRAK), den TNF-Rezeptor-assoziiierter Faktor (TRAF) und die Mitogen-aktivierte Protein (MAP) Kinasen. Anschließend wird der Nuclear factor (NF)- κ B aktiviert und die Produktion proinflammatorischer Zytokine durch Monozyten angeregt (Blach-Olszewska 2005).

	Liganden
TLR-2	Peptidoglycan, Lipopeptide, Produkte von gram-positiven Bakterien, LPS u.a.
TLR-3	Virale Replikate von dsRNA, synthetische dsRNA-polyI:C
TLR-4	LPS von gram-negativen Bakterien, Taxol, HSP 60, Fibronectin, F Protein vom respiratorischen synthetischen Virus, weitere virale Hüllenstrukturen

Tabelle 7: Liganden der in dieser Arbeit verwendeten Toll-like Rezeptoren (Auswahl) (Blach-Olszewska 2005)

Für die Pathogenerkennung arbeiten verschiedene Oberflächenrezeptoren mit den spezifischen TLRs zusammen: so bindet CD14 mit LPS und interagiert dann mit TLR-4, um die Erkennung und Abwehr von gram-negativen Bakterien aus Blut und Gewebe zu unterstützen (Dale, Boxer, Liles 2008).

1.2.3 Erworbene Immunität und Zytokine

Die erworbene Immunität folgt der angeborenen und bekämpft gezielt und anpassungsfähig spezifische Antigene. Zu den zellulären Komponenten zählen neben den antigenpräsentierenden Zellen (APCs) mit DCs und Makrophagen vor allem die T- und B-Lymphozyten. Die T-Zellen werden dabei in CD4+-T-Helfer-Zellen und zytotoxische CD8+-T-Zellen unterteilt. Die T-Helfer-Zellen (Th) mit ihren beiden Subtypen sind die Koordinatoren der Immunantwort. Nach Antigenerkennung über antigenpräsentierende Zellen mit MHC-II-Molekülen (Major Histocompatibility Complex) auf der Oberfläche werden von den zwei Th-Subtypen unterschiedliche Zytokine produziert: Th1-Zellen schütten hauptsächlich IL-2 und IFN (Interferon)- γ aus, die die zelluläre Antwort (Monozyten/Makrophagen) aktivieren. Th2-Zellen produzieren vor allem IL-4, IL-10 und IL-13, die die humorale Antwort und die B-Zell-Reifung aktivieren. Sämtliche genannten Zytokine werden ebenfalls von Monozyten ausgeschüttet. Die humorale Antwort wird durch die von den B-Lymphozyten gebildeten Antikörper in Form von Immunglobulinen gewährleistet.

Die Polarisierung der Immunantwort durch die Zytokine hat zur der Bezeichnung der Typ-1-Immunantwort (zellulär, gerichtet gegen intrazelluläre Pathogene) und Typ-2-Immunantwort (humoral, gerichtet gegen extrazelluläre Pathogene) geführt. Die Zytokine beider Systeme antagonisieren einander, um die jeweilige eigene Antwort voranzutreiben und die andere zu unterdrücken (Delves, Roitt 2000a; Delves, Roitt 2000b; Muller, Schwarz 2006). Eine zusammenfassende Übersicht der erworbenen Immunität gibt Tabelle 8 wieder.

Erworbene Immunität	
Erkennungssystem	
<ul style="list-style-type: none"> • Rezeptoren • Pathogenstrukturen 	<p>Erworben durch Rearrangement von Genen</p> <p>Bestimmte Domänen auf einem einzigen Pathogen</p>
Funktionen	<ul style="list-style-type: none"> • Produktion von spezifischen Antikörpern • Zytotoxizität abhängig von MHC (Major Histocompatibility Complex) auf antigenpräsentierenden Zellen • Zytotoxizität durch Komplementaktivierung und Antikörper • Zytokinproduktion

Tabelle 8: Eigenschaften und Funktion der erworbenen Immunität (Blach-Olszewska 2005)

Zytokine sind heterogene Glykoproteine. Sie stellen als Botenstoffe des Immunsystems die Mediatoren zwischen dem systemischen Immunsystem und zentralem Nervensystem (ZNS) dar und haben dadurch erhebliche Konsequenzen für die klinische Psychiatrie (Steinke, Borish 2006). Sie reagieren auf Infektionen, Entzündungen und Verletzungen und regulieren Zellwachstum, -differenzierung, -überleben und -aktivität. Einen zusammenfassenden Überblick gibt Tabelle 9.

	Produktion	Wirkung	Funktion
Zytokine	Peripher: <ul style="list-style-type: none"> • Angeborene Immunität: Monozyten/Makrophagen • dendritische Zellen, NK-Zellen • Erworbene Immunität: T- und B-Lymphozyten • Weitere: Fibroblasten, endotheliale Zellen, Adipozyten Zentral: <ul style="list-style-type: none"> • Mikroglia, Astrozyten, endotheliale Hirnzellen, Neurone 	<ul style="list-style-type: none"> • Autokrin, parakrin, endokrin • Pleiotrop 	<ul style="list-style-type: none"> • Initiierung und Koordination der Immunantwort • Stimulation der Immunantwort • Inhibierung der Immunantwort • Aktivierung von T- und B-Lymphozyten • Regulation der Blut-Hirn-Schranke • Regulierung der Hormone der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrindenachse • Effekte (stimulativ, hemmend) auf Neurotransmission (dopaminerg, serotonerg, noradrenerg, cholinerg)

Tabelle 9: Zytokinproduktion und Funktion (Muller 1997; Drzyzga, Obuchowicz, Marciniowska, Herman 2006; Na, Kim 2007; Potvin, Stip, Sepehry, Gendron, Bah, Kouassi 2008)

Die in dieser Arbeit untersuchten Zytokine waren $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, IL-6 und IL-10 . $\text{TNF}\alpha$ (Tumor necrosis factor) ist ein proinflammatorisches, zytotoxisches Zytokin, das früh die proinflammatorische Signalübertragung während der ersten (innate Immunity) Immunantwort koordiniert. Es aktiviert vor allem die Typ-1-Immunantwort, wirkt synergistisch mit anderen Zytokinen und induziert z.B. Fieber über zentrales Wirken im Hypothalamus (Muller, Schwarz 2007a; Coelho, Reis, Nicolato et al. 2008).

$\text{IL-1}\beta$ ist eine Unterform es IL-1 (neben $\text{IL-1}\alpha$), stimuliert proinflammatorisch T-Zellen zur Proliferation und ist im Blut ubiquitär vorhanden. Es induziert ebenfalls Fieber, kann Akute-Phase-Proteine beeinflussen und triggert die Bildung

von neutrophilen Granulozyten aus dem Knochenmark und die Sekretion von IL-6. IL-1 β reguliert über hypothalamische Neurone die Hormone der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden (HPA)-Achse. Somit beeinflusst die Höhe des IL-1 β in Stresssituationen die glukokortikoide Reaktion (Muller 1997; Rivest, Lacroix, Vallieres, Nadeau, Zhang, Laflamme 2000).

TNF α und IL-1 β wird eine modulative Funktion auf die Expression des CD14-Rezeptors auf Monozyten zugeschrieben. Ihre para- und autokrinen Effekte wirken sich sowohl auf periphere Zellen im Blut als auch auf Mikrogliazellen des Parenchyms im Gehirn aus. Die Immunantwort auf LPS wird somit verstärkt getriggert (Rivest, Lacroix, Vallieres, Nadeau, Zhang, Laflamme 2000).

IL-6 hat als proinflammatorisches Zytokin verschiedene abwehrende Funktionen: Dazu gehören die Stimulation der Phagozytose durch Makrophagen, die Produktion von Akute-Phase-Proteinen, die weitere Produktion von anderen Zytokinen (mit IL-1) und die Differenzierung von zytotoxischen T-Zellen und B-Zellen. Es aktiviert dadurch anders als das TNF α eher die Typ-2-Immunantwort mit Förderung der Antikörperproduktion. Vor dem Hintergrund der Hypothese, dass eine Störung der Blut-Hirn-Schranke im ZNS zu einem erleichterten Eintritt von Pathogenen und immunmodulatorischen Proteinen führen kann, nimmt IL-6 Einfluss auf die Schrankenstörung und weitere proinflammatorische Prozesse (Muller, Ackenheil 1995). Des Weiteren wirkt es ebenfalls fördernd auf die HPA-Achse (Rothermundt, Arolt, Bayer 2001; Muller, Schwarz 2007b).

Die Synthese dieser drei proinflammatorischen Zytokine kann durch TLR-Agonisten, vor allem Lipopolysaccharid, gezielt stimuliert werden (Rivest, Lacroix, Vallieres, Nadeau, Zhang, Laflamme 2000).

IL-10 ist ein antiinflammatorisches Zytokin und wirkt dadurch hemmend auf die Produktion von Zytokinen, die der zellulären Immunantwort angehören, also auch auf TNF α , IL-1 β und IL-6 (und andere). Es stimuliert eher die Th2- und somit humorale Immunantwort und vermittelt weniger inflammatorische als zytotoxische Effekte, z.B. durch Anregung der Monozyten zur Differenzierung zu Makrophagen und damit Phagozytose. IL-10 wird von verschiedensten Zellen synthetisiert, beim Menschen hauptsächlich von Monozyten und B-Zellen (Steinke, Borish 2006; Potvin, Stip, Sepehry, Gendron, Bah, Kouassi 2008).

1.3 Zielsetzung

Ziel dieser prospektiven Studie war es, in einem explorativen Ansatz Ursachen, Hinweise und Zusammenhänge für eine entzündliche Entstehung, Verstärkung und Unterhaltung einer Schizophrenie auf der Ebene der angeborenen Immunität zu finden. Am Untersuchungskollektiv, bestehend aus 31 schizophrenen Patienten und 31 gesunden Kontrollpersonen, wurde das monozytäre System mit den Messmethoden Durchflusszytometrie und ELISA betrachtet. Dabei wurden die intrazellulär gebildeten Zytokine TNF α , IL-1 β , IL-6 und IL-10 durch farbstoffmarkierte monoklonale Antikörper gemessen, um die Funktionalität der Monozyten zu erfassen. Die extrazelluläre Konzentration des IL-1 β im Serum wurde durch ELISA bestimmt, um mögliche Unterschiede und Korrelationen zwischen intra- und extrazellulär zu entdecken. Die Brücke zwischen Monozytenaktivierung und der konsekutiven Zytokinproduktion wurde durch Messung der Toll-like Rezeptoren (TLR) 2, 3 und 4 geschlagen. Ihre quantitative Menge sollte Aufschluss über mögliche Defizite im monozytären System bei den Schizophrenen geben. Der Aktivierungsmarker HLA-DR wurde auf Monozyten gemessen, um mögliche Störungen der Immunantwort bei Schizophrenie mit Hilfe dieses Membranproteins beurteilen zu können.

Zur Beurteilung der Monozytenanzahl und weiterer Leukozyten wurden Differential-Blutbilder angefertigt. CRP diente als Entzündungsparameter. Epidemiologische Daten sowie der Schweregrad der Erkrankung wurden durch Anamnese und die klinische Beurteilungsskala PANSS erfasst. Der Vergleich schizophrener Patienten mit einer geschlechts- und altersangepassten gesunden Kontrollgruppe sollte eine möglichst realistische Einschätzung der immunologischen Parameter ermöglichen. Insgesamt sollten mit der breiten Betrachtung von unterschiedlichsten Parametern des monozytären Systems ein zusammenhängender Überblick und Hinweise auf mögliche Entzündungsvorgänge bzw. immunologische Defizite bei der Schizophrenie gegeben werden.

2 Material und Methoden

2.1 Untersuchtes Kollektiv

2.1.1 Studienteilnehmer

An der Studie nahmen insgesamt 31 schizophrene Patienten und 31 gesunde Kontrollpersonen teil. Im Zeitraum von Oktober 2006 bis Oktober 2007 wurden abwechselnd beide Gruppen untersucht. Die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät genehmigte die Studie, alle Teilnehmer wurden aufgeklärt und gaben freiwillig ihre Einverständniserklärung ab. Die Patienten wurden im Rahmen von stationären Aufenthalten in der Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie der Ludwig-Maximilians-Universität (LMU) München, Nussbaumstraße rekrutiert. Die gesunden Teilnehmer fanden sich durch Aushänge an der Ludwig-Maximilians-Universität und im Familien- und Bekanntenkreis.

Alle Studienteilnehmer erfüllten spezifische Kriterien. Die Schizophrenen durften gegen die Schizophrenie seit mindestens vier Wochen nicht medikamentös behandelt sein und wurden anhand von Anamnese, Fragebögen und Definitivskriterien nach ICD-10 diagnostiziert und im Schweregrad ihrer Erkrankung eingestuft. Die gesunden Kontrollpersonen wurden passend zu den Schizophrenen nach Alter und Geschlecht ausgewählt. Voraussetzung zum Studieneinschluss war das Fehlen einer psychiatrischen Erkrankung, was durch die Anamnese und verschiedene Fragebögen (Y-BOCS Zwangsfragebogen, Beck Depression Inventar, CIPS) gesichert wurde.

Besonderes Augenmerk lag bei beiden Gruppen in der präzisen Anamnese von Erkrankungen, die das Immunsystem beeinflussen könnten. Teilnehmer mit Autoimmunerkrankungen, Infektionskrankheiten (auch Erkältung und Grippe) und (akuten) Allergien (wie Heuschnupfen) wurden von der Studie ausgeschlossen. Das Differentialblutbild, der Blutentzündungsmarker CRP und die Anamnese dienten zum Erkennen von akuten Entzündungen. Organische Erkrankungen wurden durch die Bestimmung von Elektrolyt-, Leber-, Nieren- und Schilddrüsenwerten ausgeschlossen.

Bekannte Vorerkrankungen und eingenommene Medikamente wurden dokumentiert, ebenso die Familien- und Suchtanamnese (Alkohol, Drogen, Nikotin).

2.1.2 Blutproben: Durchflusszytometrie, Klinische Chemie und Differentialblutbild

Allen Studienteilnehmern wurde einmalig insgesamt ca. 50 ml Blut abgenommen. Die Blut-Monovetten stammen von Sarstedt, Material und Geräte, Ort der Verarbeitung und die zu bestimmenden Parameter gibt Tabelle 10 wieder. Ziel war es zwar, die Blutentnahmen zur gleichen Tageszeit durchzuführen. Aus organisatorischen Gründen konnte dies allerdings nicht immer realisiert werden. Meistens erfolgte die Blutentnahme zwischen 8.00 und 12.00 Uhr. Die Weiterverarbeitung im Rheumalabor (vgl. Tabelle 10) fand umgehend nach der Blutentnahme statt, ebenso wurde mit den Proben für das Labor der Medizinischen Klinik verfahren. Lagerung und Transport erfolgten bei Raumtemperatur (ca. 22° Celsius). Das Psychiatrische Labor erhielt nach Abschluss der Datensammlung 61 eingefrorene (-20° Celsius), zentrifugierte Serumproben, die es zur Bearbeitung mit ELISA bei -80 ° Celsius lagerte und anschließend verarbeitete.

Art des Blutröhrchens	Inhalt in ml	Funktion	Zu bestimmende Parameter	Ort der Verarbeitung	Verwendete Geräte
1 CPDA	8,5	Durchflusszytometrie	Monozyten: Intrazelluläre Zytokine, extrazelluläre Toll-like Rezeptoren, Aktivierungsmarker HLA-DR	Rheumalabor der Poliklinik der LMU München, Pettenkoferstraße, München	FACSCalibur
1 EDTA	2,7	Blutbild	Differentialblutbild	Labor der Medizinischen Klinik der LMU München, Ziemsenstraße, München	Coulter LH 750 Analyzer
1 Lithium-Heparin	4,5	Klinische Chemie	Natrium, Kalium, Calcium, Vit. B12, Kreatinin, Harnstoff, Harnsäure, IgE, Bilirubin gesamt, ASAT, ALAT, γ GT, aP, Amylase, Lipase, LDH, CK, CRP, Haptoglobin, Kupfer, Coeruloplasmin	Labor der Medizinischen Klinik der LMU München, Ziemsenstraße, München	Integra 800 Roche
1 Serum	2,7	Endokrinologie	TSH-Screening	Labor der Medizinischen Klinik der LMU	Coulter LH 750

				München, Ziemssenstraße, München	Analyzer
1 Serum	8,5	Endokrinologie	Erythropoetin (EPO)	Labor der Medizinischen Klinik der LMU München, Ziemssenstraße, München	
1 Serum	8,5	Zytokinbestimmung (Zentrifugation, Abpipettierung und Einfrieren bei -20°C bzw. -80°C)	Extrazelluläre Zytokine im Serum	Rheumalabor der Poliklinik der LMU München, Pettenkoferstraße, München; Zytokinbestimmung im Labor der Psychiatrischen Klinik der LMU München, Nussbaumstraße, München	Siehe unten

Tabelle 10: Art, Funktion und Ort der Verarbeitung der Blutproben

In dieser Arbeit wurden das Differentialblutbild und CRP betrachtet. Die Referenzbereiche der Medizinischen Klinik der LMU München, Ziemssenstraße gibt Tabelle 11 wieder.

	Referenzwerte
Leukozyten	4,0-11,0 G/l (100%)
Segmentkernige Granulozyten	50-70 %
Eosinophile	2-4 %
Basophile	0-2 %
Lymphozyten	25-40 %
Monozyten	4-10 %
CRP	<0,5 mg/dl

Tabelle 11: Referenzwerte des Differentialblutbildes und CRP

2.2 Psychopathologie

Die Psychopathologie der Patienten und gesunden Probanden wurde durch verschiedene Fragebögen bewertet. Ihre Funktion lag in der Beurteilung des Schweregrads der Erkrankung.

2.2.1 Beurteilung des Schweregrads: PANSS

Die PANSS (Positive and Negative Syndrome Scale) ist ein halbstrukturiertes Interview für Erwachsene zur Erfassung des Schweregrades psychotischer Stö-

rungen. Bei Bedarf können fremdanamnestic Informationen in die Bewertung einfließen. Sie ist unterteilt in drei Skalen und besteht aus insgesamt 30 items:

1. Positivskala für produktive Symptome wie Wahnideen und Halluzinationen (7 items)
2. Negativskala zur Beurteilung defizitärer Symptome wie Affektverflachung und soziale Passivität (7 items)
3. Skala der Allgemeinpsychopathologie (16 items)

Die Beurteilung bezieht sich auf die Symptome der letzten Woche. Die jeweilige Ausprägungsmöglichkeit pro item wird mit Punkten von 1 = nicht vorhanden bis 7 = extrem bewertet, wobei diese jeweils explizit beschrieben werden. Die Summe aller vergebenen Punkte beträgt mindestens 30 und maximal 210. Betrachtet man die Subskalen einzeln, so ergeben sich für Positiv- und Negativskala jeweils Punktwerte von mindestens 7 und maximal 49, für die Skala der Allgemeinpsychopathologie Punktwerte von mindesten 16 und maximal 112. Itemwerte ≤ 2 werden als normal bewertet.

Die Auswertung der PANSS führt zu vier möglichen Subtypen der Schizophrenie:

1. positiv: mindestens 3 Positivitems mit einem Punktwert >4
2. negativ: mindestens 3 Negativitems mit einem Punktwert >4
3. gemischt: mindestens 3 Positivitems und 3 Negativitems mit jeweils einem Punktwert >4
4. keine der vorher genannten: weniger als 3 Positiv- und weniger als 3 Negativitems mit einem Punktwert von >4

Ein Exemplar der PANSS befindet sich im Anhang.

2.3 Durchflusszytometrie

2.3.1 Grundlagen- Definition und Funktion

Durchflusszytometrie bedeutet die Messung von Einzelzellen in einem Flüssigkeitsstrom (Suspension). FACS-Analyse (Fluorescence Activated Cell Sorting) wird synonym verwendet. Ihr ist es möglich durch optische Messprinzipien physikalische und molekulare Eigenschaften heterogener Zellsysteme zu analysieren. Die in den 60iger Jahren entwickelte Technologie hat inzwischen hohen Stellenwert sowohl in der klinischen Diagnostik als auch in der wissenschaftlichen Forschung. So wird die Durchflusszytometrie in der klinischen Routine zur Primärdiagnostik und Verlaufsbeurteilung in der Hämatologie, Infektiologie und Immunologie (z.B. Leukämie, Lymphome, HIV, Rheumatoide Arthritis) genutzt. Zu messende Zellen können unter anderem Leukozyten (Lymphozyten, Monozyten, Granulozyten) aus dem peripheren Blut, Zellen in Liquor und Knochenmark oder Tumorzellen sein. Außerdem können mit der Durchflusszytometrie Zellzyklusanalysen und funktionelle Untersuchungen (z.B. intrazelluläre Stoffwechselfvorgänge wie Enzymaktivitäten) durchgeführt werden.

2.3.2 Grundlagen- Physik

Die Durchflusszytometrie erfasst optische Signale – Fluoreszenz und Lichtstreuung - von Zellen in Suspension durch einen fokussierten Lichtstrahl einer Lichtquelle, meist durch Laser. Nach Beleuchtung jeder Zelle am Analysepunkt des Gerätes werden die Fluoreszenz- und Streulichtemissionen quantifiziert. Das Ergebnis ist so eine Summe vieler schnell aufeinander folgender Einzelmessungen.

Der am häufigsten verwendete Laser ist der luftgekühlte Argonlaser mit einer Emissionslinie von 488nm Wellenlänge. Das emittierte (ausgesandte) Licht des Lasers ist dabei monochromatisch und von hoher Energiedichte.

Fluoreszierende Verbindungen (Fluorochrome) absorbieren Lichtenergie über charakteristische Wellenlängenbereiche in bestimmten Anregungsspektren. Sie sind Farbstoffe, die Zellen, deren Bestandteile oder Eigenschaften nachweisen und darstellen können. Wichtig ist, dass der Absorptionsbereich der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe im Emissionsspektrum des verwendeten Lasers liegt.

Die Lichtstreuung einer Zelle wird durch ihre Querschnittsfläche, Struktur der Membran (Faltung), ihren Refraktionsindex und ihre intrazellulären Bestandteile (Granula, Vakuolen) beeinflusst. Lichtstreuung entsteht, wenn Partikel einfallendes Laserlicht beugen, und wird als Schreulicht bezeichnet. Das Vorwärtsschreulicht, FSC (Forward Angle Light Scatter), ist proportional der Zelloberfläche bzw. -größe. Das Seitwärtsschreulicht, SSC (Side Scatter), entsteht an Grenzflächen in einer Zelle mit geändertem Brechungsindex (Membran, Kern, intrazelluläre Partikel wie Granula; siehe Tabelle 12). Durch die unterschiedlichen Informationen der beiden Lichtparameter lassen sich die Leukozytenuntergruppen, vor allem Lymphozyten, Monozyten und neutrophile Granulozyten, durch ihre Größe und Granularität voneinander unterscheiden. Außerdem ist es möglich, tote Zellen (Zellschutt) abzugrenzen.

Streulicht (Winkelbereich)	Sensitiv für	Information über
Vorwärtsschreulicht (0-10°)	Querschnittsfläche	Zellgröße
Seitwärtsschreulicht(90° seitwärts zu FCS)	Refraktionsindex	Granularität Membranfaltung äußere Form

Tabelle 12: FCS und SSC

2.3.3 Immunfluoreszenz

Immunfluoreszenz ist die Färbung mit Antikörpern, die direkt oder indirekt mit fluoreszierenden Farbstoffen gekoppelt sind. Die fluoreszierenden monoklonalen Antikörper binden spezifisch an ihre Ziele (Antigene), im Falle dieser Arbeit an Oberflächenmarker und Rezeptoren und intrazelluläre Antigene (Zytokine). Die Charakterisierung von unterschiedlichen und mehreren Antigenen wird durch die Mehrfarbenimmunfluoreszenz mit zwei oder mehr Lasern ermöglicht. Tabelle 13 zeigt die vier in dieser Arbeit verwendeten Immunfluoreszenzen und die zwei genutzten Laser.

Immunfluoreszenz	Anregungsbereich (nm)	Emissionsbereich (nm)	Lichtquelle mit Anregungsspektrum (nm)
Fluorescein (FITC)	495	525	Argonlaser (488)
R-Phycoerythrin (PE)	488;565	578	Argonlaser (488)
Cy5	651	674	HeliumNeon-Laser (633)
Allophycocyanin (APC)	650	660	HeliumNeon-Laser (633)

Tabelle 13: Immunfluoreszenzen mit Wellenlängen in nm

In dieser Arbeit wurde die Vierfarbenfluoreszenzanalyse durchgeführt, um sowohl die zu färbende Zellgruppe, die Monozyten, als auch die interessierenden Eigenschaften (z.B. Zytokin, Toll-like Rezeptor oder Aktivierungsmarker) spezifisch anzufärben.

2.3.4 Durchflusszytometer: Aufbau und Messung

Ein Durchflusszytometer hat drei Hauptkomponenten: Flüssigkeits-, optisches und elektronisches System. Das Flüssigkeitssystem transportiert die Zellen zum Messpunkt, an dem der Lichtstrahl des Lasers auf die Zelle trifft. Der Laser und weitere Bestandteile gehören zum optischen System, ebenso wie Detektoren, die sensibel für Lichtstreuung und Fluoreszenzen sind. Das elektronische System erzeugt aus den Lichtsignalen elektrische Signale, proportional zu der Intensität des einfallenden Lichtes. Die elektrischen Signale werden bei Immunfluoreszenzanalysen logarithmisch verstärkt. Für die Darstellung und weitere Analyse am Computer werden sie über einen Analog/Digitalwandler digitalisiert.

2.3.5 Datenauswertung: Darstellung und Gating

Alle optischen Parameter jeder Zelle in Lösung werden bei der durchflusszytometrischen Messung aufgezeichnet und dargestellt. In dieser Arbeit wurde die Zweiparameter-Punktdarstellung (Dotplot) gewählt, bei der jede einzelne Zelle entsprechend ihrer Parameterintensität in ein Koordinatenkreuz beider Parameter eingeordnet wird. Zwei Eigenschaften einer Zelle, z. B. Größe und Granularität, stehen so in Relation zueinander. Jeder Punkt steht für eine bestimmte Zelle mit ihren Eigenschaften, die Parameter können miteinander korrelieren. Die Charakterisierung der Zellen durch die dargestellten Eigenschaften lassen die Abgrenzung von Zelltrümmern, häufigen und seltenen Zellen und die interessierenden Zellarten zu. Durch die Parameterkombination Größe gegen Granularität (FSC gegen SSC) lassen sich die Leukozytensubpopulationen von einander unterscheiden: in dieser Arbeit die Monozyten von den Lymphozyten und neutrophilen Granulozyten. Diese werden mit einem Fenster, Gate, manuell eingegrenzt, also gated. Bei der weiteren Analyse von interessierenden Parametern in anderen Dotplots finden nur solche Ereignisse Berücksichtigung, die innerhalb dieses eingegrenzten Bereiches (Gate) liegen (siehe Abbildung 3). So

wird sichergestellt, dass nur die spezifisch angefärbten Produkte der Monozyten bzw. diese selbst aus der Messung in die Datenanalyse einfließen.

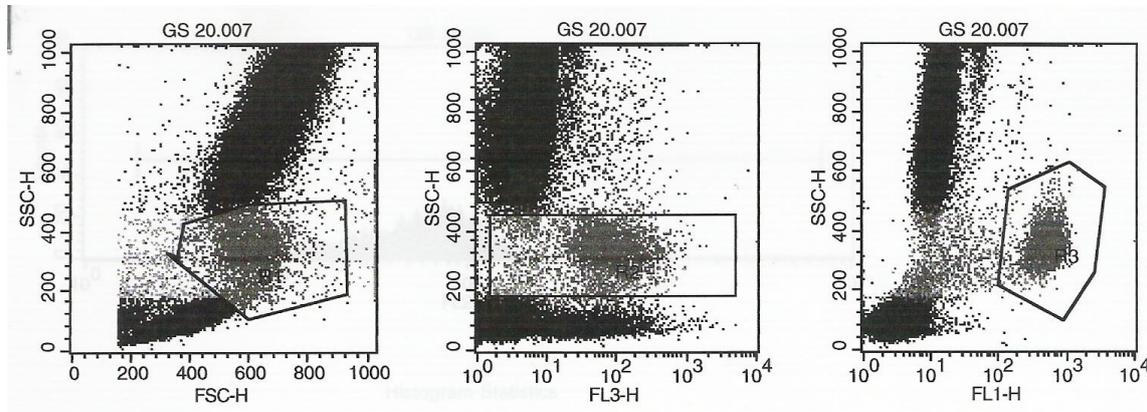


Abbildung 3: Dotplotdarstellung der Fluoreszenzen (FL) und Gating. Links: FSC gegen SSC, allgemeine Darstellung zur Differenzierung und Abgrenzung der Monozyten mit Gate um diese. Mitte: FL3 (HLA-DR) gegen SSC mit Gate. Rechts: FL1 (CD14) gegen SSC mit Gate.

2.4 Versuchsaufbau

2.4.1 Stimulation

Wegen der Frage, ob bei Schizophrenen eine andere Zytokinproduktion und Expression der Toll-like Rezeptoren vorliegt als bei Gesunden, wurden die Monozyten gezielt bakteriell und viral stimuliert. Dazu wurden bakterielles Lipopolysaccharid (LPS) und das virale Antigen PolyI:C zum Vollblut hinzugefügt (siehe Tabelle 14). Vor allem das LPS ist ein Monozyten-spezifischer Stimulus. Die anschließende, vierstündige Inkubation im Brutschrank bei 37°Celsius simuliert eine Infektion unter physiologischen Bedingungen (zur Diskussion der Stimulationszeit siehe 4.1 Diskussion der Methodik, Seite 76). Brefeldin A (BFA) wurde nach zwei Stunden hinzugefügt. BFA hemmt die Sekretion der Zytokine aus der Zelle durch Blockade des Golgi-Apparates. Es führt durch die Anreicherung der intrazellulären Zytokine im endoplasmatischen Retikulum zu einer verbesserten Detektion dieser. Ziel war es, das Verhalten der Monozyten unter Stimulation im Vergleich der beiden Gruppen zu beobachten.

Stimulation mit	Vorbereitung	Firma	Lagerung
Lipopolysaccharid (LPS)	Keine	Sigma, München	Kühlschrank bei 4°Celsius
PolyI:C	Sterile Vorverdünnung 10 mg mit 10 ml NaCl (150 millimolar); Aliquotierung von 100 µl in Microtubes	Sigma, München	Eisschrank bei -20°Celsius

Tabelle 14: Verwendete Stimulantien

2.4.2 Ansätze

Das Studiendesign beinhaltete insgesamt 8 verschiedene Ansätze. Dabei wurden 4 Ansätze sofort für die durchflusszytometrischen, intrazellulären Messungen verwendet. 4 Ansätze wurden nach der Stimulationszeit abzentrifugiert. Der Überstand wurde bei -20° bzw. -80° Celsius zur extrazellulären Zytokinbestimmung (ELISA) eingefroren. Ziel war es zum einem herauszufinden, bei welchen Bedingungen die Monozyten Zytokine vermehrt oder vermindert ausschütten

und inwiefern sich die Expression der Toll-like Rezeptoren verändert. Zum anderen sollte sowohl die extra- als auch die intrazelluläre Produktion messbar sein.

Das Blut der jeweiligen CPDA-Röhrchen wurde gut geschwenkt und anschließend je 1 ml davon in 8 Falcon FACS- Röhrchen gefüllt und von 1-8 durchnummeriert und beschriftet. Ansatz 1 wurde sofort zentrifugiert (Rotina Zentrifuge, 4000 Umdrehungen/Minute (rpm), 25°C, 10 Minuten), der Überstand anschließend aufgenommen (ca. 250 µl pro Reagiergefäß von Sarstedt, ca. 500 µl Gesamtmenge) und bei -20°C bzw. später bei -80°C eingefroren und gelagert. Tabelle 15 gibt wieder, wie mit den restlichen sieben Ansätzen verfahren wurde.

Ansatz	Stimulation	Inkubationsdauer	Inkubationstemperatur	BFA-Zugabe
1	Siehe oben			
2	Keine	4 Std.	Raumtemperatur 22°C	Keine
3	Keine	4 Std.	Brutschrank 37°C	Keine
4	Keine	4 Std.	Brutschrank 37°C	10 µl nach 2 Std.
5	1 µl LPS	4 Std.	Brutschrank 37°C	Keine
6	1 µl LPS	4 Std.	Brutschrank 37°C	10 µl nach 2 Std.
7	50 µl PolyI:C	4 Std.	Brutschrank 37°C	Keine
8	50 µl PolyI:C	4 Std.	Brutschrank 37°C	10 µl nach 2 Std.

Tabelle 15: Stimulation, Inkubationsdauer, Inkubationstemperatur und Zugabe von Brefeldin-A (BFA) bei den Ansätzen 2-8

Die Ansätze 3, 5 und 7 wurden wie Ansatz 1 zentrifugiert, der Überstand wurde zu je ca. 250 µl in zwei Reagiergefäße pipettiert und eingefroren.

Die Ansätze für die Messung der intrazellulären Zytokine und Toll-like Rezeptoren waren 2, 4, 6 und 8. Es folgten sofort die spezifischen Antikörperfärbungen mit insgesamt fünf verschiedenen Antikörperkombinationen (siehe unten). Die Ansätze für die Messung des extrazellulären Zytokins waren 1, 3, 5 und 7. Die eingefrorenen Proben (bei -20° Celsius und später zur Haltbarkeitsverlängerung bei -80° Celsius) wurden nach Abschluss der Patientenrekrutierung mit ELISA weiterbearbeitet.

Das Blut des Serum-Röhrchens wurde sofort bei 4000 Umdrehungen/Min. und 25° Celsius für 10 Minuten zentrifugiert und anschließend der Überstand in 4 Reagiergefäße zu je ca. 500 µl aliquotiert. Diese Proben wurden ebenfalls bei -20° Celsius eingefroren und später bei -80° Celsius gelagert.

2.5 Bestimmung der intrazellulären Zytokine TNF- α , IL-1 β , IL-6 und IL-10

2.5.1 Prinzip

Die Bestimmung von intrazellulären Zytokinen erfolgte durch Anfärbung der gesuchten Zytokine (Antigene) mit fluoreszenzmarkierten monoklonalen Antikörpern. Die Färbung erforderte die Permeabilisierung der Zellmembran und eine längere Färbezeit. Das Färbevolumen lag bei 90 μ l Blut plus ca. 26 μ l hinzugefügte Antikörper und die Zellkonzentration bei 10^6 bis 10^7 /ml; dies sind Mengen, die in einem optimalen Bereich für eine durchflusszytometrische Analyse liegen. Die Antikörperkonzentrationen wurden durch Titration unter standardisierten Bedingungen (Zellkonzentration, Volumen, Zeit, Waschschrte) mit unterschiedlichen Konzentrationen des zu titrierenden Antikörpers ermittelt. Ziel war dabei, die Konzentration so niedrig zu wählen, dass nur hochaffine Antigen-Antikörper-Reaktionen und nicht niedrigaffine Kreuzreaktionen möglich waren.

2.5.2 Antikörper, Labormaterialien und Geräte

CD-(Cluster of differentiation) Antigene auf Zelloberflächen dienen der Klassifizierung von verschiedensten Zellen. Die Expression von bestimmten CD-Antigenen auf der Oberfläche von Monozyten ermöglicht die Identifizierung durch Bindung von fluoreszenzmarkierten monoklonalen Antikörpern an CD-Antigene (Immunphänotypisierung). Spezifische Monozytenmarker sind die Antikörper gegen CD14 und CD33. CD45 fungierte als Panleukozytenmarker. Tabelle 16 zeigt diese und die Antikörper für die Messung der intrazellulären Zytokine.

Antikörper gegen	Fluoreszenzfarbstoff	Isotyp	Firma	Endkonzentration in Probe
TNF α	Fluorescein Isothiocyanate Isomer 1 (FITC)	IgG1	AbD Serotec, Oxford, UK	1:10
IL-10	R. Phycoerythrin (RPE)	IgG1	AbD Serotec, Oxford, UK	1:10
IL-1 β	FITC	IgG1 (Mouse)	Caltac Laboratories, San Francisco, CA	1:50
IL-6	Phycoerythrin (PE)	IgG1, κ (Rat)	eBioscience, San Diego, CA	1:40
CD14	FITC	IgG2a (Mouse)	Caltac Laboratories, San Francisco, CA	1:20
CD33	Cy 5,5	IgG1 κ (Mouse)	Caltac Laboratories, San Francisco, CA	1:20
CD45	Allophycocyanin (APC)	IgG1 (Mouse)	Caltac Laboratories, San Francisco, CA	1:100
Isotypkontrolle	Phycoerythrin (PE)	IgG1, κ (Rat)	eBioscience, San Diego, CA	1:10

Tabelle 16: Verwendete Antikörper

Zur Übersicht über die verwendeten Reagenzien, Materialien und Geräte siehe Tabelle 17, Tabelle 18 und Tabelle 19.

Reagenzien	Bestandteile/Eigenschaften	Verdünnung/ Lagerung	Firma
Brefeldin A (BFA)	1000-fach konzentriert in Methanol	Verdünnung 1:2 μ l (BFA:PBS), eingefroren bei -20°C zu je 40 μ l in Microtubes	NatuTec, Frankfurt am Main
FACS Lysing Solution	100 ml, 10-fach konzentrierte, gepufferte Lösung, <15% Formaldehyd und <50% Diethylenglycol	Verdünnung 1:10 ml (Lyse : destilliertes Wasser), Lagerung im Kühlschrank (4°C)	Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey
BD FACS Permeabilizing Solution 2	10-fach konzentrierte, gepufferte Lösung, <15% Formaldehyd, <50% Diethylenglycol und ein Permeabilizing Agenz	Verdünnung 1:10 μ l (FACS-Perm-Solution : destilliertes Wasser), Lagerung bei Raumtemperatur (ca. 22°C)	Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey
PBS-Medium	Natrium-Chlorid 8,0 g, Kaliumchlorid 0,2 g, di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat 1,15 g, Wasser für Injektion zu 1000 ml	Lagerung im Kühlschrank (4°C)	Apotheke Innenstadt Universität München, Pettenkofenstr. 8, 80336 München
PFA-Lösung 1%	Paraformaldehyd 10,0 g, Gereinigtes Wasser zu 1000 ml	Lagerung im Kühlschrank (4°C)	Apotheke Innenstadt Universität, Pettenkofenstraße, München
NaCl	Natrium-Chlorid	Lagerung im Kühlschrank (4°C)	Braun Melsingen AG, Melsingen

Tabelle 17: Verwendete Reagenzien

Materialien	Eigenschaften	Lagerung	Firma
Falcon 5 ml Tube	Nicht steril	Lagerung bei Raumtemperatur	Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey
Microtube 1,5 ml	Nicht steril	Lagerung bei Raumtemperatur	Sarstedt, Nürnberg
Eppendorf Pipetten	1-10 μ l; 1-20 μ l; 10-100 μ l; 100-1000 μ l	Lagerung bei Raumtemperatur	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Biosphere Pipetten	10 μ l; 100 μ l, 1000 μ l	Lagerung bei Raumtemperatur	Sarstedt, Nürnberg
Serological Pipette	25 ml	Lagerung bei Raumtemperatur	Greiner Bio One, Solingen

Tabelle 18: Verwendete Materialien

Geräte	Funktion	Firma
Brutschrank Memmert Typ U25	Inkubation bei 37°Celsius	Heinrich Rhode GmbH, Kirchheim
Rotina Zentrifuge	Zentrifugation (Umdrehungen 1500-4000)	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen
Vortex-Genie	Mischung	Bender&Hobein AG, Ismaning
FACSCalibur	Durchflusszytometrie	Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey
Cell-Quest Software (V. 3.1)	Akquisition und Auswertung	Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey
FACSComp Software (V. 4.1)	Geräteeinstellung und -kalibrierung	Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey

Tabelle 19: Verwendete Geräte

2.5.3 Probenverarbeitung

Die Vorgänge bei Blutentnahme, Transport, Stimulation und Inkubation der Blutproben ist in Kapitel 2.4 Versuchsaufbau dargestellt. Insgesamt gab es zwei verschiedene Antikörperkombinationen und eine Isotypkontrolle für die intrazelluläre Färbung der Zytokine (Tabelle 20 , Tabelle 21 und Tabelle 22).

Antikörper gegen	Fluoreszenzfarbstoff (FL)	Konzentration	In µl
TNF α	FITC (FL1)	1:10	10
IL-10	PE (FL2)	1:10	10
CD33	Cy 5,5 (FL3)	1:20	5
CD45	APC (FL4)	1:100	1

Tabelle 20: Antikörperkombination 1 (AK1)

Antikörper gegen	Fluoreszenzfarbstoff (FL)	Konzentration	In µl
IL-1 β	FITC (FL1)	1:5	20
IL-6	PE (FL2)	1:40	2,5
CD33	Cy 5,5 (FL3)	1:20	5
CD45	APC (FL4)	1:100	1

Tabelle 21: Antikörperkombination 2 (AK2)

Antikörper gegen	Fluoreszenzfarbstoff (FL)	Konzentration	In µl
CD14	FITC (FL1)	1:20	5
Isotypkontrolle	PE (FL2)	1:10	10
HLA-DR	Cy 5,5 (FL3)	1:20	5
CD45	APC (FL4)	1:100	1

Tabelle 22: Antikörperkombination 5 (AK5), Isotypkontrolle

Die Ansätze 2, 4, 6 und 8 wurden zur Färbung für die durchflusszytometrischen Messungen verwendet. Dazu wurden für jeden Ansatz fünf Röhrchen beschriftet, da fünf verschiedene Antikörperkombinationen gefärbt werden mussten. Pro

Patient wurden also 20 Röhrchen genutzt. Die intrazellulären Antikörperkombinationen waren AK1, AK2 und AK5 (siehe oben).

In jedes Röhrchen wurden 90 µl Blut gefüllt. Es folgte die Zugabe aller extrazellulären Antikörper in den titrierten Konzentrationen (CD14, CD33, CD45 und HLA-DR). Nach Mischung der Röhrchen wurden sie 10-15 Minuten im Dunkeln mit zusätzlicher Alufolienabdichtung inkubiert, um die Antigen-Antikörper-Bindung stattfinden zu lassen und die Farbstoffe vor Licht zu schützen. Anschließend wurden die Erythrozyten mit je 3 ml verdünnter Lyselösung lysiert. Dies ist ein gängiges Verfahren, um die Erythrozyten aus der Messprobe durch osmotische Lyse zu entfernen und so die Diskriminanz zwischen seltenen Zellen z. B. Leukozyten gegen Erythrozyten zu verbessern. Die Röhrchen wurden mit Vortex gut gemischt und 5 Minuten im Dunkeln inkubiert (mit zusätzlicher Alufolienabdichtung). Nach Zentrifugation für 5 Minuten bei 1500 Umdrehungen/ Minute (25° Celsius) wurde der Überstand abgekippt. Auf dem Boden der zentrifugierten Röhrchen befanden sich die nun isolierten Leukozyten und restliche Erythrozyten, erkennbar an der leicht roten Farbe. Diese Zellpellets wurden durch mehrmaliges Ziehen über ein weißes Gitter (Aufratschen) resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen mit 2 ml PBS gewaschen, um nicht gebundene Antikörper zu entfernen, und zentrifugiert (5 Minuten/ 1500 Umdrehungen/ Min./ 25 °Celsius). Es folgte ein erneutes Abkippen des Überstandes und Aufratschen der Pellets.

Die Permeabilisierung der Zellen erfolgte durch Zugabe von 500 µl verdünnter FACS-Permeabilizing-Solution und anschließender Inkubation für 10 Minuten. Danach wurde erneut mit 2 ml PBS gewaschen, zentrifugiert (5 Minuten/ 1500 Umdrehungen/ Min./ 25 °Celsius), der Überstand abgekippt und die Zellpellets durch Aufratschen resuspendiert. Die intrazellulären Zytokine in den isolierten Monozyten wurden nun spezifisch angefärbt (Zugabe der intrazellulären Antikörper IL1 β , IL6, IL10, TNF α und Isotypkontrolle). Die Antigen-Antikörperbindung fand in der folgenden 30-minütigen Inkubation im Dunkeln (mit zusätzlicher Alufolienabdichtung) statt. Es folgte ein letzter Waschschrift mit 2 ml PBS, um nicht gebundene Antikörper zu entfernen, und Zentrifugation (5 Minuten/ 1500 Umdrehungen/ Min./ 25 °Celsius). Der Überstand wurde abge-

kippt und resuspendiert. Zur Fixierung der Zellen und Produkte wurden 200 µl 1 % PFA hinzugefügt und sofort im FACS-Gerät gemessen.

2.5.4 Messung und Auswertung

Die Messung erfolgte mit dem Durchflusszytometer FACSCalibur™ der Firma Becton Dickinson. Vor und nach jeder Messung wurde zur Qualitätssicherung das FACS-Gerät mit FACS-Safe, Rinse und Flow-Flüssigkeit gespült (siehe Tabelle 23). Zur Geräteeinstellung und –kalibrierung wurde die FACSComp™ Software genutzt. Interne und externe Qualitätskontrollen wurden regelmäßig durchgeführt. Standardisierte Voreinstellungen zu Beginn der Messungen garantierten gleiche Bedingungen; so wurde zur Korrektur der spektralen Überlappung die Kompensation eingestellt. Die zu messenden Zellen wurden bei 15000 festgelegt.

Flüssigkeit	Funktion
FACS Safe	Dekontaminationslösung
FACS Rinse	Spül- und Reinigungslösung
FACS Flow	Trägerflüssigkeit

Tabelle 23: Flüssigkeiten von Becton Dickinson zur Qualitätssicherung der Messungen

Die digitalisierten Messdaten wurden gesichert und nach Abschluss der Patientenrekrutierung in einem engen zeitlichen Rahmen ausgewertet. Dabei wurden alle Patienten zu den jeweiligen Antikörperkombinationen (AK1-AK5) am Stück betrachtet, um einen geübten Blick auf die Tendenz bei der Abgrenzung der Monozyten von den restlichen Zellgruppen zu erlangen. Die Methode des Gating erfolgte nach den gleichen Bedingungen: Aufgrund der Vierfarbfluoreszenzanalyse entstanden drei Graphen aus den durchflusszytometrischen Messungen. Zuerst wurden die Monozyten von den Lymphozyten und neutrophilen Granulozyten durch die Auftragung FSC gegen SSC (Größe gegen Granularität) mit einem Gate abgegrenzt. Danach wurde die extrazelluläre, monozytenspezifische Markerfluoreszenz gegen SSC (Granularität) aufgetragen, um nur solche Monozyten im Gate zu erfassen, die mit den monoklonalen Antikörpern angefärbt worden waren und somit die Monozyten spezifisch darstellen. Die Summe der drei Gates entsprach somit CD14⁺ -/CD33⁺ -/ CD45⁺ - oder HLA-DR⁺-Monozyten.

In der anschließenden korrelierenden Zweiparameterdarstellung wurden die beiden interessierenden Fluoreszenzen (intrazelluläre Zytokine bzw. TLRs/HLA-DR) gegeneinander aufgetragen und mit der so genannten Quadrantenstatistik ausgewertet. Ziel der Quadrantenanalyse war, die prozentuale Entwicklung der Fluoreszenzen innerhalb eines Probanden quantifizieren zu können. Der Ansatz 2, unstimuliertes Blut nach vierstündiger Inkubation bei Raumtemperatur ohne BFA, eines jeden Patienten bzw. der gesunden Kontrollperson wurde als Negativkontrolle verwendet. Dabei wurde der Dotplot (Zellwolke) der Quadrantenanalyse, der sich als Summe der angefärbten Monozyten aus den drei vorherigen Gates darstellt, von einem Kreuz in vier Quadranten eingeteilt. Die vier Quadranten waren Lower Left (LL), Lower Right (LR), Upper Left (UL) und Upper Right (UR). Da der Ansatz 2 als Negativkontrolle festgelegt worden war, wurde bei diesem Ansatz jeweils die Zellwolke im doppelt negativen Bereich innerhalb der Quadranteneinteilung positioniert. Diese Position des Kreuzes wurde für die restlichen Ansätze des gleichen Probanden nicht mehr verändert und als Auswertemaske gespeichert (siehe Abbildung 4). Die angefärbten Monozytenpopulationen der Ansätze 4, 6 und 8 des gleichen Probanden wurden durch Gating jedes Mal exakt und erneut eingegrenzt (siehe oben). Anschließend konnten die jeweiligen Datensätzen der Ansätze 4, 6 und 8 des gleichen Patienten in die Auswertemaske der Negativkontrolle der Quadrantenanalyse kopiert werden. Prinzipiell erfolgte die Einteilung der Zellwolken innerhalb der Negativkontrolle (A2) in doppelt negativ (Zellwolke in LL) bei den intrazellulären Färbungen (AK1, AK2 und AK5) und negativ/positiv (Zellwolke in UL) bei den extrazellulären Färbungen (AK3 und AK4). So konnte eine prozentual veränderte Expression und Ausschüttung der gesuchten Fluoreszenzen durch Wanderung der Zellwolken innerhalb der Quadranten erkannt werden. Die Zellwolken lagen dann z. B. im doppelt positiven (UR) oder im einfach positiven Bereich (LR).

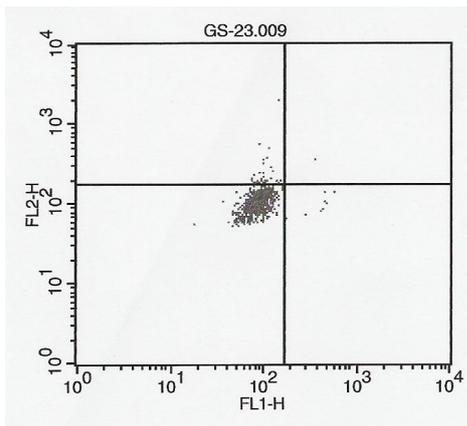


Abbildung 4: Quadrantenanalyse bei Ansatz 2, AK1, Negativkontrolle für diesen Probanden. TNF α (FL1) und IL10 (FL2) sind gegeneinander aufgetragen. Darstellung der vier Quadranten und manuelles Setzen des Kreuzes. Positionierung der Zellwolke in LL und somit Festlegung der TNF α ⁻ und IL10⁻ Monozyten (doppelt negativ).

Quadrant Statistics							
File: GS-23.009	Log Data Units: Linear Values						
Sample ID: GS-23	Patient ID:						
Tube:	Panel:						
Acquisition Date: 23-May-07	Gate: Monos						
Gated Events: 867	Total Events: 33736						
X Parameter: FL1-H (Log)	Y Parameter: FL2-H (Log)						
Quad Location: 168, 178							
Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean	X Geo Mean	Y Mean	Y Geo Mean
UL	34	3.92	0.10	104.65	102.57	289.09	241.12
UR	1	0.12	0.00	365.17	365.17	365.17	365.17
LL	824	95.04	2.44	88.28	86.06	103.11	99.96
LR	8	0.92	0.02	406.08	385.42	99.96	96.14

Abbildung 5: Statistische Werte der Quadrantenanalyse für Ansatz 2, AK1 (siehe oben). Die Parameter (FL1 und FL2) werden logarithmiert und die Mittelwerte errechnet.

Zum Gruppenvergleich wurde die Histogrammanalyse verwendet. Die Werte waren ebenfalls die Summe aus den zuvor gegateten Monozyten der drei Dotplots. Es flossen so abhängig vom jeweiligen Antikörperansatz nur CD33⁺CD45⁺Monozyten (intrazelluläre Zytokinmessung) oder CD14⁺CD45⁺ bzw. CD14⁺HLA-DR⁺Monozyten (TLR- und HLA-DR-Messung) in die Analyse ein. Die interessierende Fluoreszenz (X-Achse) mit ihrer Lichtintensität wurde gegen die Zellzahl (Y-Achse) aufgetragen und Mittelwert, Median und Standardabweichung der Fluoreszenzintensität ermittelt (siehe Abbildung 6 und Abbildung 7).

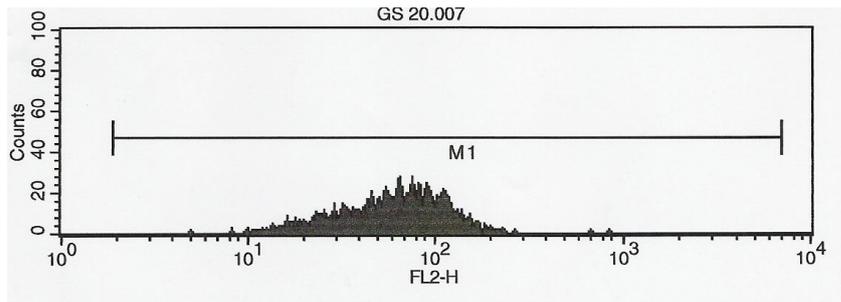


Abbildung 6: Histogrammanalyse Ansatz 8, AK3 (nur FL2). TLR-4 (FL2) auf CD14⁺HLA-DR⁺ Monozyten ist gegen die Zellzahl aufgetragen. Der zu ermittelnde Bereich wird durch M1 festgelegt.

Histogram Statistics										
File: GS 20.007	Log Data Units: Linear Values									
Sample ID: GS 20	Patient ID:									
Tube:	Panel:									
Acquisition Date: 16-May-07	Gate: Monos									
Gated Events: 2701	Total Events: 62080									
X Parameter: FL2-H (Log)										
Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median	Peak	Ch
All	1, 9910	2701	100.00	4.35	68.27	58.02	59.54	63.21	63	
M1	2, 6978	2701	100.00	4.35	68.27	58.02	59.54	63.21	63	

Abbildung 7: Statistische Werte der Histogrammanalyse für Ansatz 8, AK3 (nur FL2). Der Parameter auf der X-Achse wird logarithmiert und Mittelwert, Median und Standardabweichung für M1 der Fluoreszenzintensität ermittelt.

Die Datenauswertung erfolgte zur internen Qualitätssicherung zweifach und unabhängig, sowohl durch mich als auch durch meine Mitdotorandin. Es erfolgte ein graphischer und statistischer Vergleich der Absolutdaten der Mittelwerte. Es wurden die Mittelwerte beider Auswerterinnen auf der x- und y- Achse aufgetragen und betrachtet, ob die Punkte dem Idealfall entsprechend auf der Winkelhalbierenden liegen. Eine Korrelationsanalyse der jeweiligen Mittelwerte sollte den Zusammenhang der Werte ermitteln. 1,0 bedeutete, dass die Werte entweder gleich oder exakt linear abhängig waren; Werte nahe 0 bedeuteten hingegen keinen Zusammenhang und damit Unabhängigkeit. Die Abbildungen Abbildung 8 und Abbildung 9 zeigen am Beispiel des IL-1 β unstimuliert und nach Polyl:C-Stimulation den graphischen und statistischen Vergleich.

Sämtliche Korrelationsberechnungen erbrachten Werte über 0,96 bis 1,0. Die Mittelung der Mittelwerte beider Analysen ist somit Grundlage der Ergebnisse.

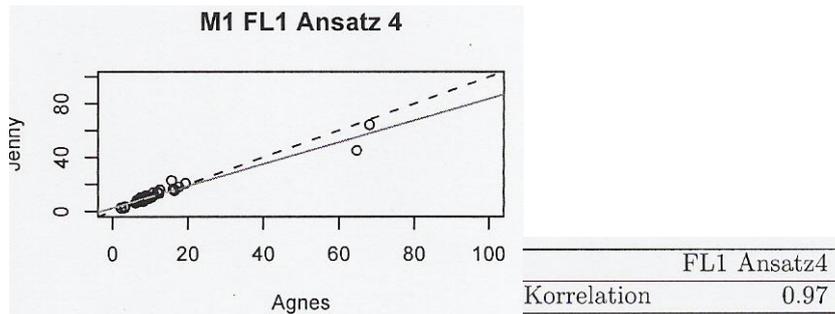


Abbildung 8: Beispiel des graphischen und statistischen Vergleiches der Mittelwerte nach Auswertung der Histogrammanalyse. IL-1 β , Ansatz 4, unstimuliert im Brutschrank bei 37°C.

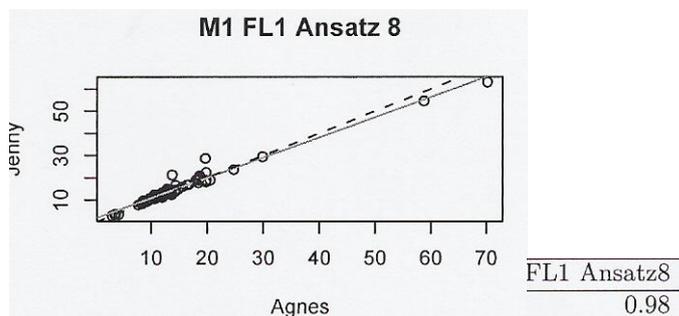


Abbildung 9: Beispiel des graphischen und statistischen Vergleiches der Mittelwerte nach Auswertung der Histogrammanalyse. IL-1 β , Ansatz 8, Polyl:C stimuliert im Brutschrank bei 37°C.

2.6 Bestimmung des extrazellulären Zytokins IL-1 β

2.6.1 Prinzip des High Sensitivity Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay (ELISA)

Zur Bestimmung der humoralen Immunantwort im Serum mit dem extrazellulären Zytokin IL-1 β im Serum wurde ein spezifischer Enzyme Linked Immunosorbent Assay verwendet. Hierbei handelt es sich um ein immunologisches, auf einer enzymatischen Farbreaktion beruhendes Nachweisverfahren. Die verwendeten Platten sind mit einem monoklonalen Antikörper gegen IL-1 β beschichtet, um vorhandenes IL-1 β im Plasma spezifisch zu binden. Nach Abwaschen und damit Entfernung aller ungebundenen Substanzen, wird ein enzymatisch-gebundener, polyklonaler IL-1 β -Antikörper hinzugefügt. Nach weiteren

Wasch- und Verdünnungsschritten und einer Inkubationszeit kann die Farbin-
tensität proportional zur Menge des Zytokins photometrisch gemessen werden.

2.6.2 Labormaterialien und Geräte

Es wurde das Quantikine HS Human IL-1 β /IL-1F2 Immunoassay- Kit der Firma
R&D Systems, Minneapolis, USA verwendet. Den Inhalt beschreibt Tabelle 24.

Inhalt
IL-1 β HS Micro plate (96 well)
IL-1 β HS Conjugate
IL-1 β HS Standard
Assay Diluent RD1-82
Calibrator Diluent RD6-44
Wash Buffer Concentrate
Substrate
Substrate Diluent
Amplifier
Amplifier Diluent
Stop Solution
Plate Covers

Tabelle 24: Inhalt des Quantikine HS IL-1 β /IL-1F2 Immunoassay-Kits

Der verwendete ELISA-Reader war der Sunrise™ der Firma Tecan, Männedorf,
Schweiz, mit der dazugehörigen Software Magellan™.

2.6.3 Probenverarbeitung

Vor dem Gebrauch wurden die Serum-Proben aufgetaut, dadurch auf Raum-
temperatur gebracht und sämtliche Reagenzien und Standards nach den Vor-
gaben des Herstellers vorbereitet (siehe Kitbeschreibung). Der IL-1 β -Standard
wurde mit 1 ml destilliertem Wasser wiederhergestellt; diese Grundlösung bein-
haltete somit 80 pg/ml. Die Standardverdünnung wurde mit 900 μ l Calibrator-
Diluent RD6-44 (500 μ l pro Falcon-Röhrchen) und der Standardlösung herge-
stellt. 8 pg/ml war der höchste Standardwert, 0,0625 pg/ml der kleinste. Die
Platte wurde mit 100 μ l Assaydiluent bestückt, anschließend wurde 150 μ l Pro-
be in jede Vertiefung der Platte gegeben und 3 Stunden bei Raumtemperatur
inkubiert. Es folgten 6 Waschschrte und die Zugabe von 200 μ l Konjugat mit 3-
stündiger Inkubation bei Raumtemperatur. Das nicht gebundene Konjugat wur-
de durch 4-maliges Waschen entfernt. Danach wurden 50 μ l Substrate Lösung

(Farbentwicklungslösung) in jede Vertiefung pipettiert, für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend die Reaktion mit 50 µl Amplifier Lösung bei 30-minütiger Inkubation verstärkt. Mit der Zugabe von 50 µl Stop-Lösung wurde der Assay beendet und die Extinktion bei 490 nm innerhalb von 30 Minuten gemessen.

2.6.4 Messung und Auswertung

Die Messung der Proben erfolgte jeweils innerhalb von 30 Minuten bei einer Wellenlänge von 490 nm mit dem Photometer des Psychiatrischen Labors der Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie der LMU München. Die Wellenlänge wurde mit der Referenz 690 nm korrigiert. Anhand der jeweiligen Standardkurven wurden die Messwerte in der Einheit pg/ml ermittelt.

Die Auswertung erfolgte nachträglich zusätzlich manuell-graphisch, um fehlende Werte zu ermitteln.

2.7 Bestimmung der extrazellulären Toll-like Rezeptoren TLR-2, TLR-3 und TLR-4 und des Aktivierungsmarkers HLA-DR

2.7.1 Prinzip

Die Bestimmung der extrazellulären Toll-like Rezeptoren und des Aktivierungsmarkers HLA-DR erfolgte durch Anfärbung der gesuchten Rezeptoren (Antigene) mit fluoreszenzmarkierten monoklonalen Antikörpern. Da die Antigene auf der Oberfläche der Monozyten lokalisiert sind, erforderte die Anfärbung weniger Zeit und Arbeitsschritte. Das Färbevolumen lag bei 90 µl plus 20 µl hinzugefügte Antikörper; die Antikörperkonzentration wurde wie bei der intrazellulären Färbung durch Titration ermittelt (siehe dazu auch 2.5.1 Prinzip).

2.7.2 Antikörper, Labormaterialien und Geräte

Zur Identifikation der Monozyten wurde ebenfalls ein Antikörper gegen den spezifischen Monozytenmarker CD14 verwendet. CD45 fungierte als Panleukozytenmarker (siehe oben Tabelle 16). Eine Übersicht über die verwendeten Toll-

like Rezeptoren-Antikörper und den Antikörper gegen den Aktivierungsmarker HLA-DR gibt Tabelle 25.

Antikörper gegen	Fluoreszenzfarbstoff	Isotyp	Firma	Endkonzentration in Probe
TLR-2	Allophycocyanin (APC)	Mouse IgG2a, κ	eBioscience, San Diego, CA	1:10
TLR-3	Phycoerthrin (PE)	Mouse IgG1, κ	eBioscience, San Diego, CA	1:20
TLR-4	Phycoerthrin (PE)	Mouse IgG1	eBioscience, San Diego, CA	1:10
HLA-DR	PE-Cy 5,5	Mouse IgG2b	Caltac Laboratories, San Francisco, CA	1:20

Tabelle 25: Verwendete Toll-like-Rezeptor-Antikörper

2.7.3 Probenverarbeitung

Die Vorgänge bei Blutentnahme, Transport, Stimulation und Inkubation der Blutproben gibt Kapitel 2.4 Versuchsaufbau wieder. Es existierten zwei Antikörperkombinationen (Tabelle 26 und Tabelle 27).

Antikörper gegen	Fluoreszenzfarbstoff (FL)	Konzentration	In μ l
CD14	FITC (FL1)	1:20	5
TLR-4	PE (FL2)	1:10	10
HLA-DR	Cy 5,5 (FL3)	1:20	5
TLR-2	APC (FL4)	1:10	10

Tabelle 26: Antikörperkombination 3 (AK3)

Antikörper gegen	Fluoreszenzfarbstoff (FL)	Konzentration	In μ l
CD14	FITC (FL1)	1:20	5
TLR-3	PE (FL2)	1:20	5
HLA-DR	Cy 5,5 (FL3)	1:20	5
CD45	APC (FL4)	1:100	1

Tabelle 27: Antikörperkombination 4 (AK4)

Von den fünf verschiedenen Antikörperkombinationen (AK1-5) gehörten also zwei zu den extrazellulären (AK3 und AK4); für die intrazellulären Kombinationen und Beschriftung der Röhrrchen siehe 2.5.3 Probenverarbeitung.

In jedes Röhrrchen wurden 90 μ l Blut gefüllt. Es folgte die Zugabe aller extrazellulären Antikörper in den titrierten Konzentrationen (CD14, CD45, HLA-DR, TLR-2, TLR-3 und TLR-4). Nach Mischung der Röhrrchen wurden sie 10-15 Mi-

nuten im Dunkeln mit zusätzlicher Alufolienabdichtung inkubiert. Anschließend wurden die Erythrozyten mit je 3 ml verdünnter Lyselösung lysiert. Die Röhrchen wurden mit Vortex gut gemischt und 5 Minuten im Dunkeln inkubiert (mit zusätzlicher Alufolienabdichtung). Nach Zentrifugation für 5 Minuten bei 1500 Umdrehungen/ Minute (25° Celsius) wurde der Überstand abgekippt. Auf dem Boden der zentrifugierten Röhrchen befanden sich die nun isolierten Leukozyten und restliche Erythrozyten, erkennbar an der leicht roten Farbe. Diese Zellpellets wurden durch mehrmaliges Ziehen über ein weißes Gitter (Aufratschen) resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen mit 2 ml PBS gewaschen, um nicht gebundene Antikörper zu entfernen, und zentrifugiert (5 Minuten/ 1500 Umdrehungen/ Min./ 25 ° Celsius). Es folgte ein erneutes Abkippen des Überstandes und Aufratschen der Pellets. Zur Fixierung der Zellen wurden 200 µl 1 % PFA hinzu gegeben und sofort gemessen.

2.7.4 Messung und Auswertung

Siehe hierfür Kapitel 2.5.4, Messung und Auswertung.

2.8 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Statistikprogramm SPSS 17.0. Die Anamnesedaten wurden mit dem Chi-Quadrat-Test ausgewertet. Nach graphischer Betrachtung der Messwerte in Diagrammform und Anwendung des Kolmogorov-Smirnov-Tests wurde beurteilt, ob die Daten normalverteilt oder nicht normalverteilt vorlagen. Bei Teilen des Differentialblutbildes und beim CRP war von einer Normalverteilung auszugehen, weswegen als Testverfahren der t-Test angewendet wurde. Der t-Test gehört zu der Gruppe der parametrischen Testverfahren und untersucht, ob sich die Mittelwerte zweier unabhängiger Gruppen systematisch unterscheiden oder ob die Unterschiede zufällig entstanden sind und kein echter Unterschied zwischen den beiden untersuchten Gruppen besteht. Der Stichprobenkennwert des t-Tests ist dabei die Differenz der Mittelwerte. Die Nullhypothese nimmt an, dass die Mittelwertdifferenz zufäl-

lig entstanden ist. Die Nullhypothese lautet also: „Es bestehen keine Unterschiede zwischen Schizophrenen und gesunden Kontrollen.“

Bei sämtlichen anderen Messdaten wurde keine Normalverteilung angenommen, weswegen der Mann-Whitney-U-Test als nicht parametrisches Testverfahren angewendet wurde. Der Mann-Whitney-U-Test ist ebenfalls ein Verfahren zum Vergleich zweier unabhängiger Gruppen und überprüft die Nullhypothese, dass die beiden untersuchten Gruppen aus der gleichen Verteilung stammen. Die Nullhypothese ist somit die Gleiche wie die des t-Tests. Im Unterschied zum t-Test analysiert der Mann-Whitney-U-Test die Messwerte nicht direkt, sondern die ihnen zugeordneten Rangplätze. Der Vorteil ist, dass die Signifikanzprüfung unabhängig von der Form der Verteilung der Messwerte in der Population erfolgt, d.h. auch für nicht normalverteilte Daten liefert der Test zuverlässige Ergebnisse. Außerdem ist er bei Analysen mit vielen Ausreißern zuverlässiger. Zum Nachweis der Stimulierbarkeit der Monozyten wurde der verbundene Wilcoxon-Test angewendet, ein nicht parametrischer Test äquivalent zum Mann-Whitney-U-Test, bei dem der Median beider Gruppen verglichen wird. Anschließend wurde die Veränderung der Mittelwerte, die durch die Stimulation hervorgerufen wurde, mit folgender Formel und Mann-Whitney-U-Test bestimmt: (Stimuliert-unstimuliert) / ursprüngliche Variable (unstimuliert). Dadurch wurde die Ausgangsexpression berücksichtigt und auf den Ausgangswert normiert.

Die deskriptive Quadrantenanalyse zeigt, wie sich nach Stimulation die Verteilung in den Quadranten verändert. Sie bezieht sich hauptsächlich auf die manuelle Auswertung während des Gatings bzw. der Quadrantenanalyse.

Die lineare Regressionsanalyse sollte beantworten, ob die Krankheit Schizophrenie ein Prädiktor für Unterschiede bei der Zytokinproduktion und TLR-Expression im Vergleich zu Gesunden ist. Die Regressionsanalyse, die Zusammenhänge zwischen Merkmalen beschreibt, zeigt somit die Variableneinflüsse. Die stimulierten Ansätze 6 und 8 dienten als Response, der Wert aus der unstimulierten Messung (Ansatz 4) wurde als Prädiktor in das Modell aufgenommen. Somit modelliert man den Mittelwert nach Stimulation, wobei man auf den unstimulierten Wert adjustiert. Dies ist eine übliche Vorgehensweise bei Messwiederholungen und im Allgemeinen einer reinen Differenzbildung vorzuziehen.

Die jeweiligen Mittelwerte wurden nach Bedarf logarithmiert, um das Gewicht der Ausreißer zu mindern. Zur Interpretation des Effekts bzw. des Einflusses der Krankheit Schizophrenie (Referenzkategorie gesunde Kontrollen) wird der Koeffizient (Estimate) betrachtet. Ist er <0 , erkennt man einen negativen Effekt, ist er >0 einen positiven. Ist der Koeffizient nahe 0 und nicht signifikant, kann kein Effekt der Krankheit Schizophrenie nachgewiesen werden.

Die Korrelationsberechnungen der klinischen Parameter der Schizophrenen (Alter, Erkrankungsbeginn, -dauer und klinischer Schweregrad der Erkrankung mit PANSS) erfolgten für die signifikanten Messwerte aus den FACS- und ELISA-Analysen. Für bivariate und zweiseitige Berechnungen wurde ein Korrelationskoeffizient nach Spearman zugrunde gelegt, da von keiner Normalverteilung auszugehen war. Das gleiche galt für die Korrelationsanalysen zwischen dem Alter der Gesunden und den signifikanten Messwerten.

Da es sich in dieser Arbeit um eine explorativ angelegte Studie handelt auf der Suche nach Zusammenhängen, wurde auf eine Korrektur für multiples Testen initial verzichtet. Vor dem Hintergrund der Vielzahl an gemessenen Variablen und damit statistischen Analysen und der zahlreichen gewonnenen, als signifikant zu bewertenden Ergebnisse, wurde zusätzlich eine Korrektur für multiples Testen mit der Benjamini-Hochberg-Prozedur durchgeführt. Dabei geschieht die Fehlerkontrolle mit der „false discovery rate“ (FDR). Sie gilt zwar als weniger strikt (im Vergleich zur Bonferroni-Holm-Korrektur), ist aber ein gängiges Verfahren bei explorativen Studien, die oftmals der Hypothesengenerierung dienen. Die FDR kontrolliert den erwarteten Anteil der fälschlich abgelehnten von allen abgelehnten Nullhypothesen mit größerer Power. Dieses Verfahren wurde gewählt, da es sich bei dieser Studie um eine explorative Studie mit zahlreichen untersuchten Variablen und Parametern in neuartigen Zusammenhängen handelt, die zu Nachfolgeuntersuchungen führen sollte.

In der Ergebnisdarstellung wird ein Signifikanzniveau von 95% zugrunde gelegt.

3 Ergebnisse

3.1 Anamnese

Die in die Studie eingeschlossenen 31 Patienten erfüllten die Diagnosekriterien nach ICD-10 und DSM-IV. In der Gruppe der Schizophrenen waren 13 Teilnehmer weiblich (41,9%), das Durchschnittsalter lag bei $36,7 \pm 4,9$ Jahren (Schwankungsbreite 17-63 Jahre). 18 Teilnehmer waren männlich (58,1%), bei ihnen lag der Mittelwert bei $37,2 \pm 13,2$ Jahren (20-65 Jahre). Das Alter des mittleren Erkrankungsbeginns lag bei $31,8 \pm 12,1$ Jahren. Über die Hälfte der Patienten (18) gab regelmäßigen Nikotinkonsum an (58%), 8 regelmäßigen Alkoholkonsum (26%) und 2 Patienten konsumierten aktuell Cannabis (7%). Nur ein Patient hatte einen Infekt (3%), die Infektanamnese bezüglich gehäufter früherer Infekte war bei 8 Patienten (26%) positiv.

In der gesunden Kontrollgruppe waren ebenfalls 13 Teilnehmer weiblich (41,9%), das Durchschnittsalter lag bei $36,9 \pm 15,0$ Jahren (Schwankungsbreite 17-65 Jahre). 18 Teilnehmer waren männlich (58,1%), ihr Durchschnittsalter lag bei $34,0 \pm 16,1$ Jahren (8-66). 6 Teilnehmer gaben regelmäßigen Nikotinkonsum an (19%), 4 regelmäßigen Alkoholkonsum (12%) und 2 Teilnehmer konsumierten regelmäßig Cannabis bzw. Cannabis und Speed (6%). Einen Überblick über diese und weitere Anamnesedaten gibt Tabelle 28.

	Anzahl (n)	Schizophrene	Anzahl (n)	Gesunde
Alter (Jahre), weibliches Geschlecht, MW±SD (Schwankungsbreite)	13	36,7 ± 4,9 (17 - 63)	13	36,9 ± 15,0 (17 - 65)
Alter (Jahre), männliches Geschlecht, MW±SD (Schwankungsbreite)	18	37,2 ± 13,2 (20-65)	18	34,0 ± 16,1 (8-66)
Erkrankungsbeginn (Jahre), MW±SD (Schwankungsbreite)	31	31,8 ± 12,1 (16 - 62)	0	0
Aktueller Nikotinabusus, n (%)	18	58%	6	19%
Regelmäßiger Alkoholkonsum, n (%)	8	26%	4	13%
Drogenabusus (aktueller Cannabiskonsum) n (%)	2	6,5%	2	6,5%
Familienanamnese für psychiatrische Erkrankungen, n (%)	5 (fehlend 5)	19%	2	6,5%
Geburtskomplikationen, n (%)	2 (fehlend 6)	8%	2	6,5%
Geburtskomplikation spezifiziert: Frühgeburt u. perinatale Hypoxie, n (%)	jeweils 1 (fehlend 6)	4%	2x Frühgeburt	6,5%
Allergie, n (%)	7	23%	11	35,5%
Atopie, n (%)	8	26%	11	35,5%
Infektanamnese, n (%)	8	26%	1	3%
Infekt, n (%)	1	3%	2	6,5%
Körperliche Erkrankung, n (%)	5	16%	5	16%
Aktuelle psychiatrische Medikamente (Neuroleptika)	1	3%	0	0%
Aktuelle psychiatrische Medikamente (andere)	11	35,5%	0	%
Frühere psychiatrische Medikamente (Neuroleptika)	16	52%	0	0%

MW= Mittelwert, SD= Standardabweichung, n= Anzahl

Tabelle 28: Anamnesedaten

Beim Vergleich der Gruppen mit dem Qui-Quadrat-Test ergaben sich signifikante Unterschiede bei der Verteilung von Nikotin-, Alkohol- und Drogenkonsum sowie in der aktuellen und früheren psychiatrischen Medikation. Die anderen anamnestischen Daten zeigten keine signifikanten Unterschiede (Tabelle 29).

		Schizophrene	Gesunde	Chi-Quadrat nach Pearson (asymptomatische Signifikanz)
Alter	Jahre	17-63	15-65	,799
Geschlecht	Weiblich	13	13	1,000
	Männlich	18	18	
Nikotin	Nie	8	25	,000
	Nein, früher	5	0	
	Aktuell	18	6	
Alkohol	Nie	11	3	,000
	Selten	9	4	
	Manchmal	2	20	
	Regelmäßig	8	4	
	Nicht aktuell, früher regel- mäßig	1	0	
Drogen	Nie	17	27	,006
	Nein, früher	12	1	
	Cannabis ak- tuell	2	2	
	Cannabis u. Speed	0	1	
Familienanamnese für psychiatrische Erkrankungen	Positiv	5	2	,143
	Negativ	21	29	
Geburtskomplika- tionen	Ja	2	2	,823
	Nein	23	29	
Geburtskomplika- tionen spezifiziert	a) Frühgeburt	1	2	,497
	b) Perinatale Hypoxie	1	0	
Infektanamnese	Ja	8	1	,012
	Nein	23	30	
Infekt	Ja	1	2	,554
	Nein	30	29	
Allergie	Ja	7	11	,263
	Nein	24	20	
Atopie	Ja	8	11	,409
	Nein	23	20	
Körperliche Er- krankung	Ja	5	5	1,000
	Nein	26	26	
Aktuelle psychiat- rische Medika- mente (Neurolep- tika)	Ja	1	0	,313
	Nein	30	31	

Aktuelle psychiatrische Medikamente (andere)	Ja	11	0	,000
	Nein	20	31	
Frühere psychiatrische Medikamente (Neuroleptika)	Ja	16	0	,000
	Nein	15	31	

Tabelle 29: Statistik der Anamnesedaten mit der asymptomatischen Signifikanz (Chi-Quadrat nach Pearson)

3.2 PANSS

Die PANSS (Positive and Negative Syndrome Scale) wurde bei allen 31 schizophrener Patienten erhoben. Die Werte lagen zwischen 53 und 128 Punkten (Mittelwert $92,61 \pm 20,34$) im Gesamt-PANSS. Dabei lagen die Punktwerte wie folgt:

- 53- 65 Punkte: 4 Patienten
- 67 -77 Punkte: 4 Patienten
- 78- 89 Punkte: 6 Patienten
- 90 -102 Punkte: 7 Patienten
- 106 -118 Punkte: 6 Patienten
- 122 -128 Punkte: 4 Patienten

Die erreichten Werte der Positivskala lagen zwischen 10 und 35 Punkten (Mittelwert $23,71 \pm 6,88$). Die Verteilung der Punktwerte lautete wie folgt:

- 10-20 Punkte: 11 Patienten
- 22-30 Punkte: 16 Patienten
- 31-35 Punkte: 4 Patienten

Die erreichten Werte der Negativskala lagen zwischen 7 und 39 Punkten (Mittelwert $23,90 \pm 7,60$). Die Verteilung der Punktwerte lautete wie folgt:

- 7-20 Punkte: 9 Patienten
- 21-30 Punkte: 15 Patienten
- 31-39 Punkte: 7 Patienten

Die Skala der Allgemeinpsychopathologie erbrachte in der Auswertung Punkte zwischen 27 und 63 (Mittelwert $45,00 \pm 9,89$). Die Verteilung der Punktwerte lautete wie folgt:

- 27-37 Punkte: 8 Patienten
- 39-49 Punkte: 13 Patienten
- 50-63 Punkte: 10 Patienten

3.3 CRP und Differentialblutbild

Der Kolmogorov-Smirnov-Test auf Normalverteilung zeigte, dass die Leukozyten, segmentierten neutrophilen Granulozyten und die Lymphozyten nicht normalverteilt waren, das CRP und das restliche Differentialblutbild hingegen schon.

Im Vergleich der beiden Gruppen (Schizophrene vs. Gesunde) zeigten sich die Leukozyten ($p=0,017$) und die Segmentierten der Schizophrenen ($p=0,002$) signifikant höher als die der Gesunden. Signifikant mehr Lymphozyten ($p=0,002$) hatten hingegen die Gesunden. Die statistische Signifikanz blieb nach der Benjamini-Hochberg-Prozedur für die Segmentierten ($p=0,019^*$) und Lymphozyten ($p=0,019^*$) erhalten. Im Gruppenvergleich für die Leukozyten bestand nach der Korrektur für multiples Testen kein Unterschied mehr. Einen Überblick über die Statistik und die Mittelwerte gibt Tabelle 30.

Mann-Whitney-U-Test	Studienkollektiv	N	MW	SD	Min. / Max.	Z	Rang	p-Werte
Leukozyten G/l	Schizophrene	31	6,59	1,70	3,7/11,7	-2,388	36,97	,017
	Gesunde	31	5,72	1,37	3,30/9,80		26,03	,085*
Segmentierte (%)	Schizophrene	31	62,65	9,00	37/81	-3,130	38,66	,002
	Gesunde	31	55,74	8,38	43/77		24,34	,019*
Lymphozyten (%)	Schizophrene	31	27,35	8,16	13/53	-3,117	24,37	,002
	Gesunde	31	33,84	7,79	18/46		38,63	,019*

Tabelle 30: Mann-Whitney-U-Test der Leukozyten, segmentierten neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten.

p-Werte: Keine Markierung = Mann-Whitney-U-Test ohne Korrektur für multiples Testen.

* = Mann-Whitney-U-Test mit Korrektur für multiples Testen nach der Benjamini-Hochberg-Prozedur.

Die Basophilen in % konnten bei jeweils 30 Schizophrenen und 30 Gesunden bestimmt werden, bei den Eosinophilen fehlte eine Angabe eines Schizophre-

nen. Aufgrund der Normalverteilung wurden die Gruppen Schizophrene und Gesunde mit dem t-Test (Varianzgleichheit nicht gegeben) miteinander verglichen. Die Schizophrenen hatten niedrigere Konzentrationen von Eosinophilen und Basophilen im Mittelwertvergleich zu den Gesunden. Diese zeigten niedrigere Monozytenkonzentrationen im Vergleich zu den Schizophrenen. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede im t-Test. Einen Überblick gibt Tabelle 31.

t-Test	Studienkollektiv	N	MW	SD	Min. / Max.	Standardfehler des MW	p-Werte
Eosinophile (%)	Schizophrene	31	2,42	1,50	0/6	,279	,225
	Gesunde	30	2,90	1,56	0/7	,285	,382*
Basophile (%)	Schizophrene	30	,60	,724	0/3	,132	,545
	Gesunde	30	,70	,535	0/2	,053	,625*
Monozyten (%)	Schizophrene	31	7,35	1,92	4/12	,346	,513
	Gesunde	31	7,06	1,53	5/12	,274	,614*

Tabelle 31: T-Test des restlichen Differentialblutbildes.

p-Werte: Keine Markierung = Mann-Whitney-U-Test ohne Korrektur für multiples Testen.

* = T-Test mit Korrektur für multiples Testen nach der Benjamini-Hochberg-Prozedur.

Das CRP lag bei den Schizophrenen im Durchschnitt etwas höher (Mittelwert $0,196 \pm 0,19$) im Vergleich zu den Gesunden (MW $0,189 \pm 0,19$). Aufgrund von einigen Ausreißern wurde zur besseren Stabilität des Testes der Mann-Whitney-U-Test verwendet. Signifikante Unterschiede ergaben sich allerdings nicht (Tabelle 32).

Mann-Whitney-U-Test	Studienkollektiv	N	MW	SD	Min. / Max.	Z	Rang	p-Werte
CRP (mg/dl)	Schizophrene	30	,196	,19	,10/,84	-1,074	33,13	,223
	Gesunde	31	,189	,24	,10/1,18		28,94	,382*

Tabelle 32: Statistik und Mittelwerte des CRP.

p-Werte: Keine Markierung = Mann-Whitney-U-Test ohne Korrektur für multiples Testen.

* = Mann-Whitney-U-Test mit Korrektur für multiples Testen nach der Benjamini-Hochberg-Prozedur.

3.4 Gruppenvergleich ohne Stimulation

3.4.1 Intrazelluläre Zytokine TNF α , IL-1 β , IL-6 und IL-10

Im Gruppenvergleich Schizophrene zu Gesunden fiel auf, dass die Produktion sämtlicher Zytokine des Ansatz 2 (unstimuliert, bei Raumtemperatur) bei den

Schizophrenen geringer war. Die IL-1 β Konzentration der Schizophrenen war (p-Wert= 0,000) hoch signifikant niedriger im Vergleich zu den gesunden Kontrollen. Die Benjamini-Hochberg-Prozedur bestätigte diesen signifikanten Unterschied der IL-1 β Konzentration (p=0,004*). Die restliche Zytokinproduktion zeigte sich nicht signifikant verändert. Die Mittelwerte stellen die mittlere Fluoreszenzintensität der intrazellulären Zytokine innerhalb der CD33⁺CD45⁺Monozyten dar. Einen Überblick über die Statistik und Mittelwerte gibt Tabelle 33.

ANSATZ 2 : Unstimuliert, bei Raum- temperatur		Studienkollektiv	N	MW	SD	Min. / Max.	Z	Rang	p-Werte
TNFα	Schizophrene		31	38,45	36,81	4,17/153,94	-1,302	28,52	,193
	Gesunde		31	45,73	33,79	5,23/136,20		34,48	,362*
IL-1β	Schizophrene		31	8,99	8,61	2,42/52,50	-3,822	22,74	,000
	Gesunde		31	12,45	7,79	6,88/51,08		40,26	,004*
IL-6	Schizophrene		31	113,64	32,41	58,18/204,0	-,922	29,39	,356
	Gesunde		31	122,31	31,57	74,95/192,0		33,61	,503*
IL-10	Schizophrene		31	112,98	47,50	47,98/238,4	-,725	29,84	,468
	Gesunde		31	114,41	39,21	53,89/201,3		33,16	,585*

Tabelle 33: Statistik der intrazellulären Zytokine. Ansatz 2, unstimuliert bei Raumtemperatur.

p-Werte: Keine Markierung = Mann-Whitney-U-Test ohne Korrektur für multiples Testen.

* = Mann-Whitney-U-Test mit Korrektur für multiples Testen nach der Benjamini-Hochberg-Prozedur.

Im Ansatz 4 (unstimuliert, im Brutschrank bei 37°C) fiel die Zytokinproduktion der Schizophrenen im Vergleich ebenfalls geringer aus, mit Ausnahme des IL-10. Hier lag die Konzentration der Schizophrenen im Mittelwertvergleich zu den gesunden Kontrollen in einem höheren Bereich. Die IL-1 β Konzentration der Schizophrenen war (p-Wert= 0,000) ebenfalls hoch signifikant niedriger im Vergleich zu den Gesunden, auch nach Korrektur für multiples Testen (p=0,004*). Außerdem lagen die IL-6-Werte der Schizophrenen grenzwertig signifikant niedriger (p=0,050) vor, was sich nach Korrektur mit der Benjamini-Hochberg-Prozedur nicht bestätigen ließ. TNF α und IL-10 zeigten keine signifikanten Unterschiede. Einen Überblick gibt Tabelle 34.

ANSATZ 4: Unstimuliert, Brutschrank bei 37°C		Studienkollektiv	N	MW	SD	Min. / Max.	Z	Rang	p-Werte
TNFα	Schizophrene	31	46,45	49,14	3,88/234,77	-,838	29,58	,402	
	Gesunde	31	47,87	35,49	3,95/140,52				33,42
IL-1β	Schizophrene	31	9,66	9,23	2,32/54,91	-3,696	23,03	,000	
	Gesunde	31	12,60	10,33	7,56/66,15				39,97
IL-6	Schizophrene	31	98,98	30,53	60,13/205,5	-1,964	27,00	,050	
	Gesunde	31	110,82	29,81	75,79/220,0				36,00
IL-10	Schizophrene	31	116,76	46,96	60,92/238,8	-0,92	31,71	,927	
	Gesunde	31	111,72	36,83	49,73/207,5				31,29

Tabelle 34: Statistik der intrazellulären Zytokine. Ansatz 4, unstimuliert im Brutschrank bei 37°C.

p-Werte: Keine Markierung = Mann-Whitney-U-Test ohne Korrektur für multiples Testen.

* = Mann-Whitney-U-Test mit Korrektur für multiples Testen nach der Benjamini-Hochberg-Prozedur.

3.4.2 Extrazelluläres Interleukin IL-1 β

Es lagen eingefrorene Serumproben von insgesamt 58 Teilnehmern (93,5%) vor. Von 3 schizophrenen Patienten und einer Kontrolle waren keine Proben vorhanden (6,5%). Im Kolmogorov-Smirnov-Test auf Normalverteilung fiel auf, dass die Werte beider unstimulierten Ansätze 1 und 3 normalverteilt waren. Deswegen wurde der t-Test verwendet, bei dem Ansatz 1 (unstimuliert, bei Raumtemperatur, sofortige Zentrifugation) varianzhomogen war und Ansatz 3 (unstimuliert 4 h im Brutschrank bei 37°C) varianzinhomogen (Levene-Test der Varianzgleichheit: $p=0,006$). Die Gesunden hatten im Ansatz 1 erhöhte Durchschnittskonzentrationen des IL-1 β im Serum im Vergleich zu den Schizophrenen. Im Ansatz 3 hingegen lagen die Schizophrenen im Mittelwertvergleich höher. Signifikante Unterschiede ergaben sich nicht. Einen Überblick über die Statistik und die Mittelwerte gibt Tabelle 35.

ELISA: Unstimuliert zentrifugiert/ im Brutschrank bei 37°C (4h)		Studienkollektiv	N	MW (pg/ml)	SD	Min. / Max.	Standard- fehler des MW	p-Werte
IL-1β	Schizophrene	28	,1075	,18985	<Min/0,91	,036	,241	
Ansatz 1	Gesunde	30	,2530	,62353	<Min/3,44	,114	,389*	
IL-1β	Schizophrene	28	,7904	1,65767	<Min/7,01	,313	,172	
Ansatz 3	Gesunde	30	,3400	,41320	<Min/2,15	,075	,341*	

Tabelle 35: Statistik des extrazellulären Zytokins IL-1 β im Serum: Messung mit ELISA. Ansatz 1, unstimuliert bei Raumtemperatur und Ansatz 3, unstimuliert im Brutschrank bei 37°C.

p-Werte: Keine Markierung = Mann-Whitney-U-Test ohne Korrektur für multiples Testen.

* = Mann-Whitney-U-Test mit Korrektur für multiples Testen nach der Benjamini-Hochberg-Prozedur.

3.4.3 Extrazelluläre Toll-like Rezeptoren TLR-2, TLR-3 und TLR-4 und Aktivierungsmarker HLA-DR

Im Mittelwertvergleich der Schizophrenen zu den gesunden Kontrollen zeigte sich, dass sämtliche Toll-like Rezeptoren und HLA-DR in beiden Ansätzen von den Schizophrenen vermehrt exprimiert wurden. Sowohl TLR-3 als auch TLR-4 wurden hoch signifikant ($p=0,005$ und $p=0,003$) stärker exprimiert. Dieser signifikante Unterschied zwischen den Schizophrenen und gesunden Kontrollen bestand nach der Korrektur für multiples Testen fort (TLR-3 $p=0,031^*$ und TLR-4 $p=0,025^*$). TLR-2 und HLA-DR wiesen keine Unterschiede im Gruppenvergleich auf. Die Mittelwerte stellen die mittlere Fluoreszenzintensität der extrazellulären TLRs und des Aktivierungsmarkers HLA-DR auf den CD14⁺HLA-DR⁺Monozyten bzw. CD14⁺CD45⁺Monozyten dar. Eine Übersicht gibt Tabelle 36.

ANSATZ 2: Unstimuliert, bei Raum- temperatur		Studienkollektiv	N	MW	SD	Min. / Max.	Z	Rang	p-Werte
TLR-2	Schizophrene	31	190,18	98,12	4,68/421,16	-1,429	34,77	,153	
	Gesunde	31	159,20	83,01	4,78/363,53		28,23	,312*	
TLR-3	Schizophrene	31	55,86	32,23	26,27/149,7	-2,823	37,97	,005	
	Gesunde	31	39,34	24,64	11,94/142,6		25,03	,031*	
TLR-4	Schizophrene	31	45,35	30,186	14,25/147,9	-2,921	38,19	,003	
	Gesunde	31	33,86	40,82	10,58/225,3		24,81	,025*	
HLA-DR	Schizophrene	31	93,89	80,81	4,13/464,67	-1,246	34,35	,213	
	Gesunde	31	80,59	67,50	28,44/396,4		28,65	,380*	

Tabelle 36: Statistik der extrazellulären Toll-like Rezeptoren und des Aktivierungsmarkers HLA-DR. Ansatz 2, unstimuliert bei Raumtemperatur.

p-Werte: Keine Markierung = Mann-Whitney-U-Test ohne Korrektur für multiples Testen.

* = Mann-Whitney-U-Test mit Korrektur für multiples Testen nach der Benjamini-Hochberg-Prozedur.

Im Gruppenvergleich des Ansatz 4 (unstimuliert, im Brutschrank bei 37°C) zeigten sich drei signifikante Unterschiede: TLR-3 ($p=0,002$) und TLR-4 ($p=0,001$) wurden hoch signifikant stärker von den Schizophrenen exprimiert. Die Benjamini-Hochberg-Prozedur belegte die signifikant höhere Expression bei den Schizophrenen (TLR-3 $p=0,019^*$ und TLR-4 $0,019^*$). Die HLA-DR-Werte ($p=0,045$) lagen ebenfalls höher bei den Schizophrenen im Vergleich zu den Gesunden, dieser tendenziell signifikante Unterschied konnte nach Korrektur für multiples Testen allerdings nicht bestätigt werden. TLR-2 zeigte sich nicht signifikant verändert. Einen Überblick gibt Tabelle 37.

ANSATZ 4: Unstimuliert, Brutschrank bei 37°C	Studienkollektiv	N	MW	SD	Min. / Max.	Z	Rang	p-Werte
TLR-2	Schizophrene	31	157,67	76,56	5,36/281,0	-,993	33,77	,321
	Gesunde	31	142,48	72,30	5,02/336,53		29,23	,463*
TLR-3	Schizophrene	31	46,42	24,44	23,52/118,4	-3,076	38,55	,002
	Gesunde	31	31,87	15,64	15,57/91,89		24,45	,019*
TLR-4	Schizophrene	31	38,14	23,58	13,83/115,3	-3,252	38,95	,001
	Gesunde	31	26,80	28,41	8,66/157,98		24,05	,019*
HLA-DR	Schizophrene	31	81,25	70,85	4,05/409,85	-2,006	36,10	,045
	Gesunde	31	61,32	54,91	22,31/333,7		16,50	,161*

Tabelle 37: Statistik der extrazellulären Toll-like Rezeptoren und des Aktivierungsmarkers HLA-DR. Ansatz 4, unstimuliert, im Brutschrank bei 37°C.

p-Werte: Keine Markierung = Mann-Whitney-U-Test ohne Korrektur für multiples Testen.

* = Mann-Whitney-U-Test mit Korrektur für multiples Testen nach der Benjamini-Hochberg-Prozedur.

3.5 Gruppenvergleich nach Stimulation

Um zu testen, ob die in-vitro-Stimulation insgesamt funktioniert hat, wurde der verbundene Wilcoxon-Test angewendet. Dieser ist ein eindimensionaler Vergleich der Entwicklung der Fluoreszenzen innerhalb einer Antikörperkombination zwischen verschiedenen Ansätzen einer Gruppe (Schizophrene oder Gesunde). Dabei wurde Ansatz 4 (unstimuliert, im Brutschrank bei 37°C) als Grundansatz festgelegt. Zum einen, weil die stimulierten Ansätze ebenfalls im Brutschrank bei 37°C inkubierten und zum anderen, weil 37°C eher der physiologischen Körpertemperatur des Menschen entsprechen. Der verbundene Wilcoxon-Test zeigte überall sehr deutliche Veränderungen ($p=0,0000$). Einziger Ausreißer war TNF α im Vergleich der Ansätze 4 und 8 (PolyI:C-stimuliert, im

Brutschrank bei 37°C), der keine signifikante eindimensionale Veränderung zeigte ($p=0,3777$ bei den Schizophrenen, $p=0,2990$ bei den Gesunden).

3.5.1 Bakteriellies Lipopolysaccharid: Intrazelluläre Zytokine

Im deskriptiven Gruppenvergleich schizophrene Patienten gegen Gesunde sollte gezeigt werden, wie sich nach Stimulation die Verteilung innerhalb der Quadranten verändert. Ursprünglich individuell für jeden Patienten gegatet, wurden die Werte für die beiden Gruppen zusammengefasst und graphisch betrachtet. Dabei wurden die vier Quadranten nachgebildet und mit Prozentzahlen versehen, sowie die „Wanderung“ vom Ausgangsquadranten in die Nachbarregionen mithilfe unterschiedlich dicker Pfeile dargestellt. Die große Prozentzahl in jeder Abbildung ist der Anteil in dem Ausgangsquadranten bei Ansatz 4, unstimuliert im Brutschrank bei 37°C. Von dort gehen proportional dicke Pfeile zu den jeweiligen Anteilswerten, hier zu denen des Ansatzes 6, LPS-stimuliert im Brutschrank bei 37°C. Die kleinen Prozentzahlen in Klammern stehen für die Werte in Ansatz 4.

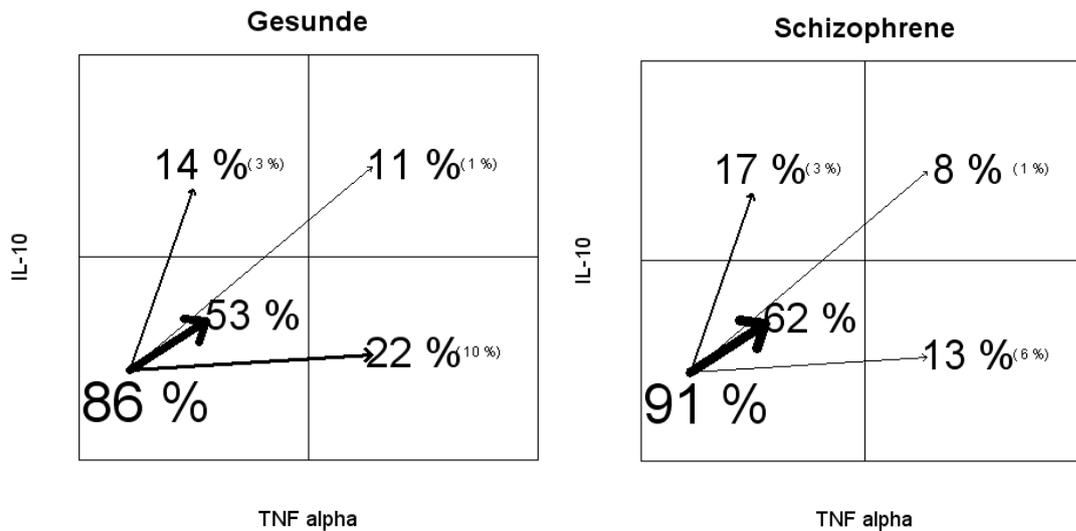


Abbildung 10: Deskriptiver Gruppenvergleich der Veränderung der Fluoreszenzen (%) innerhalb der Quadranten (Quadrantenanalyse). AK1, TNF α und IL-10. Ansatz 6, LPS-stimuliert im Brutschrank bei 37°C.

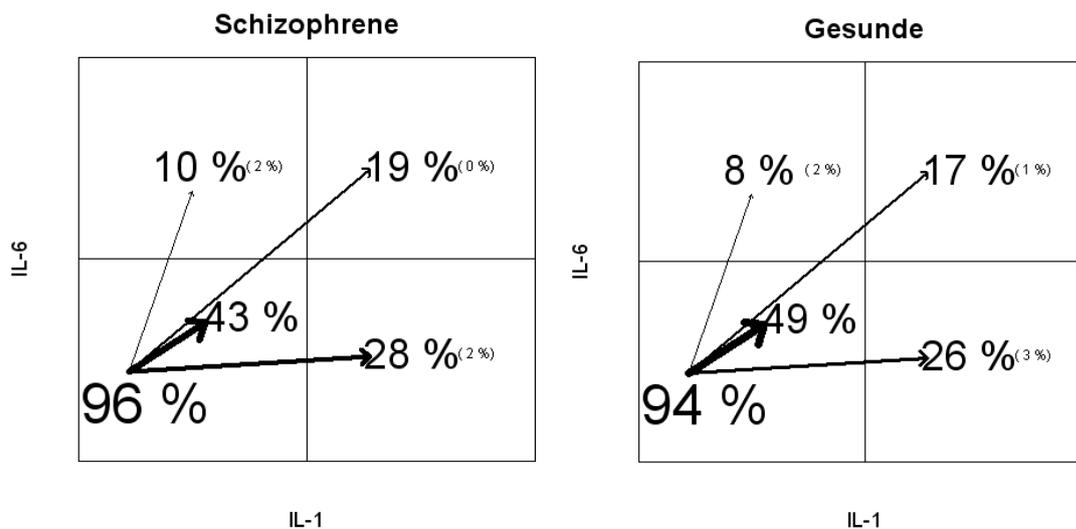


Abbildung 11: Deskriptiver Gruppenvergleich der Veränderung der Fluoreszenzen (%) innerhalb der Quadranten (Quadrantenanalyse). AK1, IL-1 und IL-6. Ansatz 6, LPS-stimuliert im Brutschrank bei 37°C.

Im Mittelwertvergleich schizophrene Patienten zu gesunden Kontrollen fiel auf, dass die Zytokine von den Erkrankten ebenfalls vermindert produziert wurden. Es ergaben sich zwei Tendenzen: Die TNF α ($p=0,060$) und IL-1 β Konzentrationen ($p=0,053$) der Schizophrenen waren tendenziell signifikant niedriger als die Konzentrationen der Gesunden. Die Korrektur für multiples Testen nach der

Benjamini-Hochberg-Prozedur konnte diese Tendenzen nicht bestätigen, so dass die LPS-stimulierten intrazellulären Zytokinkonzentrationen der beiden Gruppen nicht verschieden sind. Einen Überblick über die Statistik und Mittelwerte gibt Tabelle 38.

ANSATZ 6: Stimuliert, Brutschrank bei 37°C		Studienkollektiv	N	MW	SD	Min. / Max.	Z	Rang	p-Werte
TNFα	Schizophrene		31	51,16	40,99	5,08/177,91	-1,879	27,19	,060
	Gesunde		31	75,37	54,27	7,8/196,93		35,81	,169*
IL-1β	Schizophrene		31	18,26	10,11	5,78/58,18	-1,936	27,06	,053
	Gesunde		31	22,85	12,11	11,20/74,91		35,94	,165*
IL-6	Schizophrene		31	171,58	45,75	98,14/335,2	-0,359	30,68	,720
	Gesunde		31	178,70	60,17	82,30/351,1		32,32	,761*
IL-10	Schizophrene		31	191,10	75,95	96/410	-,401	30,58	,688
	Gesunde		31	194,30	75,87	89/451		32,42	,748*

Tabelle 38: Statistik der intrazellulären Zytokine. Ansatz 6, LPS-stimuliert, im Brutschrank bei 37°C.

p-Werte: Keine Markierung = Mann-Whitney-U-Test ohne Korrektur für multiples Testen.

* = Mann-Whitney-U-Test mit Korrektur für multiples Testen nach der Benjamini-Hochberg-Prozedur.

Der Vergleich stimuliert vs. unstimuliert (Ansatz 6 zu 4, beide im Brutschrank bei 37°C) sollte die Veränderung der Zytokinproduktion hervorgerufen durch die Stimulation zeigen. Im Gruppenvergleich ergab sich nur eine grenzwertige Signifikanz in Bezug auf die Veränderung und Stimulierbarkeit der IL-6 Konzentration bei den Schizophrenen ($p=0,051$). Sie sprachen besser als die Gesunden auf die Stimulation an. Diesen von vorne herein grenzwertig signifikanten Unterschied konnte die Benjamini-Hochberg-Prozedur nicht hervorbringen. Die restliche Zytokinproduktion der Schizophrenen ließ sich durch die Stimulation nicht signifikant im Vergleich zu den Gesunden beeinflussen, so dass die Gruppen bezüglich der Veränderung und Stimulierbarkeit nicht verschieden sind. Einen Überblick gibt Tabelle 39.

ANSATZ 6 vs. ANSATZ 4: Stimuliert vs. unstimu- liert	Studienkollektiv	N	MW	SD	Min. / Max.	Z	Rang	p-Werte
TNFα	Schizophrene	31	,36	,51	-,49/1,93	-1,570	27,90	,116
	Gesunde	31	,74	,79	-,10/2,79		35,10	,264*
IL-1β	Schizophrene	31	1,12	,46	,02/2,03	-1,542	35,03	,123
	Gesunde	31	,95	,56	-,10/2,44		27,97	,266*
IL-6	Schizophrene	31	,78	,35	,26/1,96	-1,950	35,97	,051
	Gesunde	31	,62	,40	,03/1,72		27,03	,165*
IL-10	Schizophrene	31	,67	,34	,08/1,55	-,500	30,35	,617
	Gesunde	31	,75	,38	,26/1,95		32,65	,691*

Tabelle 39: Statistik der Veränderung und Stimulierbarkeit der intrazellulären Zytokinproduktion. Ansatz 6 zu Ansatz 4, LPS-stimuliert zu unstimuliert, im Brutschrank bei 37°C.

p-Werte: Keine Markierung = Mann-Whitney-U-Test ohne Korrektur für multiples Testen.

* = Mann-Whitney-U-Test mit Korrektur für multiples Testen nach der Benjamini-Hochberg-Prozedur.

Die lineare Regressionsanalyse zeigte, dass die Krankheit Schizophrenie ein Prädiktor für Unterschiede unter LPS-Stimulation im Vergleich zu den Gesunden beim Zytokin TNF α ($p=0,011$) ist. Schizophrenie hatte einen negativen stimulativen Effekt auf die monozytäre Produktion von TNF α . Tendenziell konnte nach Korrektur für multiples Testen die gleiche Beobachtung gemacht werden ($p=0,062^*$). Die Krankheit Schizophrenie hatte bei sämtlichen anderen Zytokinen keinen signifikanten Effekt auf die Unterschiede zwischen den Gruppen. Einen Überblick der linearen Regressionsanalyse mit Estimate (Schätzung), Std. Error (Standardfehler), t-value (t-Wert) und Pr(>|t|) (p-Wert) gibt Tabelle 40.

ANSATZ 6	Estimate	Std. Error	t -value	Pr(> t)	B-HP
TNFα (Intercept) $R^2=0,8751$	0.95	0.16	5.81	,00000	
gruppeS	-0.24	0.09	-2.63	,0110	,062*
IL-1β (Intercept) $R^2=0,7667$	1.18	0.15	8.02	,00000	
gruppeS	0.01	0.06	0.14	,892	,904*
IL-6 (Intercept) $R^2=0,5057$	1.39	0.48	2.88	,00553	
gruppeS	0.08	0.05	1.44	,154	,312*
IL-10 (Intercept) $R^2=0,7047$	1.13	0.35	3.26	,00187	
gruppeS	-0.03	0.05	-0.77	,446	,577*

Tabelle 40: Lineare Regressionsanalyse für die Schizophrenen des Ansatz 6, intrazelluläre Zytokine. Referenzkategorie ist Ansatz 4 der Gesunden.

p-Werte: Keine Markierung = Mann-Whitney-U-Test ohne Korrektur für multiples Testen.

* = Mann-Whitney-U-Test mit Korrektur für multiples Testen nach der Benjamini-Hochberg-Prozedur (B-HP).

3.5.2 Bakteriellies Lipopolysaccharid: Extrazelluläres Zytokin IL-1 β

Das in-vitro stimulierte Vollblut (LPS-stimuliert, im Brutschrank bei 37°C) wurde nach der abgeschlossenen vierstündigen Stimulationszeit zentrifugiert und das Serum eingefroren. So lagen von insgesamt 58 Teilnehmern (93,5%) eingefrorene Serumproben vor. Von 3 schizophrenen Patienten und einer Kontrolle waren keine Proben vorhanden (6,5%). Der Kolmogorov-Smirnov-Test auf Normalverteilung erbrachte keine Normalverteilung des Ansatzes 5 (LPS-stimuliert, im Brutschrank bei 37°C). Im Mittelwertvergleich der beiden Gruppen lag die Konzentration des extrazellulären IL-1 β im Serum bei den Gesunden höher (Mittelwert 6,48 \pm ,314). Der Mann-Whitney-U-Test zeigte, dass die Gesunden signifikant mehr IL-1 β ausschütteten ($p=0,004$) als die Schizophrenen, ebenso nach der Benjamini-Hochberg-Prozedur ($p=0,027^*$). Einen Überblick über die Statistik gibt Tabelle 41.

ELISA: A5 Stimuliert im Brutschrank bei 37°C	Studienkollektiv	N	MW (pg/ml)	SD	Min. / Max.	Z	Rang	p-Werte
IL-1β	Schizophrene	28	6,1325	,51317	5,25/7,22	-2,849	22,96	,004
	Gesunde	30	6,4820	,31398	5,83/7,18		35,60	,027*

Tabelle 41: Statistik des extrazellulären Zytokins IL-1 β im Serum. Messung mit ELISA. Ansatz 5, LPS-stimuliert, im Brutschrank bei 37°C.

p-Werte: Keine Markierung = Mann-Whitney-U-Test ohne Korrektur für multiples Testen.

* = Mann-Whitney-U-Test mit Korrektur für multiples Testen nach der Benjamini-Hochberg-Prozedur.

3.5.3 Bakteriell Lipopolysaccharid: Extrazelluläre Toll-like Rezeptoren und Aktivierungsmarker HLA-DR

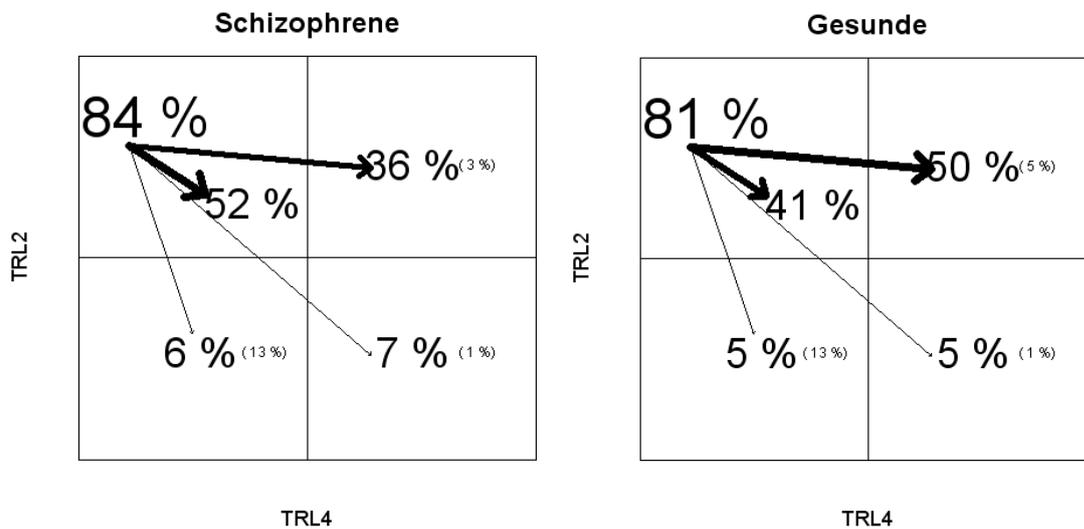


Abbildung 12: Deskriptiver Gruppenvergleich der Veränderung der Fluoreszenzen (%) innerhalb der Quadranten (Quadrantenanalyse). AK3, TLR-4 und TLR-2. Ansatz 6, LPS-stimuliert im Brutschrank bei 37°C.

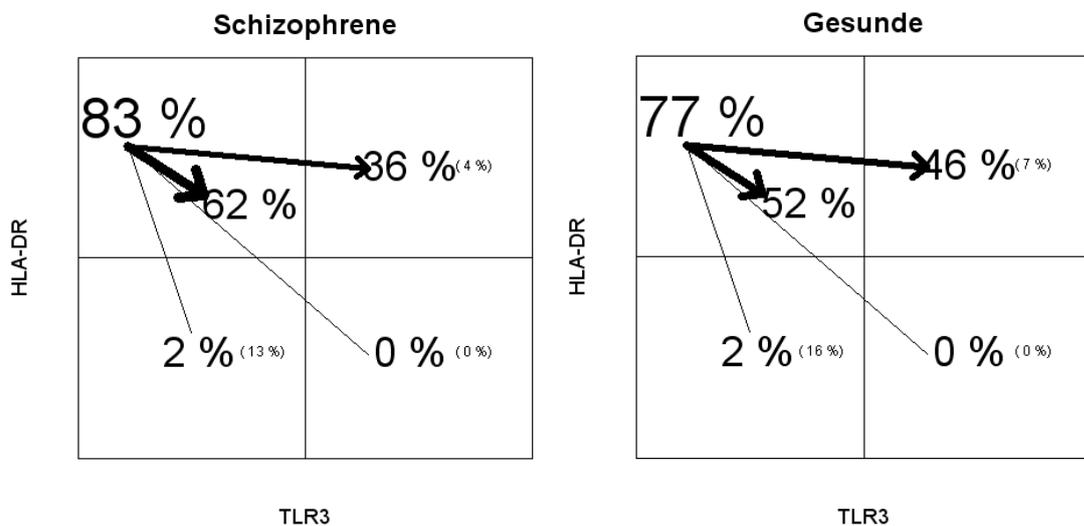


Abbildung 13: Deskriptiver Gruppenvergleich der Veränderung der Fluoreszenzen (%) innerhalb der Quadranten (Quadrantenanalyse). AK4, TLR-3 und HLA-DR. Ansatz 6, LPS-stimuliert im Brutschrank bei 37°C.

Die Toll-like Rezeptoren wurden von den Schizophrenen im Vergleich zu den Gesunden vermehrt exprimiert. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede.

de zwischen den Gruppen. Die TLR-4 Expression war bei den Schizophrenen tendenziell höher ($p=0,092$). Einen Überblick gibt Tabelle 42.

ANSATZ 6: Stimuliert, Brutschrank bei 37°C		Studienkollektiv	N	MW	SD	Min. / Max.	Z	Rang	p-Werte
TLR-2	Schizophrene		31	276,96	139,56	5,24/512,44	-,373	32,35	,709
	Gesunde		31	267,08	131,19	6,3/487,51		30,65	
TLR-3	Schizophrene		31	96,01	56,67	39,38/251,8	-1,147	32,12	,251
	Gesunde		31	80,34	43,58	29,50/229,7		28,87	
TLR-4	Schizophrene		31	87,52	44,423	32,88/192,0	-1,682	35,35	,092
	Gesunde		31	73,74	55,71	21,94/284,3		27,65	
HLA-DR	Schizophrene		31	249,60	254,80	10,34/1348,	-,589	32,87	,550
	Gesunde		31	216,22	246,68	50,34/1390,		30,13	

Tabelle 42: Statistik der extrazellulären Toll-like Rezeptoren und des Aktivierungsmarkers HLA-DR. Ansatz 6, LPS-stimuliert, im Brutschrank bei 37°C.

p-Werte: Keine Markierung = Mann-Whitney-U-Test ohne Korrektur für multiples Testen.

* = Mann-Whitney-U-Test mit Korrektur für multiples Testen nach der Benjamini-Hochberg-Prozedur.

Der Gruppenvergleich stimuliert vs. nicht stimuliert erbrachte zwei signifikante Unterschiede: TLR-3 wurde von den Gesunden im Vergleich zu den Schizophrenen signifikant vermehrt exprimiert ($p=0,021$), d.h., dass die Gesunden besser auf die Stimulation ansprachen. Nach Korrektur für multiples Testen konnte dieser signifikante Unterschied nicht weiter beobachtet werden. Die TLR-4 Werte der Gesunden veränderten sich im Vergleich zu den Schizophrenen ebenfalls hoch signifikant mehr ($p=0,004$). Die Benjamini-Hochberg-Prozedur erbrachte ebenfalls eine signifikant stärkere Veränderung bei den Gesunden ($p=0,027^*$). HLA-DR zeigte einen tendenziellen Unterschied (höhere Expression bei den Gesunden) mit dem p-Wert 0,098, der nach Korrektur für multiples Testen nicht gehalten werden konnte. Weitere Signifikanzen bestanden nicht. Einen Überblick gibt Tabelle 43.

ANSATZ 6 vs. ANSATZ 4: Stimuliert vs. unstimu- liert	Studienkollektiv	N	MW	SD	Min. / Max.	Z	Rang	p-Werte
TLR-2	Schizophrene	31	1,06	2,02	-,16/11,69	-1,302	28,52	,193
	Gesunde	31	,90	,53	-,40/2,05		34,48	,362*
TLR-3	Schizophrene	31	1,13	,67	,09/3,20	-2,316	26,19	,021
	Gesunde	31	1,57	,74	,53/3,55		36,81	,098*
TLR-4	Schizophrene	31	1,47	,76	,44/4,13	-2,89	24,87	,004
	Gesunde	31	2,10	1,03	,52/5,39		38,13	,027*
HLA-DR	Schizophrene	31	1,88	,83	,59/3,76	-1,65	27,71	,098
	Gesunde	31	2,33	1,08	,87/5,93		35,29	,233*

Tabelle 43: Statistik der Veränderung und Stimulierbarkeit der Toll-like Rezeptoren- und HLA-DR-Expression. Ansatz 6 zu Ansatz 4, LPS-stimuliert zu unstimuliert, im Brutschrank bei 37°C.

p-Werte: Keine Markierung = Mann-Whitney-U-Test ohne Korrektur für multiples Testen.

* = Mann-Whitney-U-Test mit Korrektur für multiples Testen nach der Benjamini-Hochberg-Prozedur.

Die lineare Regressionsanalyse zeigte, dass die Krankheit Schizophrenie ein negativer Prädiktor für Unterschiede unter LPS-Stimulation im Vergleich zu den Gesunden beim Aktivierungsmarker HLA-DR ($p=0,036$) ist. Schizophrenie beeinflusst die monozytäre Expression des HLA-DR nach Stimulation signifikant negativ. Dieser signifikante Unterschied konnte nach der Korrektur für multiples Testen nicht bestätigt werden. Die Krankheit Schizophrenie hatte bei sämtlichen Toll-like Rezeptoren keinen signifikanten Effekt auf die Unterschiede zwischen den Gruppen. Für TLR-3 und -4 ließen sich allerdings tendenzielle negative Effekte auf die Expression durch die Schizophrenie beobachten. Einen Überblick der linearen Regressionsanalyse mit Estimate (geschätzter Koeffizient), Std. Error (Standardfehler), t-value (t-Wert) und $Pr(>|t|)$ (p-Wert) gibt Tabelle 44.

ANSATZ 6	Estimate	Std. Error	t -value	Pr(> t)	B-HP
TLR-2 (Intercept)	0.80	0.25	3.20	,002	
$R^2=0,8555$ Schizophrene	-0.03	0.10	-0.26	,792	,835*
TLR-3 (Intercept)	1.43	0.31	4.69	,0000169	
$R^2=0,6144$ Schizophrene	-0.14	0.08	-1.79	,0787	,209*
TLR-4 (Intercept)	1.68	0.19	8.90	,0000000	
$R^2=0,7647$ Schizophrene	-0.13	0.07	-1.67	,0996	,233*
HLA-DR (Intercept)	0.77	0.22	3.44	,00108	
$R^2=0,8686$ Schizophrene	-0.16	0.07	-2.15	,0360	,142*

Tabelle 44: Lineare Regressionsanalyse für die Schizophrenen des Ansatz 6, extrazelluläre Toll-like Rezeptoren und Aktivierungsmarker HLA-DR. Referenzkategorie ist Ansatz 4 der Gesunden.

p-Werte: Keine Markierung = Mann-Whitney-U-Test ohne Korrektur für multiples Testen.

* = Mann-Whitney-U-Test mit Korrektur für multiples Testen nach der Benjamini-Hochberg-Prozedur (B-HP).

3.5.4 Virales PolyI:C: Intrazelluläre Zytokine

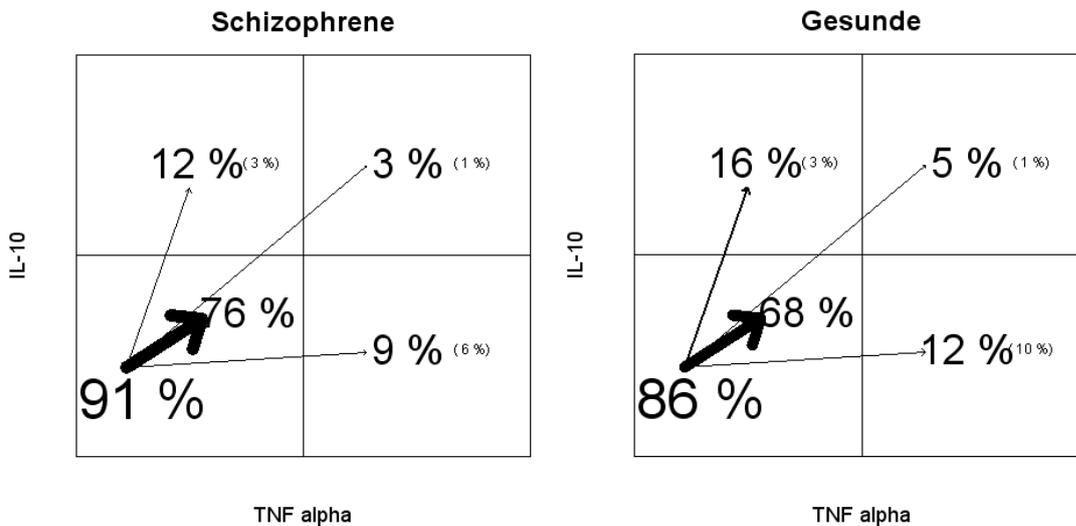


Abbildung 14: Deskriptiver Gruppenvergleich der Veränderung der Fluoreszenzen (%) innerhalb der Quadranten (Quadrantenanalyse). AK1, TNF α und IL-10. Ansatz 8, PolyI:C-stimuliert im Brutschrank bei 37°C.

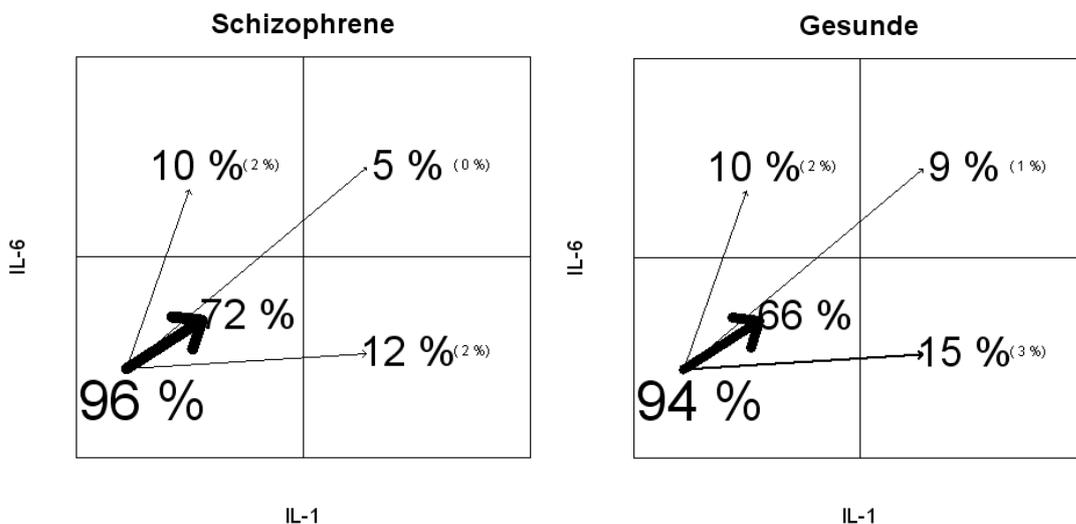


Abbildung 15: Deskriptiver Gruppenvergleich der Veränderung der Fluoreszenzen (%) innerhalb der Quadranten (Quadrantenanalyse). AK2, IL-1 β und IL-6. Ansatz 8, PolyI:C-stimuliert im Brutschrank bei 37°C.

Der Mittelwertvergleich der Schizophrenen zu den gesunden Kontrollen ergab ebenfalls eine höhere Grundproduktion der Zytokine bei den Gesunden. Die IL-1 β Konzentration war bei den Schizophrenen hoch signifikant niedriger ($p=0,002$) als die der Gesunden. Nach Korrektur für multiples Testen bestand die signifikant niedrigere IL-1 β Konzentration bei den Schizophrenen ($p=0,019^*$)

weiterhin. Die restlichen Zytokine zeigten keine signifikanten Unterschiede. Einen Überblick über die Statistik und Mittelwerte gibt Tabelle 45.

ANSATZ 8: Stimuliert, Brutschrank bei 37°C		Studienkollektiv	N	MW	SD	Min. / Max.	Z	Rang	p-Werte
TNFα	Schizophrene		31	41,63	33,82	4,09/143,12	-1,274	28,58	,203
	Gesunde		31	54,28	43,42	6,51/205,0		34,42	,371*
IL-1β	Schizophrene		31	13,08	9,93	2,91/56,66	-3,062	24,48	,002
	Gesunde		31	16,93	9,96	9,27/66,68		38,52	,019*
IL-6	Schizophrene		31	149,42	41,42	88,35/293,9	-,993	29,23	,321
	Gesunde		31	161,05	47,16	82,52/300,9		33,77	,463*
IL-10	Schizophrene		31	170,07	58,44	98,6/354,9	-,669	29,97	,504
	Gesunde		31	176,48	59,78	79,5/327,7		33,03	,614*

Tabelle 45: Statistik der intrazellulären Zytokine. Ansatz 8, PolyI:C stimuliert, im Brutschrank bei 37°C.

p-Werte: Keine Markierung = Mann-Whitney-U-Test ohne Korrektur für multiples Testen.

* = Mann-Whitney-U-Test mit Korrektur für multiples Testen nach der Benjamini-Hochberg-Prozedur.

Der Gruppenvergleich bezüglich der Veränderung der Zytokinproduktion durch die PolyI:C-Stimulation zeigte keine signifikanten Unterschiede. Einen Überblick gibt Tabelle 46.

ANSATZ 8 vs. ANSATZ 4: Stimuliert vs. unstimu- liert		Studienkollektiv	N	MW	SD	Min. / Max.	Z	Rang	p-Werte
TNFα	Schizophrene		31	,07	,35	-,64/93	-,795	29,68	,426
	Gesunde		31	,26	,71	-,42/3,55		33,32	,561*
IL-1β	Schizophrene		31	,43	,38	-,17/1,36	-,190	31,06	,849
	Gesunde		31	,45	,40	-,30/1,63		31,94	,872*
IL-6	Schizophrene		31	,54	,26	,09/1,31	-,993	33,77	,321
	Gesunde		31	,47	,31	-,06/1,29		29,23	,463*
IL-10	Schizophrene		31	,50	,22	-,03/84	-,852	29,55	,394
	Gesunde		31	,61	,37	,04/1,63		33,45	,537*

Tabelle 46: Statistik der Veränderung und Stimulierbarkeit der intrazellulären Zytokinproduktion. Ansatz 8 zu Ansatz 4, PolyI:C-stimuliert zu unstimuliert, im Brutschrank bei 37°C.

p-Werte: Keine Markierung = Mann-Whitney-U-Test ohne Korrektur für multiples Testen.

* = Mann-Whitney-U-Test mit Korrektur für multiples Testen nach der Benjamini-Hochberg-Prozedur.

Die lineare Regressionsanalyse zeigte, dass die Krankheit Schizophrenie keinen signifikanten Effekt auf Unterschiede unter PolyI:C-Stimulation zwischen den Gruppen hatte. Für IL-6 ließ sich ein tendenzieller negativer Effekt auf die Zytokinproduktion erkennen, der nach Korrektur für multiples Testen nicht mehr bestand. Einen Überblick gibt Tabelle 47.

ANSATZ 8		Estimate	Std. Error	t -value	Pr(> t)	B-HP
TNFα	(Intercept)	0.60	0.17	3.57	,000708	
R ² =0,8713	Schizophrene	-0.15	0.09	-1.56	,124	,266*
IL-1	(Intercept)	0.68	0.18	4.05	,000151	
R ² =0,7699	Schizophrene	-0.06	0.07	-0.89	,377	,524*
IL-6	(Intercept)	1.26	0.43	2.96	,004390	
R ² =0,5788	Schizophrene	0.03	0.047	0.59	,0555	,165*
IL-10	(Intercept)	1.33	0.31	4.26	,000075	
R ² =0,7161	Schizophrene	-0.05	0.05	-1.18	,244	,389*

Tabelle 47: Lineare Regressionsanalyse für die Schizophrenen des Ansatz 8, intrazelluläre Zytokine. Referenzkategorie ist Ansatz 4 der Gesunden.

p-Werte: Keine Markierung = Mann-Whitney-U-Test ohne Korrektur für multiples Testen.

* = Mann-Whitney-U-Test mit Korrektur für multiples Testen nach der Benjamini-Hochberg-Prozedur (B-HP).

3.5.5 Virales PolyI:C: Extrazelluläres Zytokin IL-1 β

Es lagen von insgesamt 58 Teilnehmern (93,5%) eingefrorene Serumproben des PolyI:C-stimulierten und anschließend zentrifugierten Vollblutes vor. Von 3 schizophrenen Patienten und einer Kontrolle waren keine Proben vorhanden (6,5%). Die IL-1 β Werte des Ansatzes 7 (PolyI:C-stimuliert, im Brutschrank bei 37°C) waren im Kolmogorov-Smirnov-Test normalverteilt. Im Mittelwertvergleich der beiden Gruppen zeigte sich, dass die Gesunden eine höhere IL-1 β Ausschüttung im Serum hatten als die Schizophrenen (MW 6,34 \pm 0,56). Ein signifikanter Unterschied bestand im t-Test allerdings nicht (Tabelle 48).

ELISA: A7 Stimuliert im Brutschrank bei 37°C	Studienkollektiv	N	MW (pg/ml)	SD	Min. / Max.	Standard- fehler des MW	p-Werte
IL-1 β	Schizophrene	28	6,1611	1,18748	,78/7,43	,224	,462
	Gesunde	30	6,3397	,55757	5,34/7,50	,102	,585*

Tabelle 48: Statistik des extrazellulären Zytokins IL-1 β . Messung mit ELISA. Ansatz 7, PolyI:C-stimuliert, im Brutschrank bei 37°.

p-Werte: Keine Markierung = Mann-Whitney-U-Test ohne Korrektur für multiples Testen.

* = Mann-Whitney-U-Test mit Korrektur für multiples Testen nach der Benjamini-Hochberg-Prozedur.

3.5.6 Virales PolyI:C: Extrazelluläre Toll-like Rezeptoren und Aktivierungsmarker HLA-DR

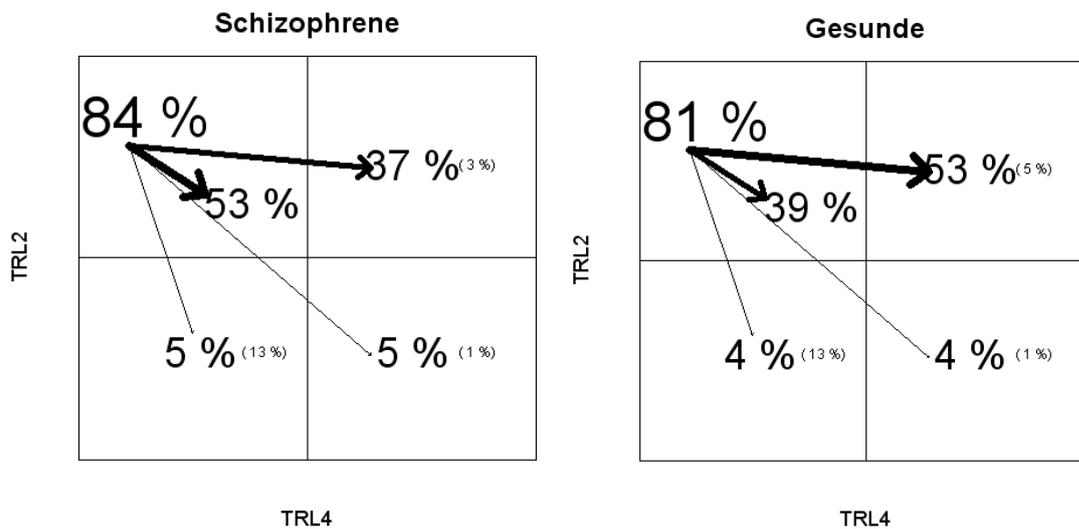


Abbildung 16: Deskriptiver Gruppenvergleich der Veränderung der Fluoreszenzen (%) innerhalb der Quadranten (Quadrantenanalyse). AK3, TLR-4 und TLR-2. Ansatz 8, PolyI:C-stimuliert im Brutschrank bei 37°C.

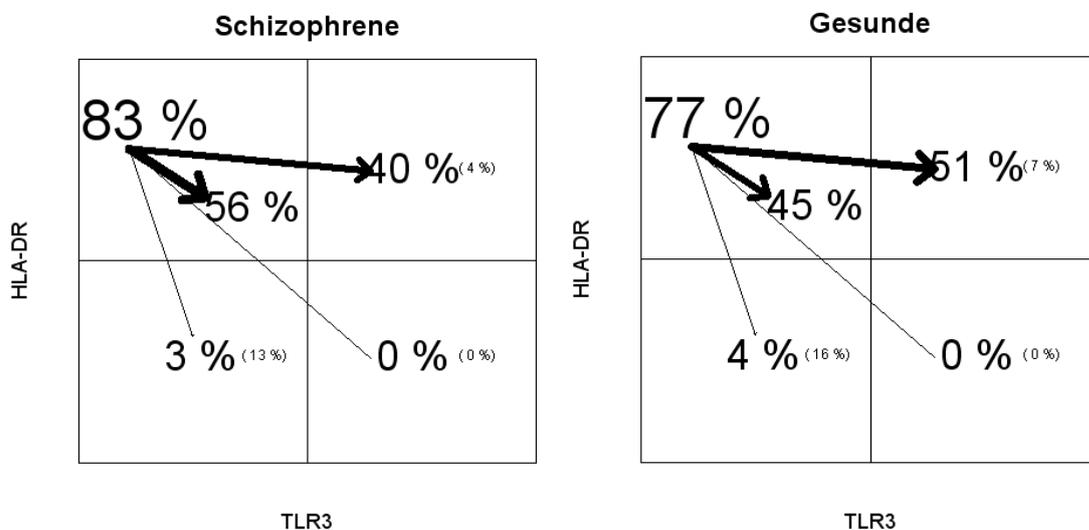


Abbildung 17: Deskriptiver Gruppenvergleich der Veränderung der Fluoreszenzen (%) innerhalb der Quadranten (Quadrantenanalyse). AK4, TLR-3 und HLA-DR. Ansatz 8, PolyI:C-stimuliert im Brutschrank bei 37°C.

Die Grundexpression der Toll-like Rezeptoren war bei den Schizophrenen im Mittelwertvergleich höher als die der Gesunden. Es zeigten sich zwei signifikante Unterschiede: TLR-3 wurde von den Schizophrenen im Vergleich zu den gesunden Kontrollen signifikant höher exprimiert ($p=0,032$), ebenso TLR-4

($p=0,061$). Beide signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen konnten durch die Benjamini-Hochberg-Prozedur nicht bestätigt werden. Somit unterscheiden sich Schizophrene und Gesunde bei der Expression ihrer TLRs und des HLA-DR nicht. Eine Übersicht gibt Tabelle 49.

ANSATZ 8: Stimuliert, Brutschrank bei 37°C		Studienkollektiv	N	MW	SD	Min. / Max.	Z	Rang	p-Werte
TLR-2	Schizophrene		31	271,57	144,77	4,79/522,54	-,458	32,55	,647
	Gesunde		31	260,04	124,76	4,8/496,08		30,45	,714*
TLR-3	Schizophrene		31	100,61	49,64	48,9/214,61	-2,147	36,42	,032
	Gesunde		31	81,96	45,19	22,06/252,8		25,58	,141*
TLR-4	Schizophrene		31	86,32	40,47	32,91/163,0	-1,872	35,79	,061
	Gesunde		31	74,06	56,09	27,12/306,2		27,21	,169*
HLA-DR	Schizophrene		31	214,87	269,36	5,06/1525,0	-,589	32,87	,550
	Gesunde		31	176,54	199,70	45,53/1126,		30,13	,625*

Tabelle 49: Statistik der extrazellulären Toll-like Rezeptoren und des Aktivierungsmarkers HLA-DR. Ansatz 8, PolyI:C-stimuliert, im Brutschrank bei 37°C.

p-Werte: Keine Markierung = Mann-Whitney-U-Test ohne Korrektur für multiples Testen.

* = Mann-Whitney-U-Test mit Korrektur für multiples Testen nach der Benjamini-Hochberg-Prozedur.

Im Gruppenvergleich stimuliert vs. unstimuliert ergab sich der hoch signifikante Unterschied der Expressionsveränderung von TLR-4 ($p=0,001$) bei den Gesunden. Sie sprachen hoch signifikant besser auf die Stimulation an, ein Effekt, der auch nach der Korrektur für multiples Testen beobachtet werden konnte ($p=0,019^*$). Die HLA-DR Expression der Gesunden konnte durch die Stimulation im Vergleich zu den Schizophrenen signifikant nach oben verändert werden ($p=0,038$). Dieser signifikante Unterschied konnte nach der Benjamini-Hochberg-Prozedur nicht bestätigt werden. Die beiden weiteren Toll-like Rezeptoren ließen sich in ihrer Expression nicht signifikant beeinflussen. Einen Überblick gibt Tabelle 50.

ANSATZ 8 vs. ANSATZ 4: Stimuliert vs. unstimu- liert	Studienkollektiv	N	MW	SD	Min. / Max.	Z	Rang	p-Werte
TLR-2	Schizophrene	31	,89	1,44	-,23/8,25	-1,204	28,74	,229
	Gesunde	31	,86	,54	-,15/1,96		34,26	,382*
TLR-3	Schizophrene	31	1,27	,62	,16/2,47	-1,711	27,58	,087
	Gesunde	31	1,61	,78	,42/4,25		35,42	,225*
TLR-4	Schizophrene	31	1,45	,69	,38/3,25	-3,287	23,97	,001
	Gesunde	31	2,12	,85	,51/4,15		39,03	,019*
HLA-DR	Schizophrene	31	1,33	,64	,25/2,72	-2,077	26,74	,038
	Gesunde	31	1,73	,82	,10/4,32		36,26	,143*

Tabelle 50: Statistik der Veränderung und Stimulierbarkeit der Toll-like Rezeptoren- und HLA-DR-Expression. Ansatz 8 zu Ansatz 4, PolyI:C-stimuliert zu unstimuliert, im Brutschrank bei 37°C.

p-Werte: Keine Markierung = Mann-Whitney-U-Test ohne Korrektur für multiples Testen.

* = Mann-Whitney-U-Test mit Korrektur für multiples Testen nach der Benjamini-Hochberg-Prozedur.

Die lineare Regressionsanalyse zeigte, dass die Krankheit Schizophrenie ein negativer Prädiktor für Unterschiede unter PolyI:C-Stimulation im Vergleich zu den Gesunden beim TLR- 4 ($p=0,0347$) und HLA-DR ($p=0,0116$) ist. Die Korrektur für multiples Testen erbrachte dieses Ergebnis lediglich tendenziell für HLA-DR ($p=0,062^*$). Schizophrenie hatte bei den beiden verbleibenden Toll-like Rezeptoren keinen signifikanten Effekt auf die Unterschiede zwischen den Gruppen. Einen Überblick der linearen Regressionsanalyse mit Estimate (geschätzter Koeffizient), Std. Error (Standardfehler), t-value (t-Wert) und $Pr(>|t|)$ (p-Wert) gibt Tabelle 51.

ANSATZ 8	Estimate	Std. Error	t -value	Pr(> t)	B-HP
TLR-2 (Intercept)	0.57	0.24	2.37	,0212	
$R^2=0,8747$ Schizophrene	-0.06	0.10	-0.65	,516	,614*
TLR-3 (Intercept)	1.48	0.28	5.19	,0000027	
$R^2=0,6528$ Schizophrene	-0.08	0.08	-1.06	,292	,447*
TLR-4 (Intercept)	1.76	0.17	10.49	,0000000	
$R^2=0,7933$ Schizophrene	-0.14	0.07	-2.16	,0347	,142*
HLA-DR (Intercept)	0.30	0.22	1.40	,168	
$R^2=0,8908$ Schizophrene	-0.18	0.07	-2.60	,0116	,062*

Tabelle 51: Lineare Regressionsanalyse für die Schizophrenen des Ansatz 8, extrazelluläre Toll-like Rezeptoren und Aktivierungsmarker HLA-DR. Referenzkategorie ist Ansatz 4 der Gesunden.

p-Werte: Keine Markierung = Mann-Whitney-U-Test ohne Korrektur für multiples Testen.

* = Mann-Whitney-U-Test mit Korrektur für multiples Testen nach der Benjamini-Hochberg-Prozedur (B-HP).

3.6 Korrelationsanalyse der Schizophrenen: klinische Parameter und signifikante Messwerte

Es wurde eine Korrelationsanalyse zwischen den erhobenen klinischen Parametern der Schizophrenen und den signifikanten Ergebnissen aus den Zytokin-, Toll-like Rezeptoren- und HLA-DR-Messungen durchgeführt. Die Zahl dieser signifikanten Ergebnisse verringerte sich nach der Benjamini-Hochberg-Prozedur für multiples Testen, so dass vor der Korrektur auf multiples Testen mehr Ergebnisse in die Korrelationsanalyse einfließen. Die betrachteten Parameter waren:

1. Alter der schizophrenen Patienten in Jahren
2. Erkrankungsbeginn in Jahren
3. Erkrankungsdauer in Jahren und
4. klinischer Schweregrad der Erkrankung (PANSS allgemein, Positiv- und Negativscala und Gesamt-PANSS).

Dabei wurden insgesamt wenig signifikante positive oder negative Korrelationen zwischen den klinischen Parametern und den signifikanten Messwerten gefunden. Die nachfolgend aufgeführten Korrelationskoeffizienten und p-Werte ohne Korrektur für multiples Testen werden nur für die signifikanten Ergebnisse dargestellt. Diese Signifikanzen blieben allesamt auch nach der Korrektur für multiples Testen mit der Benjamini-Hochberg-Prozedur (B-HP) innerhalb der Korrelationsanalyse bestehen, so dass eine Übersicht über die korrigierten p-Werte die nachfolgenden Tabellen geben.

Es bestand kein Zusammenhang zwischen dem klinischen Schweregrad der Patienten (PANSS) und den signifikanten Messwerten der Zytokine, TLRs oder des HLA-DR.

Die Korrelationen der intrazellulären Zytokine der Monozyten mit den klinischen Parametern waren alle positiv, was bedeutet: je jünger die Patienten waren, je früher die Erkrankung begann und je kürzer die Erkrankungsdauer war, desto niedriger lagen die Messwerte und umgekehrt. Das Alter der schizophrenen Patienten korrelierte positiv mit den LPS-stimulierten Zytokin $\text{TNF}\alpha$ ($r=0,399$, $p=0,020$) und dem intrazellulären $\text{IL-1}\beta$ der Monozyten im unstimulierten Zustand und nach LPS-Stimulation. Eine Übersicht gibt Tabelle 52.

Korrelation des Alters der Schizophrenen mit intrazellulären signifikant veränderten Zytokinkonzentrationen	N	Korrelationskoeffizient (r) nach Spearman	p-Wert (zweiseitige Signifikanz)	Korrigierter p-Wert mit der B-HP
LPS-stimuliert (A6) TNFα	31	,416*	,020	,037
Unstimuliert (A2) IL-1β	31	,397*	,027	,037
Unstimuliert (A4) IL-1β	31	,489*	,005	,030
LPS-stimuliert (A6) IL-1β	31	,404*	,024	,037

Tabelle 52: Korrelationen zwischen dem Alter der Schizophrenen und den intrazellulären Zytokinen TNF α und IL-1 β . Ein * steht für einen $p < 0,05$. Sämtliche Korrelationen sind positiv.

Der Erkrankungsbeginn der Schizophrenie korrelierte lediglich positiv mit dem LPS-stimulierten IL-1 β ($r=0,391$, $p=0,030$; Tabelle 53).

Korrelation des Erkrankungsbeginnes der Schizophrenie mit intrazellulären signifikant veränderten Zytokinkonzentrationen	N	Korrelationskoeffizient (r) nach Spearman	p-Wert (zweiseitige Signifikanz)	Korrigierter p-Wert mit der B-HP
LPS-stimuliert (A6) IL-1β	31	,391*	,030	,039

Tabelle 53: Korrelation zwischen dem Erkrankungsbeginn der Schizophrenie und dem LPS-stimulierten intrazellulären Zytokin IL-1 β . Ein * steht für einen $p < 0,05$.

Für die Erkrankungsdauer konnte ein positiver Zusammenhang mit dem intrazellulären IL-6 der Monozyten und ein negativer Zusammenhang mit dem extrazellulären IL-1 β (LPS-stimuliert) im Serum festgestellt werden (Tabelle 54).

Korrelation der Erkrankungsdauer der Schizophrenen mit intra- und extrazellulären signifikant veränderten Zytokinkonzentrationen	N	Korrelationskoeffizient (r) nach Spearman	p-Wert (zweiseitige Signifikanz)	Korrigierter p-Wert mit der B-HP
Unstimuliert (A4) IL-6	31	,369*	,041	,041
LPS-stimuliert (A5) IL-1β (pg/ml)	28	-,388*	,041	,041

Tabelle 54: Korrelation zwischen der Erkrankungsdauer der Schizophrenen und dem intrazellulären unstimulierten IL-6 und dem extrazellulären LPS-stimulierten IL-1 β im Serum. Ein * steht für einen $p < 0,05$.

Für die extrazellulären TLR-3 und TLR-4 und den Aktivierungsmarker HLA-DR bestanden nur negative Zusammenhänge. Einen Überblick gibt Tabelle 55. Ein negativer Zusammenhang zwischen Alter und Messwert bedeutet also: je jünger die Patienten waren, desto höher lagen die Messungen.

Korrelation des Alters der Schizophrenen mit signifikant veränderten extrazellulären TLR- und HLA-DR-Oberflächenrezeptoren	N	Korrelationskoeffizient (r) nach Spearman	p-Wert (zweiseitige Signifikanz)	Korrigierter p-Wert mit der B-HP
Unstimuliert (A2) TLR-3	31	-,412 *	,021	,037
Unstimuliert (A2) TLR-4	31	-,493**	,005	,030
Unstimuliert (A4) TLR-3	31	-,371**	,040	,041
Unstimuliert (A4) TLR-4	31	-,449**	,011	,031
Unstimuliert (A4) HLA-DR	31	-,382 *	,034	,041
PolyI:C-stimuliert (A8) TLR-4	31	-,463**	,009	,031

Tabelle 55: Korrelation zwischen dem Alter der Schizophrenen und den signifikant veränderten extrazellulären TLR-3-/TLR-4- und HLA-DR-Oberflächenrezeptoren. Ein * steht für einen $p < 0,05$, ** steht für $p < 0,01$. Sämtliche Korrelationen sind negativ.

Der Erkrankungsbeginn der Schizophrenie stand in einem negativen Zusammenhang mit den extrazellulären Messwerten (TLR-3/TLR-4, HLA-DR): Je eher also die Erkrankung auftrat, desto höher lagen die Messungen und umgekehrt. Einen zusammenfassenden Überblick gibt Tabelle 56.

Korrelation des Erkrankungsbeginns der Schizophrenie mit signifikant veränderten extrazellulären TLR- und HLA-DR-Oberflächenrezeptoren	N	Korrelationskoeffizient (r) nach Spearman	p-Wert (zweiseitige Signifikanz)	Korrigierter p-Wert mit der B-HP
Unstimuliert (A2) TLR-3	31	-,464**	,009	,031
Unstimuliert (A4) TLR-3	31	-,506**	,004	,030
Unstimuliert (A4) TLR-4	31	-,444**	,012	,031
Unstimuliert (A4) HLA-DR	31	-,425 *	,017	,037
PolyI:C-stimuliert (A8) TLR-4	31	-,402**	,025	,037

Tabelle 56: Korrelation zwischen dem Erkrankungsbeginn der Schizophrenie und den signifikant veränderten extrazellulären TLR-3-/TLR-4- und HLA-DR-Oberflächenrezeptoren. Ein * steht für einen $p < 0,05$, ** steht für $p < 0,01$. Sämtliche Korrelationen sind negativ.

TLR-4 zeigte in seiner verringerten Stimulierbarkeit nach LPS-Stimulation (A6 zu A4) einen positiven Zusammenhang zwischen Erkrankungsbeginn und seiner quantitativen Menge ($r = 0,379^*$, $p = 0,035$).

3.7 Korrelationsanalyse der Gesunden: Alter und signifikante Messwerte

Für die Gesunden wurde eine Korrelationsanalyse zwischen ihrem Alter in Jahren und den signifikanten Messwerten aus den Zytokin-, TLR- und HLA-DR-Bestimmungen analog zu den Schizophrenen durchgeführt. Nur das extrazelluläre LPS-stimulierte IL-1 β (Ansatz 5) im Serum (pg/ml) zeigte einen positiven Zusammenhang mit dem Alter der Gesunden ($r = 0,462^*$, $p = 0,010$).

Es fanden sich keine weiteren Zusammenhänge zwischen dem Alter der Gesunden und den restlichen signifikanten Messwerten.

4 Diskussion

Die Rolle des Immunsystems und seine möglichen Störungen bei der Entstehung, Verstärkung und Unterhaltung einer Schizophrenie werden seit Jahrzehnten in der Literatur beschrieben. Die Psychoneuroimmunologie geht davon aus, dass das Immunsystem mit seinen Wirkungen peripher und zentral mit dem zentralen Nervensystem (ZNS) interagiert. Psychiatrische Symptome und Krankheiten werden so in einen großen, übergreifenden Zusammenhang gestellt. Die Komplexität jedes einzelnen Systems trägt zur Komplexität einer psychiatrischen Erkrankung wie der Schizophrenie bei.

In dieser explorativen Fall-Kontroll-Studie sollten mögliche Zusammenhänge zwischen Immunsystem, evtl. gestörter Immunantwort vor allem auf der Seite der angeborenen Immunität und bakteriellen und viralen Infektionen als Auslöser oder Trigger der Erkrankung aufgezeigt werden. Dazu wurde das monozytäre System mit drei proinflammatorischen Zytokinen und einem antiinflammatorischen Zytokin untersucht. Bakterielle und virale Infektionen wurden durch gezielte in-vitro-Stimulation simuliert. Als Verbindungspunkt zwischen Infektion und Zytokinproduktion wurden außerdem Toll-like Rezeptoren gemessen, eben die Rezeptoren, die für die inflammatorische Signalübertragung in die immunologische Zelle (hier Monozyten) verantwortlich sind. HLA-DR wurde als Monozyten-spezifischer Aktivierungsmarker des Immunsystems betrachtet.

4.1 Diskussion der Methodik

Untersuchungskollektiv

Es handelte sich um eine explorative Querschnittsuntersuchung mit 31 Schizophrenen und 31 gesunden Kontrollen. Die Tatsache, dass die Schizophrenen nicht medikamentös behandelt waren, unterscheidet diese Studie von den meisten anderen in der Literatur beschriebenen. Dies bietet einerseits Vorteile, da die Ergebnisse als weniger durch Medikamenteneinnahmen beeinflusst angesehen werden können. Andererseits lässt sich die Studie dadurch schlechter methodisch und inhaltlich mit anderen Studien vergleichen. Mögliche Einflussfaktoren auf das Immunsystem wie Alter und Geschlecht waren bei beiden

Gruppen ausgeglichen. Der Alkohol-, Drogen- und Nikotinkonsum zeigte allerdings stärkere Unterschiede. Vor allem die Unterschiede beim Nikotinkonsum bedürfen einer genaueren Betrachtung.

Blutproben und Messmethodik

Abnahmezeitpunkt und Verarbeitung der Blutproben erfolgten meist morgens mit umgehender Bearbeitung am selben Tag. Durch das verwendete Vollblut konnte so am ehesten ein in-vivo-Zustand erfasst werden. Die Einhaltung sämtlicher Zeitangaben des Studienprotokolls gewährleistete standardisierte Bedingungen.

Die Analyse des Blutes erfolgte mit Durchflusszytometrie (FACS). Diese gut etablierte Methode wird seit langer Zeit verlässlich zur klinischen Diagnostik und wissenschaftlichen Forschung eingesetzt. Die Stimulation mit LPS und PolyI:C über 4 Stunden im Brutschrank bei 37°C simulierte eine bakterielle und virale Infektion unter physiologischen Bedingungen. Die Stimulationszeit von 4 Stunden wurde nach Testung unterschiedlich langer Stimulationszeiten und in Übereinstimmung mit aktueller Literatur bestimmt. Demnach haben intrazelluläre Zytokine in Monozyten und Makrophagen ihren Höhepunkt während der Ausschüttung nach vierstündiger Inkubation (Himmelfarb, Le, Klenzak, Freedman, McMenamin, Ikizler 2004; Shimotakahara, Metzelder, Vieten, Ure, Kuebler 2010). Durch die Zugabe von Brefeldin A (BFA) nach 2 Stunden sollte die Detektion der Zytokine in der Zelle durch Anreicherung im endoplasmatischen Retikulum verbessert werden. Die intrazelluläre Anfärbung der Zytokine TNF α , IL-1 β , IL-6 und IL-10 in Monozyten von Schizophrenen und Gesunden mit monoklonalen, farbstoffmarkierten Antikörpern stellt unseres Wissens eine neue Methodik für die Betrachtung und Bewertung von Zytokinkonzentrationen im Zusammenhang mit einer Schizophrenie dar. Bisher wurde nur die Zytokinausschüttung im Plasma, Serum oder Liquor von Schizophrenen gemessen. Diese somit allesamt extrazellulären Zytokinmessungen stellen einen großen Unterschied zu unserer Studie dar. Die Analyse der intrazellulären Zytokine ermöglicht eine genauere und physiologischere Beurteilung. Insgesamt muss während der folgenden Diskussion und Interpretation der Ergebnisse stets be-

dacht werden, dass die Untersuchung von reinen Monozyten nicht vergleichbar mit den anderen Ergebnissen sind.

Mikrobielle Pathogene gelten lange als Risikofaktoren für eine Schizophrenie. Die meisten Studien fokussierten sich allerdings auf die Familie der Viren wie auf Herpesviren (Niebuhr, Millikan, Yolken, Li, Weber 2008) und den Bornavirus (Nunes, Itano, Amarante et al. 2008), auf das intrazelluläre Bakterium *Chlamydia* (Fellerhoff, Laumbacher, Mueller, Gu, Wank 2007) und auf das Protozoon *Toxoplasma gondii* (Yolken, Bachmann, Ruslanova et al. 2001). Unsere bakterielle und virale Stimulation hingegen kann weitere Hinweise auf die pathophysiologischen Mechanismen der Schizophrenie geben.

Toll-like Rezeptoren wurden unseres Wissens im Zusammenhang mit Schizophrenie und Zytokinproduktion bisher nicht wissenschaftlich untersucht. (Ni, Acevedo, Muralidharan, Padala, To, Jonakait 2007). Nur Ni et al. bezogen sich auf die prä- und perinatale Infektionshypothese, dass maternale Entzündungsreaktionen Einfluss auf eine neuronale Entwicklungsstörung haben könnten und somit eine Schizophrenie oder einen Autismus triggern (Patterson 2002; Zuckerman, Rehavi, Nachman, Weiner 2003). Sie setzten Toll-like Rezeptor-Agonisten ein, darunter auch LPS und PolyI:C, und beobachteten eine inflammatorische Stimulation von Mikrogliazellen in Rattenembryonen zur Produktion von Faktoren, die eine cholinerge Differenzierung anregen (Ni, Acevedo, Muralidharan, Padala, To, Jonakait 2007). Die in dieser Studie gemessenen Toll-like Rezeptoren waren monozytären und damit peripheren Ursprungs. Vor dem Hintergrund, dass über sie die Brücke zwischen inflammatorischer Signaltransduktion und intrazellulärer Reaktion geschlagen werden kann, ist dies ein Vorteil dieser Studie. Die Betrachtung zentraler Toll-like Rezeptoren, z.B. auf Mikrogliazellen oder Astrozyten, kann eine Erweiterung für das Verstehen der Pathophysiologie der Schizophrenie darstellen.

Die Messung der extrazellulären, auf der Oberfläche der Monozyten lokalisierten HLA-DR-Rezeptoren diente dazu, den Beginn der Immunantwort durch Erkennung und Bindung durch das HLA-DR-Antigen zu beurteilen.

Die IL-1 β -Konzentrationen wurden mit dem High Sensitivity Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay (ELISA) gemessen, ein ebenfalls sehr etabliertes Nachweisverfahren von Zytokinen im Plasma oder Serum. Das sofortige Einfrieren

bei erst -20°C und später -80°C und die anschließende längere Lagerungszeit könnten die Zytokinkonzentrationen beeinflusst oder sogar verringert haben. Außerdem lagen einige Werte bei der photometrischen Messung unter der Nachweisgrenze ($<\text{Min}$), so dass eine manuelle Nachbearbeitung per Grapherstellung erfolgte. Dadurch sind die Werte als weniger aussagekräftig und valide anzusehen.

Es wurde darauf geachtet, dass über den gesamten Studienzeitraum hinweg immer abwechselnd Schizophrene und gesunde Kontrollen untersucht wurden, um zum einen den Einfluss jahreszeitlicher Schwankungen und zum anderen messtechnisch bedingte Varianzen des Testsystems zu minimieren.

Limitierend kann der Zeitpunkt der Blutentnahme angesehen werden. Es handelt sich um nicht medikamentös behandelte Patienten und um Einmalmessungen. Es ist bekannt, dass Antipsychotika die Zytokinproduktion beeinflussen (O'Brien, Scully, Dinan 2008). Haloperidol und Clozapine reduzieren die $\text{TNF}\alpha$ -Ausschüttung im präfrontalen Kortex bei Ratten (Pae, Yoon, Kim et al. 2006) und zeigten keinen Effekt auf IL-6 (Song, Lin, Kenis, Bosmans, Maes 2000). Vor dem Hintergrund dieses unkontrollierbaren Medikamenteneinflusses lassen sich unsere Ergebnisse „reiner“ interpretieren. Die somit angefertigten Momentanaufnahmen implizieren Nachfolgemessungen in Serie, zu verschiedenen Messzeitpunkten und unter evtl. anschließender Medikation.

Statistik

Bei der Darstellung der Ergebnisse wurde auf eine Korrektur für multiples Testen initial verzichtet, da es sich um eine explorative Studie handelt und lediglich Zusammenhänge untersucht werden (siehe Kapitel 2.8). Vor diesem Hintergrund sind die Ergebnisse ohne Korrektur für multiples Testen als Tendenzen aufzufassen und kritisch zu betrachten.

Ziele einer explorativen Studie sind unter anderem, weitere Hypothesen zum beobachteten Themengebiet zu generieren und Ergebnisse bzw. Erkenntnisse zu erlangen, die zu weiterführenden und möglichst konfirmatorischen Studien führen. Der Verzicht auf eine Korrektur für multiples Testen stellt eine Quelle sowohl für Chancen als auch für Fehler dar. Die in dieser Studie erlangten Ergebnisse können zum Anlass genommen werden, die intrazellulären Zytokine

und Toll-like Rezeptoren im Zusammenhang mit Schizophrenie genauer und präziser zu untersuchen. Ergebnisse ohne statistische Signifikanz können aufgrund vieler Einflussfaktoren erlangt werden, z.B. aufgrund einer zu geringen Fallzahl oder nicht sehr stark ausgeprägten Unterschieden zwischen den Gruppen. In diesem Falle sind die nicht signifikanten Ergebnisse unabhängig von einer Korrektur für multiples Testen. Ohne eine Korrektur für multiples Testen wird allerdings riskiert, dass teilweise falschpositive Ergebnisse erbracht und interpretiert werden.

Aufgrund des explorativen Charakters der Studie wurden sehr viele unterschiedliche Variablen gemessen, die in diesem Zusammenhang zuvor noch nicht untersucht worden waren. Wegen der Vielzahl der untersuchten Parameter wurde neben der explorativen Auswertung die zusätzliche Korrektur für multiples Testen nach der Benjamini-Hochberg-Prozedur durchgeführt. Die Ergebnisse aus dieser Analyse konnten viele erlangte Signifikanzen bestätigen.

Einige Ergebnisse konnten den strengen Kriterien der Korrektur hingegen nicht standhalten, erscheinen aber dennoch interessant und weiter verfolgenswert. Die Ergebnisse nach der explorativen Auswertung behalten somit ihre tendenzielle Aussagekraft für nachfolgende Beobachtungen und bleiben bei der Diskussion und Interpretation ebenso Gegenstand der Betrachtung. Es wird allerdings darauf hingewiesen, dass die als signifikant bewerteten Ergebnisse aus den Analysen ohne Korrektur für multiples Testen zufällig entstanden sein könnten, da die Irrtumswahrscheinlichkeit nicht begrenzt bzw. kontrolliert wurde.

4.2 Diskussion der Ergebnisse

Differentialblutbild

Die Leukozyten (G/l) waren bei den Schizophrenen signifikant höher ($p=0,017$) und befanden sich mit Mittelwerten um $6,59 \pm 1,70$ G/l im absoluten Normalbereich. Nach der Korrektur für multiples Testen bestand diese Signifikanz nicht mehr. Die Messung deckte sich mit der erhöhten Monozytenanzahl (%) der Schizophrenen, die allerdings ebenfalls nicht signifikant war. Erhöhte Monozytenzahlen bei Schizophrenen wurden mehrfach in der Literatur beschrieben, so

dass unsere Messung tendenziell übereinstimmt (Dameshek 1930; Wilke, Arolt, Rothermundt, Weitzsch, Hornberg, Kirchner 1996; Muller, Riedel, Ackenheil, Schwarz 1999). Allerdings ist dies als bloße, grobe Beobachtung aufzufassen, da das Differenzialblutbild ein anderes Messverfahren ist als meistens zur Erfassung von Monozytenpopulationen angewendet wird. Durchflusszytometrisch wurden keine Monozytenpopulationen bestimmt, was in weiteren Studien zusammenhängend mit ihrer Zytokinproduktion o.ä. untersucht werden könnte.

CRP

Das C-reaktive Protein (mg/dl) der Schizophrenen, ein sensitiver diagnostischer und therapeutischer Marker, war nicht signifikant erhöht (Mittelwert $0,196 \pm 0,19$ mg/dl). Da CRP nicht nur bei Infektionen und Entzündungen ansteigen kann, die durch Anamnese und klinische Chemie ausgeschlossen wurden, sondern auch in Stresssituationen (Rothermundt, Arolt, Bayer 2001), kann dieser erhöhte Wert für ein erhöhtes Stresslevel bei den Schizophrenen stehen. Aufgrund der Erstdiagnose oder des akuten psychotischen Schubes, weswegen die Patienten vorstellig, stationär behandelt und in die Studie eingeschlossen wurden, waren die Patienten großem, evtl. schon länger andauerndem Stress ausgesetzt. Stress bezieht sich sowohl auf die physiologischen, endokrinen Bedingungen des Patienten als auch auf die äußeren Umstände wie Veränderung der Lebenssituation und Stigmatisierung. Das CRP stellt so einen kleinen Teil des Immunsystems dar. Der Faktor Stress sollte aber in Hinblick auf sämtliche Interpretationen der Ergebnisse beachtet werden.

CRP kann bei der Schizophrenie pathophysiologisch und klinisch beteiligt sein. Fan et al fanden Hinweise, dass bei schizophrenen Patienten höhere CRP-Werte zu einer schwerwiegenderen Psychopathologie führen könnten (Fan, Pristach, Liu, Freudenreich, Henderson, Goff 2007). Andere Studien kamen zu dem Ergebnis, dass erhöhtes CRP vor allem zu Einschränkungen im kognitiven Bereich führt, sowohl bei schizophrenen Patienten (Dickerson, Stallings, Origo, Boronow, Yolken 2007) als auch bei Gesunden (Yaffe, Lindquist, Penninx et al. 2003). Ein erhöhtes CRP bei Schizophrenen könnte für einen chronischen Entzündungsprozess oder Infekt stehen. Aufgrund seiner endothelbeeinflussenden Wirkung (Schalkwijk, Poland, van et al. 1999), wäre es möglich, dass

eine chronische Entzündung in bestimmten Gehirnregionen mikrovaskuläre Veränderungen hervorrufen könnte, die zu psychotischen Symptomen führen.

4.2.1 Keine Stimulation

Zytokine: TNF α , IL-1 β , IL-6 und IL-10

Rein deskriptiv betrachtet und ausgedrückt, lagen sämtliche gemessenen intrazellulären Zytokine der Schizophrenen in niedrigeren intrazellulären Konzentrationen vor als bei den Gesunden. Ausnahme bildete das IL-10, das beim Ansatz 4, also zu physiologischen Bedingungen, erhöht war.

Den Zytokinen wird schon länger eine wichtige Rolle in der immunologischen Schizophrenieforschung eingeräumt. Dabei ist die Studienlage zu den Konzentrationen der in dieser Arbeit untersuchten vier Zytokine nicht eindeutig bzw. inkonstant. Eine große Meta-Analyse aus 2008 untersuchte die Zytokinveränderungen aus 62 Studien mit über 3000 Schizophrenen, darunter waren auch IL-1 β , IL-6 und IL-10 (neben IL-1-Rezeptor-Antagonisten, IL-2 u.a.). Die peripheren Zytokinlevel von IL-6 (und anderen) waren signifikant erhöht, für die restlichen ergaben sich keine signifikanten Effekte (Potvin, Stip, Sepehry, Gendron, Bah, Kouassi 2008). Die erhöhten IL-6-Werte im Plasma, Serum und Liquor werden am konstantesten in der Literatur beschrieben (Muller, Riedel, Ackenheil, Schwarz 1999; Rothermundt, Arolt, Bayer 2001; Garver, Tamas, Holcomb 2003; Schmitt, Bertsch, Tost et al. 2005). Die Bedeutung des IL-6 muss sowohl in Bezug auf das periphere als auch auf das zentrale Immunsystem gesehen werden. Denn die Zytokine kommunizieren während pathologischer Zustände über verschiedene Mechanismen wie aktiver und passiver Transport, Second-Messenger und afferente Verbindungen mit dem ZNS (Watkins, Maier, Goehler 1995; Kronfol, Remick 2000). Die Zytokine werden allerdings auch direkt im Gehirn gebildet, wie z.B. in Mikrogliazellen, Astrozyten oder Neuronen, so dass die Wirkung verstärkt und schneller eintreten kann. Dem IL-6 wird eine triggere Funktion für das Ausbrechen von Autoimmunkrankheiten im ZNS zugeschrieben (Dunn 1992), da es die B-Zelldifferenzierung, die lokale, zentrale IgG-Synthese und eine Blut-Hirn-Schrankenstörung fördert (Frei, Malipiero, Leist, Zinkernagel, Schwab, Fontana 1989). Dabei sind eine Blut-Hirn-Schrankenstörung und eine erhöhte IgG-Synthese im Liquor bei Schizophrenie

mit einem höheren Risiko verbunden, Negativ-Symptome zu entwickeln (Muller, Ackenheil 1995). IL-6 soll sowohl neurotrophe als auch neurotoxische Effekte auf verschiedene Neuronentypen des Gehirns haben (Garver, Tamas, Holcomb 2003) und kann somit je nach Zeitpunkt die Gehirnentwicklung oder den – umbau beeinflussen. Des Weiteren wirkt IL-6 endokrin auf das katecholaminerger Neurotransmittersystem (Muller, Riedel, Ackenheil, Schwarz 1999). Im Zusammenhang mit klinischen Symptomen werden hohe IL-6-Level mit der Dauer der Erkrankung (Ganguli, Yang, Shurin et al. 1994) und Therapieansprechen (Lin, Kenis, Bignotti et al. 1998) assoziiert. Dass in dieser Arbeit die IL-6-Konzentrationen unstimuliert zu physiologischen Bedingungen (37°C) grenzwertig signifikant niedriger ($p=0,050$) im Vergleich zu den Gesunden waren, steht zwar im Gegensatz zu fast allen anderen Studien und muss kritisch gesehen werden, da diese Tendenz nach der Korrektur für multiples Testen nicht bestehen blieb. Allerdings ist es sehr schwierig diese Unterschiede wirklich zu beurteilen, da die Methodik sehr stark variiert. 2009 beschrieben Singh et al. erstmals ebenfalls signifikant erniedrigte Serum-IL-6-Level bei nicht- und medikamentös behandelten Schizophrenen (Singh, Bera, Nayak, Chaudhuri 2009). Aufgrund der Heterogenität der Schizophrenie mit der großen Breite an psychiatrischen Symptomen bleibt die Beurteilung der IL-6-Rolle schwierig. Methodische Unterschiede stellen ein Hindernis bezüglich des direkten Vergleiches der Ergebnisse dar, da unsere Zytokinmessungen intrazellulär stattfanden und somit nicht vergleichbar sind. Der Weg der Zytokine aus der Zelle könnte somit die Endkonzentration beeinflussen. Des Weiteren ist die Beurteilung peripherer Zytokinlevel in Bezug auf die Lokalisation und Auswirkung von zentralen Hirnstörungen eine Herausforderung. Die Rezeptorlokalisationen und damit der Ort der Zytokinwirkung in bestimmten Gehirnregionen spielen eine Schlüsselrolle bei der Entstehung von psychiatrischen Symptomen. IL-1 β und IL-6 scheinen besonders am Hypothalamus sehr wirksam zu sein (Spangelo, Judd, Isakson, MacLeod 1991; Shintani, Kanba, Nakaki et al. 1993; Muller 1997). In dieser Arbeit waren akute und chronische Infektionen ausgeschlossen worden, so dass ein normales Zytokinlevel zu erwarten war. Die verringerte Ausschüttung kann für ein mögliches monozytäres Defizit der Schizophrenen und somit für eine gestörte Immunantwort stehen.

Die bisher angenommene These, dass es bei Schizophrenen zu einem Ungleichgewicht zwischen der Typ-1- und Typ-2-Immunantwort mit Verlagerung zur Typ-2-Immunantwort kommt (Muller 1997), wird partiell bestätigt. IL-6 müsste demnach erhöht sein, ebenso wie IL-10. Das in dieser Studie erniedrigte IL-6 ist allerdings nur bedingt aussagekräftig, da IL-6 auch von anderen immunologischen Zellen (z.B. T-Zellen) produziert wird, die nicht betrachtet wurden. Außerdem wird IL-6 von Osteoblasten und Muskelzellen gebildet und entspricht in etwa der Konzentration an Muskelmasse (Febbraio, Pedersen 2005). Das – wenn auch nicht signifikant - erhöht gemessene IL-10 dieser Arbeit passt zu den niedrigeren Messungen der proinflammatorischen Zytokine, so dass die Funktion des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 mit Hemmung der proinflammatorischen Immunantwort deutlich wird. Die Metaanalyse von Potvin et al. zeigte keine signifikanten Veränderungen des IL-10 (Potvin, Stip, Sepehry, Gendron, Bah, Kouassi 2008), Cazzullo et al beobachteten höhere Spiegel des IL-10 (Cazzullo, Scarone, Grassi et al. 1998). IL-10-Spiegel im Liquor stehen in Beziehung zur Schwere der schizophrenen Symptomatik (Muller, Schwarz 2007b). Insofern stimmen die Messungen des IL-10 mit der Literatur überein – immer mit dem Hintergrund der unvergleichbaren Methodik - so dass die Werte teilweise zur Th1-Th2-Shift- Hypothese passen. Die Ergebnisse zu den IL-6-Leveln müssen im Hinblick auf diese Hypothese sehr kritisch gesehen werden.

Das IL-1 β lag sowohl bei Raumtemperatur in-vitro als auch zu physiologischen Bedingungen (37°C) vor der Korrektur auf multiples Testen hoch signifikant und danach signifikant niedriger vor. Dieses Ergebnis ist konträr zu allen anderen in der Literatur beschriebenen, in denen IL-1 β entweder in erhöhten oder normalen Levels vorzufinden war (Schmitt et al. 2005; Drzyzga, Obuchowicz, Marciniowska, Herman 2006). Theodoropoulou et al. fanden sowohl signifikant erhöhtes IL-1 β als auch TNF α (Theodoropoulou, Spanakos, Baxevanis et al. 2001). Das TNF α zeigte in dieser Arbeit hingegen keine signifikanten Veränderungen. O'Brien et al. beobachtete erhöhte TNF α -Konzentrationen bei Patienten mit einem akuten psychotischen Schub, Schmitt et al hingegen keine TNF α -Veränderungen bei antipsychotisch behandelten Schizophrenen (Schmitt et al. 2005; O'Brien, Scully, Dinan 2008). Die Ungleichheiten der Studiendesigns stel-

len weiterhin ein Problem für die Interpretation der Ergebnisse dar. Insbesondere bleibt die Methodik nicht vergleichbar. Antipsychotika, verschiedene klinische Stadien der eingeschlossenen Patienten, weitere Einflussfaktoren wie Stress und Umweltfaktoren oder Messmethodik (Blut oder Liquor) variieren zu unserer Studie. Vor allem der Zusammenhang mit den gemessenen und konträr zu den Zytokinleveln erscheinenden Toll-like Rezeptoren muss diskutiert werden.

Toll-like Rezeptoren: TLR-2, TLR-3 und TLR-4

Sämtliche Toll-like Rezeptoren wurden auf den Monozyten der Schizophrenen vermehrt exprimiert. Die TLR-3 und TLR-4 sogar zu beiden Bedingungen (Raumtemperatur/ physiologische Temperatur) signifikant, auch nach der Korrektur für multiples Testen. Die Messung und Beurteilung von Toll-like Rezeptoren in Bezug auf Schizophrenie stellt eine neuartige Betrachtungsweise der immunologischen und klinischen Zusammenhänge dar. Im Hinblick auf die verminderte bzw. normale Zytokinausschüttung der Schizophrenen mit der beobachteten signifikant erhöhten Toll-like Rezeptor-Expression stellt sich die Frage, wieso die Rezeptoren der Signaltransduktion zwar quantitativ ausreichend vorhanden sind, effektiv aber nicht die Produktion von Zytokinen und damit die Immunreaktion der Schizophrenen bewirken, die zu erwarten wäre. Die Anzahl der Monozyten und der TLRs würde für eine adäquate Immunantwort auf mikrobielle Antigene ausreichen, unsere Ergebnisse widersprechen allerdings dieser Annahme. Es wird die Frage impliziert, warum die Immunantwort nicht ausreicht bzw. welche Kompensationsmechanismen aktiviert werden. Außerdem ist unklar, warum die Expression erhöht ist. Es gilt herauszufinden, an welcher Stelle der Signaltransduktion, ob auf Ebene der Effektorproteine, auf Ebene der Genexpression oder an anderer Stelle, die Kette der Weiterleitung gestört ist. Außerdem sollte die TLR-Expression, die in dieser Studie im peripheren Blut untersucht wurde, auch im ZNS betrachtet werden. TLR-3 und TLR-4 werden auf Astrozyten und Mikrogliazellen exprimiert (Krasowska-Zoladek, Banaszewska, Kraszpuski, Konat 2007). Da Mikroglia eingewanderte Monozyten/ Makrophagen darstellen, verfügen sie über deren Rezeptorausstattung. Mikroglia machen 12% aller ZNS-Zellen aus und stellen durch ihre unterschiedlichen Funktionen den größten Teil des zentralen Immunsystems dar (Block,

Zecca, Hong 2007; Bernstein, Steiner, Bogerts 2009). So kann eine Fehlfunktion der Immunantwort, hier im ZNS die Antwort der angeborenen, Auswirkungen auf die Neurotransmission haben.

Aktivierungsmarker HLA-DR

Der Monozyten-spezifische Aktivierungsmarker HLA-DR wurde auf den Monozyten der Schizophrenen vermehrt exprimiert, zu physiologischen Bedingungen (37°) signifikant ($p=0,045$). Nach der Korrektur für multiples Testen bestand der Unterschied allerdings nicht mehr. Diese Grunderhöhung des Aktivierungsmarkers auf der Monozytenoberfläche kann im Zusammenhang mit den Vorbefunden zu erhöhten Monozytenkonzentrationen und vermehrter –aktivierung bei Schizophrenen stehen (Widner, Laich, Sperner-Unterweger, Ledochowski, Fuchs 2002). Die quantitative Monozytenvermehrung könnte eine Kompensation der defizitären Funktion darstellen. Trotz der erhöhten monozytären Aktivierung, ausgedrückt durch die HLA-DR-Expression, produzieren die Monozyten keine größeren Mengen an Zytokinen. Die aktuellen Genomstudien zur Bedeutung des HLA für die Schizophrenieätiologie zeigen, dass die Betrachtung der HLA-Moleküle auf den Zellen des Organismus bedeutsamer im Verständnis von immunologischen Zusammenhängen werden könnte. Zwar sind Chromosomlokalisierungen und Oberflächenexpressionen auf Monozyten von HLA-DR bei weitem nicht vergleichbar. Es könnten sich allerdings neue Ansatzmöglichkeiten eröffnen, so wie in dieser Studie geschehen. Am häufigsten wurde HLA-DRB1 oder seine Allele in der Literatur beschrieben (Arinami et al. 1998; Akaho et al. 2000). In einer gepoolten Datenanalyse von japanischen Genotypen berichteten Sasaki et al. von signifikant erhöhten HLA-DRB1-Allel-Häufigkeiten bei fast 600 schizophrenen Patienten im Vergleich zu rund 900 gesunden Kontrollen (Akaho et al. 2000). Diverse andere japanische Studien fanden gleiche Tendenzen. Allerdings muss man die ethnischen Unterschiede der Studienpopulationen beachten, da unsere Studie mit Kaukasiern durchgeführt wurde. Eine schottische Studie zeigte ebenso erhöhte Frequenzen von HLA-DR1 (Blackwood, Muir, Stephenson et al. 1996), so dass diese und unsere Studie zeigen könnten, dass Ergebnisse aus anderen ethnischen Gruppen prinzipiell übertragbar sind.

4.2.2 Stimulation

Bakteriell (LPS-) stimulierte Zytokine: TNF α , IL-1 β , IL-6 und IL-10

Nach Stimulation zeigten sich die intrazellulären Zytokine weiterhin in geringeren Konzentrationen im Vergleich zu den Gesunden, TNF α ($p=0,060$) und IL-1 β ($p=0,053$) mit tendenziellen Signifikanzen ohne Korrektur für multiples Testen. LPS gilt als monozyten-spezifischer Stimulus, so dass sichergestellt werden konnte, dass die Zytokinsynthese gezielt angeregt wird. Die Stimulation diente der Verifizierung von den verschiedenen Infektionshypothesen, wobei einige davon prä- und perinatal einzuordnen sind. Außerdem sollte die Stimulierbarkeit der Monozyten, verdeutlicht durch die Berechnung der Zytokinausschüttungsveränderung nach Stimulation, gezeigt werden. Hierbei ließen sich die Monozyten zur Produktion von IL-1 β und IL-6 ($p=0,051$) stärker stimulieren. Die TNF α - und IL-10-Synthese hingegen war weiterhin niedriger und somit schlechter stimulierbar im Vergleich zu den Gesunden. In der Literatur werden selten Studiendesigns mit gezielten Stimulationen verwendet. Na et al maßen die Mitogen-induzierte Produktion von TNF α , IL-6, IL-4, INF- γ und IL-2 im Blut von nicht behandelten Schizophrenen, wobei die TNF α - und IL-6-Konzentrationen signifikant höher waren als in der Kontrollgruppe. Nach 6 Wochen antipsychotischer Behandlung waren beide Konzentrationen signifikant abgesenkt (Na, Kim 2007). Also zeigt sich auch nach Stimulation die Tendenz, dass die Zytokinproduktion der Schizophrenen weiterhin gestört bleibt. Die Stimulierbarkeit gerade des IL-6 kann dafür sprechen, dass die bisher in anderen Studien beobachteten erhöhten IL-6-Werte auch bei unseren Patienten möglich wären, aufgrund der unterschiedliche Methodik aber nicht detektierbar waren. Dies führt zu dem Schluss, dass die Monozyten trotz ihrer ausreichenden und vor allem erhöhten Menge im Vergleich zu den Gesunden, nicht in der Lage sind, ausreichend zu produzieren. Verschiedene Studien zeigten, dass Schizophrenie mit erhöhten Monozytenzahlen verglichen zu gesunden Kontrollen assoziiert ist (Dameshek 1930; Wilke, Arolt, Rothermundt, Weitzsch, Hornberg, Kirchner 1996; Muller, Riedel, Ackenheil, Schwarz 1999). Die Monozyten und ihre Funktionalität rücken somit in den Fokus der Betrachtung. 2008 fanden Padmos et al inflammatorische Genexpressionsmuster in Monozyten von bipolaren Patienten und deren Nachkommen (Padmos, Hillegers, Knijff et al. 2008). Drexhage et al be-

schrieben 2010 einen genetischen monozytären „Fingerabdruck“ bei Schizophrenie, bei dem die Expressionen inflammatorischer und chemotaktischer, monozytärer Gene erhöht waren (Drexhage, Knijff, Padmos et al. 2010). Auf Ebene der systemischen peripheren Immunantwort konnte bei nicht medikamentös behandelten, erstmalig psychotischen Patienten unter Stressaussetzung eine verminderte Aktivität und Anzahl natürlicher Killerzellen (NK) beobachtet werden (van Venrooij, Fluitman, Lijmer et al. 2010). Eine andere Studie zeigte die Verringerung beider Komponenten der angeborenen Immunität bei nicht medikamentös behandelten Schizophrenen: die Aktivität der monozytären Phagozytose und der NK-Zellen (Koliaskina, Sekirina, Androsova et al. 2007). Insgesamt wird also deutlich, dass die von uns beobachteten funktionellen Defizite des Monozyten bei Schizophrenie keine Ausnahme darstellen.

Ebenso gilt es zu erfassen, wie die Theorien der maternalen bakteriellen Infektionen und ihr Einfluss auf den Fetus, im Zusammenhang mit den Immunabwehrreaktionen der erwachsenen Schizophrenen stehen. Die von Ashdown et al. beobachteten Anstiege von TNF α , IL-1 und IL-6 im mütterlichen Plasma und in der Plazenta nach pränataler LPS-Stimulation (Tiermodell) standen im Gegensatz zu dem lediglich fetalen Anstieg von IL-1 in seinem Plasma (Ashdown, Dumont, Ng, Poole, Boksa, Luheshi 2006). Könnte es sein, dass diese sehr frühe, embryonale Immunreaktion die Monozyten des jeweiligen Menschen so sehr stimuliert und damit unanfälliger für weitere Stimuli macht, dass die Zytokinproduktion während der Schizophrenie herabgesetzt bleibt? Oder könnte es sein, dass die Patienten einer dauerhaften Immunstimulation unterliegen aufgrund von einer Rezeptorhochregulation und –sensitivität, die in dieser frühen Entwicklungsstufe begünstigt wurde? Des Weiteren wäre es möglich, dass die Schizophrenen insgesamt anfälliger für Infektionen und Entzündungen sind, da sie durch die frühe Neuroentwicklungsstörung erleichterte Eintrittspforten (z.B. durch Störung der Blut-Hirn-Schranke) oder stärkere Krankheitsverläufe haben. Die möglichen häufigeren Infektionen könnten das Immunsystem stärker und öfter beanspruchen, weswegen die Monozyten vielleicht bei Bedarf keine weitere Steigerung der Immunantwort (in Form von Zytokinproduktion) mehr schaffen. Diese inadäquate Immunreaktion würde somit auf einer Erschöpfungsreaktion beruhen.

Das TNF α spielt aufgrund der Ergebnisse in unserer Studie eine eher untergeordnete Rolle. In der linearen Regressionsanalyse stellte das TNF α allerdings einen Prädiktor, also einen Vorhersagewert ($p=0,0110$) für Unterschiede zwischen Gesunden und Schizophrenen dar, was die Korrektur für multiples Testen bestätigte. Die Messung des intrazellulären TNF α nach LPS-Stimulation kann die gestörte Reaktion der Monozyten auf bakterielle Infektionen zeigen. Die erhöhte Prävalenz des intrazellulären Bakteriums Chlamydia bei Schizophrenen (Fellerhoff, Laumbacher, Mueller, Gu, Wank 2007) und die in dieser Studie gezeigte verringerte Stimulierbarkeit der Monozyten weisen auf eine mangelnde Fähigkeit der Monozyten hin, auf eine bakterielle Infektion mit Produktionsanstieg des TNF α zu reagieren. Dies könnte teilweise die erhöhte Infektionsanfälligkeit der Schizophrenen erklären. Es ist bekannt, dass Antipsychotika immunmodulatorisch wirken und auch TNF α -Konzentrationen reduzieren können (Kowalski, Blada, Kucia, Madej, Herman 2001; Kowalski, Labuzek, Herman 2003). Die evtl. vor Jahren eingenommenen Neuroleptika der Patienten dieser Studie könnten das Immunsystem mit der TNF α -Produktion möglicherweise längerfristig beeinflusst haben.

Bakteriell stimuliertes extrazelluläres Zytokin IL-1 β

Das extrazelluläre Zytokin IL-1 β war sowohl vor der Korrektur für multiples Testen ($p=0,004$) als auch danach signifikant reduziert. Dies steht im Gegensatz zu den meisten anderen in der Literatur beschriebenen Daten (siehe 4.2.1). Barak et al. zeigten ebenfalls verringerte IL-1 β -Konzentrationen, allerdings im Liquor und ohne Stimulation (Barak, Barak, Levine, Nisman, Roisman 1995). Im Hinblick auf die intrazelluläre IL-1 β -Produktion passt die extrazellulär gemessene mit dieser zusammen – auch nach Stimulation.

Bakteriell (LPS-) stimulierte Toll-like Rezeptoren: TLR-2, TLR-3 und TLR-4

Die TLRs blieben nach Stimulation vermehrt exprimiert. Jedoch zeigten sich in der Stimulierbarkeit für TLR-3 ($p=0,021$) und TLR-4 ($p=0,004$) signifikant niedrigere Rezeptorexpressionen im Vergleich zu den Gesunden. Nach der Korrektur für multiples Testen bestand kein signifikanter Unterschied mehr für den TLR-3, der TLR-4 hingegen behielt seine statistische Signifikanz bezüglich der Expres-

sion. Obwohl die Rezeptoren vermehrt (siehe 4.2.1) vorlagen, ließen sie sich nicht zu einer Hochregulierung der Rezeptoranzahl anregen. Die verminderte Stimulierbarkeit passt zu den von uns gemessenen niedrigeren Zytokinwerten. Die Aktivierung des TLR-3 und TLR-4 ist somit gestört, die erhöhte Ausgangsexpression im Ruhezustand der TLRs spiegelt wahrscheinlich eine verminderte Funktion wider und weist auf ein funktionelles Defizit der über diese Rezeptorgruppe vermittelten Aktivierungsfunktion hin. Die Toll-like Rezeptoren aktivieren über die Monozyten, Bestandteil der angeborenen Immunität, die erworbene Immunantwort und stellen somit ein mögliches Ausgangsproblem für immunologische Störungen bei Schizophrenie dar. Es stellt sich die Frage, ob aufgrund der oben beschriebenen Erschöpfungsreaktion die Stimulierbarkeit herabgesetzt ist oder ob die monozytäre Aktivierung über TLR-3 und TLR-4 per se nicht möglich ist.

Bakteriell (LPS-) stimulierter Aktivierungsmarker HLA-DR

Nach Stimulation wurde HLA-DR weiterhin vermehrt exprimiert, im Vergleich zum unstimulierten Ansatz zeigte sich allerdings, dass die Expression von HLA-DR durch die Stimulation nicht weiter heraufreguliert werden konnte und unter der Steigerung der Gesunden lag. Insgesamt ist unklar, wie die erhöhte Frequenz von HLA-DR mit Schizophrenie zusammenhängt. Der Einfluss von pränatalen Infektionen wurde von Narita et al. postuliert, nachdem sie signifikant erhöhte Inzidenzen von Geburten im Februar und März bei schizophrenen Patienten mit HLA-DR1 fanden (Narita, Sasaki, Akaho et al. 2000). Vor dem Hintergrund der Aktivierungsfunktion des Immunsystems des HLA-DR könnte es sein, dass HLA und pränatale Infektionen mit Schizophrenie assoziiert sein könnten. Die geringere Fähigkeit der Schizophrenen, die HLA-DR-Expression bei Konfrontation mit einem infektiösen Pathogen zu steigern, könnte ein weiteres Mal die gestörte Immunantwort bei Schizophrenie demonstrieren. Außerdem passt dieses Ergebnis zu den verringerten Zytokinwerten.

Viral (PolyI:C-) stimulierte intrazelluläre Zytokine: TNF α , IL-1 β , IL-6 und IL-10

Die viral stimulierten Zytokine zeigten keine signifikanten Auffälligkeiten, außer, dass sie ebenfalls in niedrigeren Konzentrationen vorlagen als die der Gesunden. Nach unserem Wissen sind weitere Studien zu viral stimulierten Monozyten bei Schizophrenen nicht vorhanden. Da keine signifikanten Effekte beobachtet wurden, könnte eine virale Beeinflussung in der Pathogenese bei erwachsenen Schizophrenen eher eine untergeordnete Rolle spielen.

Viral (PolyI:C)-stimuliertes extrazelluläres Zytokin IL-1 β

Das im Serum gemessene viral stimulierte IL-1 β war niedriger im Vergleich zu den Gesunden. Es entspricht somit in der Tendenz den Ergebnissen aus den unstimulierten und bakteriell stimulierten Messungen.

Viral (PolyI:C-) stimulierte Toll-like Rezeptoren: TLR-2, TLR-3 und TLR-4

Die Toll-like Rezeptoren wurden nach viraler Stimulation weiterhin erhöht exprimiert. TLR-3 ($p=0,031$) der Schizophrenen war signifikant in seiner Anzahl im Vergleich zu den Gesunden erhöht, die TLR-4-Expression zeigte einen Trend zur Signifikanz ($p=0,061$). Beide Expressionsunterschiede bestanden nach der Korrektur für multiples Testen nicht weiter fort. Die Stimulierbarkeit blieb allerdings beim TLR-4 signifikant herabgesetzt (auch nach Korrektur für multiples Testen), ebenso wie es nach der bakteriellen Stimulation zu beobachten war. Da der TLR-3 vor allem durch virale Antigene stimuliert wird (Blach-Olszewska 2005), ist die verminderte Stimulierbarkeit bemerkenswert trotz ihrer nicht vorhandenen Signifikanz. Es könnte möglich sein, dass die Schizophrenen wegen häufigeren früher durchgemachten viralen Infektionen weniger anfällig für die Rezeptorerkennung und -bindung sind.

Es ist sehr interessant, dass sowohl TLR-3 als Rezeptor für virale Pathogene als auch TLR-4 als Rezeptor für bakterielle Pathogene nach beiden Stimulationen reagierten - unabhängig vom spezifischen Aktivator. Co-stimulative Effekte durch einen potenten Aktivator auf verschiedene TLRs (Roelofs, Joosten, bdollahi-Roodsaz et al. 2005) sind genauso beschrieben worden wie co-inhibierende Effekte (Zhu, Kodvawala, Hui 2010). Die Signalübertragung von

TLR-3 und TLR-4 verläuft über den gemeinsamen TRIF-abhängigen Weg. TRIF steht für toll/IL-1 receptor-containing adaptor inducing Interferon (IFN) β (Buchanan, Hutchinson, Watkins, Yin 2010). Der gemeinsame Aktivierungsweg der TLRs könnte also eine Rolle bei der Co-Aktivierung spielen. In dieser Studie waren die intrazellulären Zytokinkonzentrationen, auch das IL-1 β , bei den Schizophrenen herabgesetzt, was im Zusammenhang mit der IFN- β -Synthese nach TLR-Aktivierung stehen könnte. IFN- β reguliert die zelluläre Entzündungsantwort und wirkt dabei antiinflammatorisch sowie kontrollierend auf das angeborene Immunsystem (Buchanan, Hutchinson, Watkins, Yin 2010). Vor dem Hintergrund der besonderen Relevanz und den weiterhin noch unbekanntem Funktionen der Toll-like Rezeptoren im Allgemeinen wäre es sinnvoll, die Ergebnisse anhand genauerer molekularer und chemischer Fragestellungen zu betrachten.

Viral (PolyI:C-) stimulierter Aktivierungsmarker HLA-DR

In dieser Studie konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass die Heraufregulierung von HLA-DR auf Monozyten von Schizophrenen nach viraler Stimulation signifikant ($p=0,038$) verringert und somit defizitär ist. Da die Schizophrenen im unstimulierten Zustand bereits hohe HLA-DR-Werte aufwiesen, könnte es möglich sein, dass die Monozyten der Schizophrenen ihr Potential auf infektiöse Stimuli adäquat zu reagieren, ausgeschöpft und dadurch die Grenze erreicht haben. Als Konsequenz würde die Fähigkeit sinken, sich gegen Infektionen zu schützen und die Infektionsrate der Schizophrenen würde steigen, was in diversen Studien nachgewiesen wurde. Mit diesem Ergebnis könnte ein weiteres Mal die Hypothese der gestörten und inadäquaten (monozytären) Immunantwort bei Schizophrenie untermauert werden. Es bleibt unklar, ob das erhöhte Aktivierungslevel des HLA-DR (verdeutlicht durch die erhöhten Konzentrationen) aufgrund einer chronischen Infektion oder insgesamt wegen einer allgemeinen immunologischen Störung besteht. Dieses erstmalig erhobene, interessante Ergebnis ohne Korrektur für multiples Testen kann die Möglichkeiten verdeutlichen, die eine explorative Studie bietet. Nach Kontrolle der Irrtumswahrscheinlichkeit konnte der signifikante Unterschied nicht beobachtet werden, das Ergebnis kann allerdings Anlass geben, trotzdem den HLA-DR-Rezeptor bei Schizophrenie umfassender zu betrachten.

4.2.3 Korrelationsanalyse der Schizophrenen: klinische Parameter und signifikante Messwerte

Es bestanden sowohl positive als auch negative signifikante Zusammenhänge zwischen dem Alter der Schizophrenen, Erkrankungsbeginn und Erkrankungsdauer und den signifikanten Messwerten. Korrelationen zwischen dem klinischen Schweregrad der Erkrankung (PANSS) und den signifikanten Messwerten gab es keine. Alter, Erkrankungsbeginn und -dauer können als zusammenhängende Parameter verstanden werden, schließlich definiert das Alter den Erkrankungsbeginn und damit auch die Dauer. Die Betrachtung der somit zeitlichen Zusammenhänge der Messwerte leitet zu der These, dass die immunologischen Vorgänge zu einem bestimmten Zeitpunkt während der Erkrankung erstmalig und verstärkt auftreten könnten. Bei den negativen Korrelationen bedeutet dies: Je jünger die Patienten waren, je früher also der Erkrankungsbeginn stattfand, desto höher lagen die Messwerte. Dieser frühe Zeitpunkt könnte zeigen, dass die immunologischen Mechanismen grundlegend an der Erkrankung teilhaben und so die Entstehung und das Ausbrechen der Erkrankung maßgeblich beeinflussen.

Das intrazellulär gemessene Zytokin TNF α nach LPS-Stimulation und das intrazelluläre IL-1 β im unstimulierten und LPS-stimulierten Zustand zeigten einen positiven Zusammenhang zum Alter. In der Literatur beschriebene Daten zu solchen Korrelationsanalysen gibt es wenige. Es wurde eine positive Korrelation zwischen IL-2-Produktion im Serum bei nie medikamentös behandelten schizophrenen Patienten und deren Erkrankungsbeginn gefunden (Ganguli R 1995). Für den TNF α -Polymorphismus wurde im Zusammenhang mit dessen Genexpression und Zytokinen eine Beteiligung am Zeitpunkt des Erkrankungsbeginns postuliert (Kampman, Anttila, Illi et al. 2005). Diese beschriebenen positiven Zusammenhänge zwischen Zytokinen und Erkrankungsbeginn der Schizophrenie passen tendenziell zur positiven Korrelation unserer Studie zwischen Erkrankungsbeginn und LPS-stimulierten IL-1 β ($r=0,391$, $p=0,030$). Das IL-6 ($r=0,369$, $p=0,041$) könnte wegen seines Zusammenhanges zur Erkrankungsdauer wieder an Bedeutung erlangen. Allerdings ist zu bedenken, dass IL-6 mit dem Alter nicht korrelierte, so dass dieses Ergebnis kritisch gesehen werden muss. Die beiden intrazellulären, pro-inflammatorisch wirkenden Zytokine TNF α

und IL-1 β korrelierten nach LPS-Stimulation positiv mit dem Alter der schizophrenen Patienten. Sie waren also bei den jüngeren Patienten erniedrigt. Es könnte bekräftigen, dass die adäquate Immunantwort auf Pathogene nicht ausreichend möglich ist, zumal eine positive Korrelation im Umkehrschluss bedeutet, dass die älteren Patienten höhere TNF α und IL-1 β Konzentrationen nach LPS-Stimulation aufwiesen. Sie könnten sich also einerseits in ihrer Immunantwort im Laufe der Erkrankung und Zeit verbessert bzw. an die Zustände der Gesunden angepasst haben, andererseits könnte eine überstimulierte Immunantwort resultieren.

Die unstimulierten extrazellulären Toll-like Rezeptoren 3 und 4 sowie das HLA-DR und der TLR-4 nach PolyI:C-Stimulation korrelierten negativ mit dem Alter und dem Erkrankungsbeginn. Für die Toll-like Rezeptoren und den extrazellulären Aktivierungsmarker HLA-DR der Monozyten wurden bisher keine Korrelationen zu klinischen Parametern beschrieben. In dieser Studie zeigte sich: Je jünger die Patienten waren, desto mehr wurden TLR-3 und TLR-4 sowie HLA-DR exprimiert. Je eher die Erkrankung ausbrach, desto höher lagen ebenso die Rezeptorwerte. Für die Stimulierbarkeit nach LPS-Zugabe des TLR-4 fand sich dagegen eine positive Korrelation, d.h. je eher der Erkrankungsbeginn stattfand, desto niedriger war auch die Stimulierbarkeit. Der Stimulationsdefekt zu einem solchen frühen Zeitpunkt der Erkrankung könnte die These untermauern, dass die immunologischen Störungen frühzeitig und damit grundlegend für die weitere Beeinflussung der Krankheit und des Immunsystems ablaufen. Vor dem Hintergrund der fehlenden Korrelationen der Erkrankungsschwere und den Messwerten gewinnt der TLR-4 weiterhin an Bedeutung. Er ist dadurch zwar mit der Diagnose verknüpft, da Alter und Erkrankungsbeginn mit ihm korrelieren, er ist allerdings unabhängig vom Zustand des Patienten (im klinischen Sinne). In Anbetracht der angenommenen immunologischen Rolle des TLR-4 bei der Schizophrenie und den dargestellten Ergebnissen und Zusammenhängen könnte dies den Vorschlag bestätigen, den TLR-4 genauer und umfassender zu betrachten.

Insgesamt kann also der Zeitpunkt einer möglichen Infektion oder die Dauer einer leichten, chronischen Entzündung Einfluss auf die Anfälligkeit für die Entwicklung einer Schizophrenie nehmen – unabhängig vom Schweregrad der Er-

krankung. Die gefundenen Korrelationen könnten außerdem Subtypen der Schizophrenie mit spezifischen immunologischen Vorgängen kennzeichnen.

4.2.4 Korrelationsanalyse der Gesunden: Alter und signifikante Messwerte

Das Alter der Gesunden korrelierte positiv nur mit dem LPS-stimulierten IL-1 β im Serum. Vor dem Hintergrund der kritisch zu betrachtenden ELISA-Messung (siehe 4.1) hat diese Korrelation wenig Bedeutung. Da keine weiteren Zusammenhänge zwischen dem Alter der Gesunden und den restlichen signifikanten Messwerten bestanden, wird die These über die Rolle des Einflussfaktors Zeit bei der Schizophrenie gefestigt.

4.3 Zusammenfassende Interpretation und Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit in Bezug auf Zytokinsekretion und Toll-like Rezeptorexpression sind neuartig und stellen eine Herausforderung an die Interpretation der Daten im Zusammenhang mit der Pathophysiologie der Schizophrenie dar. Vor allem die Methodik der direkten Monozytenbetrachtung ist einmalig in der Literatur und dadurch sehr schwer vergleichbar. Die Monozyten und ihre Produkte und Rezeptoren stellen nur einen kleinen, singulären Teil des komplexen Immunsystems dar. Die intrazellulär gemessenen Zytokine der Monozyten gehören zu sämtlichen restlichen extrazellulären, von anderen immunologischen Zellpopulationen gebildeten Zytokine. Die Menge an extrazellulären Zytokinen hängt mit der Anzahl der immunkompetenten Zellen und deren Produktionsfähigkeit zusammen. Es gibt Hinweise, dass die Monozyten bei Schizophrenen im Vergleich zu Gesunden erhöht sind (Bonartsev 1973). Man sollte somit bedenken, dass trotz gestörter intrazellulärer Zytokinproduktion, die extrazellulären Zytokinlevel gemäß der Studien erhöht sein könnten - durch quantitative Erhöhung der anderen oder aller Zytokinproduzierender Zellen.

Es gilt in nachfolgenden Studien die Daten evtl. mit größeren, repräsentativeren Kollektiven zu replizieren und sie damit gültiger und verlässlicher zu machen. Aufgrund des explorativen Studiendesigns dieser Arbeit sind sämtliche Signifikanzen kritisch zu sehen, zumal initial auf eine Korrektur für multiples Testen

verzichtet wurde. Die zahlreichen, durch die Kontrolle der Irrtumswahrscheinlichkeit bestätigten, signifikanten Ergebnisse belegen die Relevanz der gewonnenen Daten. Die Diskussion und Interpretation der (tendenziell) signifikanten Unterschiede ohne Korrektur für multiples Testen können in der Zusammenschau eine ähnlich hohe Bedeutung wie die statistischen Signifikanzen nach Korrektur erlangen. Denn diese „Signifikanzen“ ohne Kontrolle der Irrtumswahrscheinlichkeit könnten dann Motivation und Anlass geben, nachfolgende konfirmatorische Studien zu planen. Die erneute Betrachtung bestimmter immunkompetenter Zellen sollte die wichtige Rolle des Transkriptionsfaktors Nuclear factor (NF)- κ B beachten. Die Aktivierung von NF- κ B spielt laut Song et al eine besondere Bedeutung bei Schizophrenie, da die Regulation der Zytokinproduktion während einer proinflammatorischen Reaktion von ihm abhängt (Song, Lv, Li, Hao, Zhao 2009).

Die Ergebnisse könnten allerdings auch neue, diagnostische und therapeutische Möglichkeiten zulassen. Geht man von den zusammenhängenden Faktoren Entzündung, Immun(un-)gleichgewicht und Schizophrenie aus, müssen die Entzündungsmediatoren Prostaglandin E2 (PGE2) und Cyclooxygenase (COX)-2 berücksichtigt werden. Die COX-2 wird in für die Schizophrenie bedeutenden Zentren (z.B. Hippocampus) exprimiert und steigt bei Entzündungen im ZNS stark an. Eine Hemmung von COX-2 führt zu einer Hemmung von PGE2, das wiederum Typ-2-Zytokine in ihrer Produktion stimuliert (Muller, Schwarz 2007b). Müller et al. zeigten 2002, dass die additive Gabe des Cyclooxygenase-(COX)-2-Hemmers Celecoxib zu Risperidon bei akut schizophrenen Patienten therapeutische Effekte durch die antiinflammatorischen Therapie aufwies (Muller, Riedel, Scheppach et al. 2002). Insbesondere die Kognition der Patienten wurde verbessert (Muller, Riedel, Schwarz, Engel 2005). In Bezug auf unsere Studie würde diese Therapie nicht sinnvoll sein, da die Immunantwort der Schizophrenen eher herabgesetzt war. Die Ergebnisse der Toll-like Rezeptoren könnten allerdings den TLR-4 zu einem Betrachtungs- und Angriffspunkt in der Diagnostik und Therapie der Schizophrenie machen. Die Kombination aus erhöhter Expression und verminderter Stimulierbarkeit könnte einen diagnostischen Marker darstellen. Die verminderte Stimulierbarkeit von TLR-4 bei Schizophrenie, was als funktionelles Defizit der Monozyten und TLRs gewertet werden kann,

könnte neue therapeutische Optionen eröffnen. Eine gezielte Monozytenstimulierung könnte die Typ-1-spezifischen Zytokine verstärkt generieren, so dass der Th1-Th2-Shift verringert und die Immunantwort verstärkt werden könnten.

Die Entdeckung einer neuen T-Helferzell-Effektorreihe, der so genannten Th17-Zellen, eröffnet neue und viel versprechende Möglichkeiten das Immunsystem in Bezug auf Infektionsabwehr (Bakterien, Pilze), Autoimmunerkrankungen, Tumore und evtl. psychiatrische Erkrankungen differenzierter zu betrachten. Die bisherige Vorstellung über die T-Helferzellen mit den beiden Aufteilungen in die Th1- und Th2- Immunantwort wird erschüttert. Die Aktivierung und Differenzierung der Th-17-Zellen erfolgt u.a. durch IL-1 β , maßgeblich aber durch IL-6 und TNF β (Dong 2008). In dieser Studie wurden somit Zytokine untersucht, die mehr denn je Gegenstand hochaktueller wissenschaftlicher Forschungen sind. Somit wäre es sinnvoll, die Th17-Zellen mit ihren Stimulatoren in nachfolgenden immunologischen Schizophreniestudien zu betrachten. Die gezielte und diffizile Untersuchung könnte neue und konkretere Erkenntnisse erbringen.

Einflussfaktoren wie Stress, Rauchen, Infektionen und weitere Umweltfaktoren müssten stärker betrachtet werden. Die von Ni et al. eingesetzten Toll-like-Rezeptor-Stimulanzen LPS und PolyI:C erbrachten schließlich eine inflammatorische Stimulation von Mikrogliazellen in Rattenembryonen zur Produktion von Faktoren, die eine cholinerge Differenzierung anregen (Ni, Acevedo, Muralidharan, Padala, To, Jonakait 2007). In unserer Studie gaben 58% der Schizophrenen aktuellen Nikotinkonsum an (Gesunde 19%), 26% von ihnen rauchten regelmäßig (Gesunde 13%), was einen signifikanten Unterschied ($p=0,000$) darstellte. Es hat sich gezeigt, dass Zigarettenrauchen mit dem Immunsystem assoziiert ist und vor allem auf pro-inflammatorische Zytokine supprimierend wirkt (Phaybouth, Wang, Hutt, McDonald, Harrod, Barrett 2006). Vor diesem Hintergrund könnten die erniedrigten Zytokinwerte der in dieser Studie eingeschlossenen schizophrenen Patienten im Zusammenhang mit dem verstärkten Nikotinkonsum stehen. Das Rauchen könnte die Konzentrationen mehr beeinflusst haben als angenommen. Dies und andere Einflussfaktoren sollten in nachfolgenden, randomisierten Studien erneut verifiziert werden.

Es bleibt die Herausforderung, die Relevanz der peripheren Immunantwort für das immunologische Milieu im ZNS zu beurteilen. Die Psychoneuroimmunologie hat weiterhin große Aufgaben vor sich.

5 Zusammenfassung

Die Ätiologie der Schizophrenie ist weiterhin unklar. Es häufen sich Hinweise, dass ein gestörtes Immunsystem zusammen mit prä- oder perinatalen Infektionen und weiteren Umweltfaktoren das Erkrankungsrisiko für Schizophrenie steigern. Aus Vorbefunden ist bekannt, dass die Monozytenanzahl bei Schizophrenie erhöht ist, so dass in dieser Studie die Rolle des Immunsystems mit Schwerpunkt auf den Monozyten betrachtet wurde. Dazu wurden in dieser explorativen Fall-Kontroll-Studie 31 nicht medikamentös behandelte schizophrene Patienten und 31 geschlechts- und altersangepasste gesunden Kontrollen eingeschlossen. Vergleichend wurden bei ihnen mittels Durchflusszytometrie und monoklonaler Antikörper die als Entzündungsmediatoren wirkenden Zytokine TNF α , IL-1 β , IL-6 und IL-10 der Monozyten, die Toll-like Rezeptoren 2, 3 und 4 sowie der Monozyten-spezifische Aktivierungsmarker HLA-DR auf der Monozytenoberfläche gemessen. IL-1 β wurde zusätzlich durch ELISA im Serum quantifiziert. Um den Einfluss von Infektionen zu testen, wurde Vollblut gezielt bakteriell mit Lipopolysaccharid (LPS) und viral mit PolyI:C in-vitro stimuliert und zu physiologischen Bedingungen (37°C) im Brutschrank inkubiert. Bei der Auswertung wurden sowohl die unstimulierten und stimulierten Konzentrationen der Immunparameter betrachtet, als auch die Fähigkeit der Monozyten ihre Zytokinproduktion und Rezeptorexpression stimulationsangepasst zu verändern (Stimulierbarkeit). Durch eine Korrelationsanalyse sollten Zusammenhänge zwischen klinischen Parametern wie Erkrankungsschwere (PANSS) oder Alter bzw. Erkrankungsbeginn sowie Erkrankungsdauer und den signifikanten Messwerten beurteilt werden.

Dabei zeigten sich niedrigere Zytokinkonzentrationen im unstimulierten und stimulierten Zustand bei den Schizophrenen im Vergleich zu den gesunden Kontrollen, allerdings höhere Toll-like Rezeptor- und HLA-DR- Expressionen ebenfalls im unstimulierten und stimulierten Zustand. Die Stimulierbarkeit der TLR-3 ($p=0,021$ ohne Korrektur für multiples Testen) und TLR-4 ($p=0,004$, $p=0,027^*$ nach Korrektur für multiples Testen) der Schizophrenen verglichen zu den gesunden Kontrollen war nach LPS-Stimulation signifikant herabgesetzt, ebenso die Stimulierbarkeit des TLR-4 ($p=0,001$, $p=0,019^*$) nach PolyI:C- Zugabe. Die

gleichen Beobachtungen konnten für die Stimulierbarkeit des HLA-DR gemacht werden. Die Synthese von IL-1 β und IL-6 ($p=0,051$) der Schizophrenen konnte durch die bakterielle Stimulation stärker angeregt werden als die der Gesunden. Die hauptsächlich negativen Korrelationen zwischen den Oberflächenrezeptoren (TLRs, HLA-DR) und die positiven Korrelationen von TNF α und IL-1 β mit dem Alter bzw. dem Erkrankungsbeginn zeigten, dass der Faktor Zeit bei der Ätiopathogenese der Schizophrenie eine Rolle spielen kann.

Die Ergebnisse dieser Studie unterstützen die Annahme, dass bei der Schizophrenie eine gestörte Immunantwort pathophysiologisch beteiligt ist. Es ist möglich, dass schizophrene Patienten Defizite im monozytären System aufweisen und dadurch nur inadäquat auf infektiöse Stimuli reagieren können. Die somit erhöhte Anfälligkeit für Infektionen könnte zusammen mit weiteren Einflüssen und Umweltfaktoren wie Stress oder Rauchen die Erkrankung triggern.

6 Literaturverzeichnis

1. Akaho R, Matsushita I, Narita K et al. Support for an association between HLA-DR1 and schizophrenia in the Japanese population. *Am J Med Genet* 2000;96:725-27.
2. Akira S. Mammalian Toll-like receptors. *Curr Opin Immunol* 2003;15:5-11 212.
3. Andreasen NC. Symptoms, signs, and diagnosis of schizophrenia. *Lancet* 1995;346:477-81.
4. Andreasen NC, Carpenter WT, Jr. Diagnosis and classification of schizophrenia. *Schizophr Bull* 1993;19:199-214.
5. Angst J. Historical aspects of the dichotomy between manic-depressive disorders and schizophrenia. *Schizophr Res* 2002;57:5-13.
6. Arinami T, Otsuka Y, Hamaguchi H et al. Evidence supporting an association between the DRB1 gene and schizophrenia in Japanese. *Schizophr Res* 1998;32:81-86.
7. Ashdown H, Dumont Y, Ng M, Poole S, Boksa P, Luheshi GN. The role of cytokines in mediating effects of prenatal infection on the fetus: implications for schizophrenia. *Mol Psychiatry* 2006;11:47-55.
8. Ban TA. Neuropsychopharmacology and the genetics of schizophrenia: a history of the diagnosis of schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2004;28:753-62.
9. Barak V, Barak Y, Levine J, Nisman B, Roisman I. Changes in interleukin-1 beta and soluble interleukin-2 receptor levels in CSF and serum of schizophrenic patients. *J Basic Clin Physiol Pharmacol* 1995;6:61-69.
10. Bassett AS, Chow EW. 22q11 deletion syndrome: a genetic subtype of schizophrenia. *Biol Psychiatry* 1999;46:882-91.
11. Bernstein HG, Steiner J, Bogerts B. Glial cells in schizophrenia: pathophysiological significance and possible consequences for therapy. *Expert Rev Neurother* 2009;9:1059-71.
12. bi-Dargham A. Alterations of serotonin transmission in schizophrenia. *Int Rev Neurobiol* 2007;78:133-64.
13. Blach-Olszewska Z. Innate immunity: cells, receptors, and signaling pathways. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2005;53:245-53.
14. Blackwood DH, Muir WJ, Stephenson A et al. Reduced expression of HLA-B35 in schizophrenia. *Psychiatr Genet* 1996;6:51-59.

15. Block ML, Zecca L, Hong JS. Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms. *Nat Rev Neurosci* 2007;8:57-69.
16. Bogerts B. *Psychiatrie und Psychotherapie*, 3. Auflage ed. Springer Medizin Verlag Heidelberg: Möller, H.-J.; Laux, G.; Kapfhammer, H.-P. (Hrsg.).
17. Bogerts, B. Psychiatrie und Psychotherapie. Band 1, Allgemeine Psychiatrie. 2008b. Springer Medizin Verlag Heidelberg, Möller,H.-J.,Laux,G.,Kapfhammer,H.-P.(Hrsg.).
18. Bonartsev PD. [An electron microscopic study of the process of peripheral blood lymphocyte blast transformation in vitro in schizophrenia]. *Zh Nevropatol Psikhiatr Im S S Korsakova* 1973;73:878-85.
19. Boteva K, Lieberman J. Reconsidering the classification of schizophrenia and manic depressive illness--a critical analysis and new conceptual model. *World J Biol Psychiatry* 2003;4:81-92.
20. Brown AS. The risk for schizophrenia from childhood and adult infections. *Am J Psychiatry* 2008;165:7-10.
21. Brown AS, Schaefer CA, Quesenberry CP, Jr., Liu L, Babulas VP, Susser ES. Maternal exposure to toxoplasmosis and risk of schizophrenia in adult offspring. *Am J Psychiatry* 2005;162:767-73.
22. Buchanan MM, Hutchinson M, Watkins LR, Yin H. Toll-like receptor 4 in CNS pathologies. *J Neurochem* 2010;114:13-27.
23. Carlsson A. The neurochemical circuitry of schizophrenia. *Pharmacopsychiatry* 2006c;39 Suppl 1:S10-S14.
24. Carlsson A. The neurochemical circuitry of schizophrenia. *Pharmacopsychiatry* 2006a;39 Suppl 1:S10-S14.
25. Carlsson A. The neurochemical circuitry of schizophrenia. *Pharmacopsychiatry* 2006b;39 Suppl 1:S10-S14.
26. Carlsson A. The neurochemical circuitry of schizophrenia. *Pharmacopsychiatry* 2006d;39 Suppl 1:S10-S14.
27. Carpenter WT, Jr. Clinical constructs and therapeutic discovery. *Schizophr Res* 2004;72:69-73.
28. Carruthers VB, Suzuki Y. Effects of *Toxoplasma gondii* infection on the brain. *Schizophr Bull* 2007;33:745-51.

29. Cazzullo CL, Scarone S, Grassi B et al. Cytokines production in chronic schizophrenia patients with or without paranoid behaviour. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 1998;22:947-57.
30. Chen S, Velardez MO, Warot X et al. Neuregulin 1-erbB signaling is necessary for normal myelination and sensory function. *J Neurosci* 2006;26:3079-86.
31. Citrome L. Adjunctive lithium and anticonvulsants for the treatment of schizophrenia: what is the evidence? *Expert Rev Neurother* 2009;9:55-71.
32. Coelho FM, Reis HJ, Nicolato R et al. Increased serum levels of inflammatory markers in chronic institutionalized patients with schizophrenia. *Neuroimmunomodulation* 2008;15:140-144.
33. Corfas G, Roy K, Buxbaum JD. Neuregulin 1-erbB signaling and the molecular/cellular basis of schizophrenia. *Nat Neurosci* 2004;7:575-80.
34. Crow TJ. Positive and negative schizophrenia symptoms and the role of dopamine. *Br J Psychiatry* 1981;139:251-54.
35. Dale DC, Boxer L, Liles WC. The phagocytes: neutrophils and monocytes. *Blood* 2008;112:935-45.
36. Dalman C, Allebeck P, Gunnell D et al. Infections in the CNS during childhood and the risk of subsequent psychotic illness: a cohort study of more than one million Swedish subjects. *Am J Psychiatry* 2008;165:59-65.
37. Dameshek W. White blood cells in dementia praecox and dementia paralytica. *Arch Neurol Psychiatry* 1930;24:855.
38. Davies G, Welham J, Chant D, Torrey EF, McGrath J. A systematic review and meta-analysis of Northern Hemisphere season of birth studies in schizophrenia. *Schizophr Bull* 2003;29:587-93.
39. Davis KL, Kahn RS, Ko G, Davidson M. Dopamine in schizophrenia: a review and reconceptualization. *Am J Psychiatry* 1991;148:1474-86.
40. Deister A, Marneros A. Long-term stability of subtypes in schizophrenic disorders: a comparison of four diagnostic systems. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 1993;242:184-90.
41. Delves PJ, Roitt IM. The immune system. First of two parts. *N Engl J Med* 2000a;343:37-49.
42. Delves PJ, Roitt IM. The immune system. Second of two parts. *N Engl J Med* 2000b;343:108-17.

43. Dickerson F, Stallings C, Origoni A, Boronow J, Yolken R. C-reactive protein is associated with the severity of cognitive impairment but not of psychiatric symptoms in individuals with schizophrenia. *Schizophr Res* 2007;93:261-65.
44. Dong C. TH17 cells in development: an updated view of their molecular identity and genetic programming. *Nat Rev Immunol* 2008;8:337-48.
45. Drexhage RC, Knijff EM, Padmos RC et al. The mononuclear phagocyte system and its cytokine inflammatory networks in schizophrenia and bipolar disorder. *Expert Rev Neurother* 2010;10:59-76.
46. Drzyzga L, Obuchowicz E, Marcinowska A, Herman ZS. Cytokines in schizophrenia and the effects of antipsychotic drugs. *Brain Behav Immun* 2006;20:532-45.
47. Dunn AJ. Endotoxin-induced activation of cerebral catecholamine and serotonin metabolism: comparison with interleukin-1. *J Pharmacol Exp Ther* 1992;261:964-69.
48. Fan X, Pristach C, Liu EY, Freudenreich O, Henderson DC, Goff DC. Elevated serum levels of C-reactive protein are associated with more severe psychopathology in a subgroup of patients with schizophrenia. *Psychiatry Res* 2007;149:267-71.
49. Fearon P, Kirkbride JB, Morgan C et al. Incidence of schizophrenia and other psychoses in ethnic minority groups: results from the MRC AESOP Study. *Psychol Med* 2006;36:1541-50.
50. Febbraio MA, Pedersen BK. Contraction-induced myokine production and release: is skeletal muscle an endocrine organ? *Exerc Sport Sci Rev* 2005;33:114-19.
51. Fellerhoff B, Laumbacher B, Mueller N, Gu S, Wank R. Associations between Chlamydia infections, schizophrenia and risk of HLA-A10. *Mol Psychiatry* 2007;12:264-72.
52. Fortier ME, Joobar R, Luheshi GN, Boksa P. Maternal exposure to bacterial endotoxin during pregnancy enhances amphetamine-induced locomotion and startle responses in adult rat offspring. *J Psychiatr Res* 2004;38:335-45.
53. Frei K, Malipiero UV, Leist TP, Zinkernagel RM, Schwab ME, Fontana A. On the cellular source and function of interleukin 6 produced in the central nervous system in viral diseases. *Eur J Immunol* 1989;19:689-94.
54. Fruntes V, Limosin F. Schizophrenia and viral infection during neurodevelopment: a pathogenesis model? *Med Sci Monit* 2008;14:RA71-RA77.

55. Gaebel W, Zielasek J. The DSM-V initiative "deconstructing psychosis" in the context of Kraepelin's concept on nosology. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 2008;258 Suppl 2:41-47.
56. Ganguli R. Mitogen-stimulated interleukin-2 production in never-medicated, first-episode schizophrenic patients. The influence of age at onset and negative symptoms. *Arch Gen Psychiatry* Aug;52(8):668-72 1995;52:668-72.
57. Ganguli R, Yang Z, Shurin G et al. Serum interleukin-6 concentration in schizophrenia: elevation associated with duration of illness. *Psychiatry Res* 1994;51:1-10.
58. Garver DL, Tamas RL, Holcomb JA. Elevated interleukin-6 in the cerebrospinal fluid of a previously delineated schizophrenia subtype. *Neuropsychopharmacology* 2003;28:1515-20.
59. Goldberg TE, Goldman RS, Burdick KE et al. Cognitive improvement after treatment with second-generation antipsychotic medications in first-episode schizophrenia: is it a practice effect? *Arch Gen Psychiatry* 2007;64:1115-22.
60. Grunder G, Hippus H, Carlsson A. The 'atypicality' of antipsychotics: a concept re-examined and re-defined. *Nat Rev Drug Discov* 2009;8:197-202.
61. Hafner H, Maurer K, Loffler W, Riecher-Rossler A. [Schizophrenia and age]. *Nervenarzt* 1991;62:536-48.
62. Hafner H, Riecher-Rossler A, An Der HW, Maurer K, Fatkenheuer B, Loffler W. Generating and testing a causal explanation of the gender difference in age at first onset of schizophrenia. *Psychol Med* 1993;23:925-40.
63. Harrison PJ. The neuropathology of schizophrenia. A critical review of the data and their interpretation. *Brain* 1999;122 (Pt 4):593-624.
64. Heckers S. Neuroimaging studies of the hippocampus in schizophrenia. *Hippocampus* 2001;11:520-528.
65. Himmelfarb J, Le P, Klenzak J, Freedman S, McMenamin ME, Ikizler TA. Impaired monocyte cytokine production in critically ill patients with acute renal failure. *Kidney Int* 2004;66:2354-60.
66. Hippus H, Muller N. The work of Emil Kraepelin and his research group in Munchen. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 2008;258 Suppl 2:3-11.
67. Hoenberg K, Goetz K. *Antipsychotics: Analysis of Disease Markets and Emerging Agents*. Decision Resources, Inc., Waltham, Massachusetts.

68. Iritani S. Neuropathology of schizophrenia: a mini review. *Neuropathology* 2007;27:604-8.
69. Iversen SD, Iversen LL. Dopamine: 50 years in perspective. *Trends Neurosci* 2007;30:188-93.
70. Jablensky A. The conflict of the nosologists: views on schizophrenia and manic-depressive illness in the early part of the 20th century. *Schizophr Res* 1999;39:95-100.
71. Jablensky A. Epidemiology of schizophrenia: the global burden of disease and disability. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 2000b;250:274-85.
72. Jablensky A. Epidemiology of schizophrenia: the global burden of disease and disability. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 2000a;250:274-85.
73. Kampman O, Anttila S, Illi A et al. Interaction of tumor necrosis alpha - G308A and epidermal growth factor gene polymorphisms in early-onset schizophrenia. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 2005;255:279-83.
74. Keefe RS, Bilder RM, Davis SM et al. Neurocognitive effects of antipsychotic medications in patients with chronic schizophrenia in the CATIE Trial. *Arch Gen Psychiatry* 2007;64:633-47.
75. Koliaskina GI, Sekirina TP, Androsova LV et al. [The influence of atypical neuroleptics on the immune system of patients with schizophrenia]. *Vestn Ross Akad Med Nauk* 2007;14-19.
76. Kowalski J, Blada P, Kucia K, Madej A, Herman ZS. Neuroleptics normalize increased release of interleukin- 1 beta and tumor necrosis factor-alpha from monocytes in schizophrenia. *Schizophr Res* 2001;50:169-75.
77. Kowalski J, Labuzek K, Herman ZS. Flupentixol and trifluoperidol reduce secretion of tumor necrosis factor-alpha and nitric oxide by rat microglial cells. *Neurochem Int* 2003;43:173-78.
78. Krasowska-Zoladek A, Banaszewska M, Kraszpuski M, Konat GW. Kinetics of inflammatory response of astrocytes induced by TLR 3 and TLR4 ligation. *J Neurosci Res* 2007;85:205-12.
79. Kronfol Z, Remick DG. Cytokines and the brain: implications for clinical psychiatry. *Am J Psychiatry* 2000;157:683-94.
80. Lawrie SM, Abukmeil SS. Brain abnormality in schizophrenia. A systematic and quantitative review of volumetric magnetic resonance imaging studies. *Br J Psychiatry* 1998;172:110-120.

81. Leucht S, Corves C, Arbter D, Engel RR, Li C, Davis JM. Second-generation versus first-generation antipsychotic drugs for schizophrenia: a meta-analysis. *Lancet* 2009;373:31-41.
82. Lewis DA, Hashimoto T. Deciphering the disease process of schizophrenia: the contribution of cortical gaba neurons. *Int Rev Neurobiol* 2007;78:109-31.
83. Lin A, Kenis G, Bignotti S et al. The inflammatory response system in treatment-resistant schizophrenia: increased serum interleukin-6. *Schizophr Res* 1998;32:9-15.
84. Maier W. Common risk genes for affective and schizophrenic psychoses. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 2008;258 Suppl 2:37-40.
85. Maier W, Lichtermann D, Rietschel M et al. [Genetics of schizophrenic disorders. New concepts and findings]. *Nervenarzt* 1999;70:955-69.
86. Marneros A, Deister A, Rohde A. Validity of the negative/positive dichotomy for schizophrenic disorders under long-term conditions. *Schizophr Res* 1992;7:117-23.
87. May P, Goldberg SC. *Psychopharmacology: a generation of progress. Prediction of schizophrenic patients, response to pharmacotherapy*. Raven, New York.
88. McGlashan TH. Is active psychosis neurotoxic? *Schizophr Bull* 2006;32:609-13.
89. Mednick SA, Machon RA, Huttunen MO, Bonett D. Adult schizophrenia following prenatal exposure to an influenza epidemic. *Arch Gen Psychiatry* 1988;45:189-92.
90. Melle I, Johannesen JO, Friis S et al. Early detection of the first episode of schizophrenia and suicidal behavior. *Am J Psychiatry* 2006;163:800-804.
91. Miyamoto S, Duncan GE, Marx CE, Lieberman JA. Treatments for schizophrenia: a critical review of pharmacology and mechanisms of action of antipsychotic drugs. *Mol Psychiatry* 2005;10:79-104.
92. Möller H-J. Schizophrenie. In Möller H-J, Laux G, Deister A, eds. *Psychiatrie und Psychotherapie*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG, Duale Reihe, 134-59.
93. Moller HJ. Systematic of psychiatric disorders between categorical and dimensional approaches: Kraepelin's dichotomy and beyond. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 2008;258 Suppl 2:48-73.

94. Möller, H.-J., Deister, A., Schaub, A., and Riedel, M. *Psychiatrie und Psychotherapie. Band 2, Spezielle Psychiatrie*. 2008. Springer Medizin Verlag Heidelberg, Möller, H.-J.; Laux, G.; Kapfhammer, H.-P. (Hrsg.).
95. Muller N. [Role of the cytokine network in the CNS and psychiatric disorders]. *Nervenarzt* 1997;68:11-20.
96. Muller N. Immunological and infectious aspects of schizophrenia. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 2004;254:1-3.
97. Muller N, Ackenheil M. Immunoglobulin and albumin content of cerebrospinal fluid in schizophrenic patients: relationship to negative symptomatology. *Schizophr Res* 1995;14:223-28.
98. Muller N, Riedel M, Ackenheil M, Schwarz MJ. The role of immune function in schizophrenia: an overview. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 1999;249 Suppl 4:62-68.
99. Muller N, Riedel M, Scheppach C et al. Beneficial antipsychotic effects of celecoxib add-on therapy compared to risperidone alone in schizophrenia. *Am J Psychiatry* 2002;159:1029-34.
100. Muller N, Riedel M, Schwarz MJ, Engel RR. Clinical effects of COX-2 inhibitors on cognition in schizophrenia. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 2005;255:149-51.
101. Muller N, Schwarz MJ. Neuroimmune-endocrine crosstalk in schizophrenia and mood disorders. *Expert Rev Neurother* 2006;6:1017-38.
102. Muller N, Schwarz MJ. [Immunology in schizophrenic disorders]. *Nervenarzt* 2007b;78:253-60, 262.
103. Muller N, Schwarz MJ. [Immunology in schizophrenic disorders]. *Nervenarzt* 2007a;78:253-60, 262.
104. Muller N, Schwarz MJ. A psychoneuroimmunological perspective to Emil Kraepelin's dichotomy: schizophrenia and major depression as inflammatory CNS disorders. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 2008b;258 Suppl 2:97-106.
105. Muller N, Schwarz MJ. A psychoneuroimmunological perspective to Emil Kraepelin's dichotomy: schizophrenia and major depression as inflammatory CNS disorders. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 2008a;258 Suppl 2:97-106.
106. Na KS, Kim YK. Monocytic, Th1 and Th2 cytokine alterations in the pathophysiology of schizophrenia. *Neuropsychobiology* 2007;56:55-63.

107. Narita K, Sasaki T, Akaho R et al. Human leukocyte antigen and season of birth in Japanese patients with schizophrenia. *Am J Psychiatry* 2000;157:1173-75.
108. Ni L, Acevedo G, Muralidharan B, Padala N, To J, Jonakait GM. Toll-like receptor ligands and CD154 stimulate microglia to produce a factor(s) that promotes excess cholinergic differentiation in the developing rat basal forebrain: implications for neurodevelopmental disorders. *Pediatr Res* 2007;61:15-20.
109. Niebuhr DW, Millikan AM, Cowan DN, Yolken R, Li Y, Weber NS. Selected infectious agents and risk of schizophrenia among U.S. military personnel. *Am J Psychiatry* 2008;165:99-106.
110. Niebuhr DW, Millikan AM, Yolken R, Li Y, Weber NS. Results from a hypothesis generating case-control study: herpes family viruses and schizophrenia among military personnel. *Schizophr Bull* 2008;34:1182-88.
111. Nunes SO, Itano EN, Amarante MK et al. RNA from Borna disease virus in patients with schizophrenia, schizoaffective patients, and in their biological relatives. *J Clin Lab Anal* 2008;22:314-20.
112. O'Brien SM, Scully P, Dinan TG. Increased tumor necrosis factor-alpha concentrations with interleukin-4 concentrations in exacerbations of schizophrenia. *Psychiatry Res* 2008;160:256-62.
113. Ozawa K, Hashimoto K, Kishimoto T, Shimizu E, Ishikura H, Iyo M. Immune activation during pregnancy in mice leads to dopaminergic hyperfunction and cognitive impairment in the offspring: a neurodevelopmental animal model of schizophrenia. *Biol Psychiatry* 2006;59:546-54.
114. Padmos RC, Hillegers MH, Knijff EM et al. A discriminating messenger RNA signature for bipolar disorder formed by an aberrant expression of inflammatory genes in monocytes. *Arch Gen Psychiatry* 2008;65:395-407.
115. Pae CU, Yoon CH, Kim TS et al. Antipsychotic treatment may alter T-helper (TH) 2 arm cytokines. *Int Immunopharmacol* 2006;6:666-71.
116. Patterson PH. Maternal infection: window on neuroimmune interactions in fetal brain development and mental illness. *Curr Opin Neurobiol* 2002;12:115-18.
117. Patterson TL, Leeuwenkamp OR. Adjunctive psychosocial therapies for the treatment of schizophrenia. *Schizophr Res* 2008;100:108-19.

118. Pepys MB, Baltz MC. Acute phase proteins with special reference to C-reactive protein and related proteins (pentaxins) and serum amyloid A protein. *Adv Immunol* 1983;34:141-212.
119. Perkins DO, Gu H, Boteva K, Lieberman JA. Relationship between duration of untreated psychosis and outcome in first-episode schizophrenia: a critical review and meta-analysis. *Am J Psychiatry* 2005;162:1785-804.
120. Phaybouth V, Wang SZ, Hutt JA, McDonald JD, Harrod KS, Barrett EG. Cigarette smoke suppresses Th1 cytokine production and increases RSV expression in a neonatal model. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2006;290:L222-L231.
121. Potvin S, Stip E, Sepehry AA, Gendron A, Bah R, Kouassi E. Inflammatory cytokine alterations in schizophrenia: a systematic quantitative review. *Biol Psychiatry* 2008;63:801-8.
122. Propping P, Nothen MM, Korner J, Rietschel M, Maier W. [Genetic association in psychiatric diseases. Concepts and findings]. *Nervenarzt* 1994;65:725-40.
123. Purcell SM, Wray NR, Stone JL et al. Common polygenic variation contributes to risk of schizophrenia and bipolar disorder. *Nature* 2009;460:748-52.
124. Raedler TJ, Bymaster FP, Tandon R, Copolov D, Dean B. Towards a muscarinic hypothesis of schizophrenia. *Mol Psychiatry* 2007;12:232-46.
125. Richelson E, Nelson A. Antagonism by neuroleptics of neurotransmitter receptors of normal human brain in vitro. *Eur J Pharmacol* 1984;103:197-204.
126. Rivest S, Lacroix S, Vallieres L, Nadeau S, Zhang J, Laflamme N. How the blood talks to the brain parenchyma and the paraventricular nucleus of the hypothalamus during systemic inflammatory and infectious stimuli. *Proc Soc Exp Biol Med* 2000;223:22-38.
127. Roelofs MF, Joosten LA, bdollahi-Roodsaz S et al. The expression of toll-like receptors 3 and 7 in rheumatoid arthritis synovium is increased and costimulation of toll-like receptors 3, 4, and 7/8 results in synergistic cytokine production by dendritic cells. *Arthritis Rheum* 2005;52:2313-22.
128. Rothermundt M, Arolt V, Bayer TA. Review of immunological and immunopathological findings in schizophrenia. *Brain Behav Immun* 2001;15:319-39.
129. Schalkwijk CG, Poland DC, van DW et al. Plasma concentration of C-reactive protein is increased in type I diabetic patients without clinical

- macroangiopathy and correlates with markers of endothelial dysfunction: evidence for chronic inflammation. *Diabetologia* 1999;42:351-57.
130. Schmitt A, Bertsch T, Tost H et al. Increased serum interleukin-1beta and interleukin-6 in elderly, chronic schizophrenic patients on stable antipsychotic medication. *Neuropsychiatr Dis Treat* 2005;1:171-77.
131. Semple DM, McIntosh AM, Lawrie SM. Cannabis as a risk factor for psychosis: systematic review. *J Psychopharmacol* 2005;19:187-94.
132. Sette A, Buus S, Colon S, Smith JA, Miles C, Grey HM. Structural characteristics of an antigen required for its interaction with Ia and recognition by T cells. *Nature* 1987;328:395-99.
133. Shen Q, Li ZQ, Sun Y et al. The role of pro-inflammatory factors in mediating the effects on the fetus of prenatal undernutrition: implications for schizophrenia. *Schizophr Res* 2008;99:48-55.
134. Shimotakahara A, Metzelder M, Vieten G, Ure B, Kuebler JF. CO2 modulates the inflammatory cytokine release of primary human pleural macrophages. *Eur J Pediatr Surg* 2010;20:111-15.
135. Shintani F, Kanba S, Nakaki T et al. Interleukin-1 beta augments release of norepinephrine, dopamine, and serotonin in the rat anterior hypothalamus. *J Neurosci* 1993;13:3574-81.
136. Singh B, Bera NK, Nayak CR, Chaudhuri TK. Decreased serum levels of interleukin-2 and interleukin-6 in Indian Bengalee schizophrenic patients. *Cytokine* 2009;47:1-5.
137. Song C, Lin A, Kenis G, Bosmans E, Maes M. Immunosuppressive effects of clozapine and haloperidol: enhanced production of the interleukin-1 receptor antagonist. *Schizophr Res* 2000;42:157-64.
138. Song XQ, Lv LX, Li WQ, Hao YH, Zhao JP. The interaction of nuclear factor-kappa B and cytokines is associated with schizophrenia. *Biol Psychiatry* 2009;65:481-88.
139. Spangelo BL, Judd AM, Isakson PC, MacLeod RM. Interleukin-1 stimulates interleukin-6 release from rat anterior pituitary cells in vitro. *Endocrinology* 1991;128:2685-92.
140. Stefansson H, Ophoff RA, Steinberg S et al. Common variants conferring risk of schizophrenia. *Nature* 2009;460:744-47.
141. Steinke JW, Borish L. 3. Cytokines and chemokines. *J Allergy Clin Immunol* 2006;117:S441-S445.

142. Stone JM, Morrison PD, Pilowsky LS. Glutamate and dopamine dysregulation in schizophrenia--a synthesis and selective review. *J Psychopharmacol* 2007;21:440-452.
143. Tandon R, Belmaker RH, Gattaz WF et al. World Psychiatric Association Pharmacopsychiatry Section statement on comparative effectiveness of antipsychotics in the treatment of schizophrenia. *Schizophr Res* 2008;100:20-38.
144. Tandon R, Keshavan MS, Nasrallah HA. Schizophrenia, "just the facts" what we know in 2008. 2. Epidemiology and etiology. *Schizophr Res* 2008a;102:1-18.
145. Tandon R, Keshavan MS, Nasrallah HA. Schizophrenia, "just the facts" what we know in 2008. 2. Epidemiology and etiology. *Schizophr Res* 2008b;102:1-18.
146. Tandon R, Keshavan MS, Nasrallah HA. Schizophrenia, "Just the Facts": what we know in 2008 part 1: overview. *Schizophr Res* 2008c;100:4-19.
147. Tandon R, Targum SD, Nasrallah HA, Ross R. Strategies for maximizing clinical effectiveness in the treatment of schizophrenia. *J Psychiatr Pract* 2006;12:348-63.
148. Theodoropoulou S, Spanakos G, Baxevasis CN et al. Cytokine serum levels, autologous mixed lymphocyte reaction and surface marker analysis in never medicated and chronically medicated schizophrenic patients. *Schizophr Res* 2001;47:13-25.
149. Tienari, P. Gene-environment interaction in adoptive families. Search for the causes of schizophrenia. 2. Aufl. Springer, Berlin Heidelberg New York Tokio, 126-143. 1991. Häfner, H, Gattaz WF.
150. Torrey EF, Yolken RH. Schizophrenia and toxoplasmosis. *Schizophr Bull* 2007;33:727-28.
151. Urakubo A, Jarskog LF, Lieberman JA, Gilmore JH. Prenatal exposure to maternal infection alters cytokine expression in the placenta, amniotic fluid, and fetal brain. *Schizophr Res* 2001;47:27-36.
152. van Venrooij JA, Fluitman SB, Lijmer JG et al. Impaired Neuroendocrine and Immune Response to Acute Stress in Medication-Naive Patients With a First Episode of Psychosis. *Schizophr Bull* 2010.
153. Watkins LR, Maier SF, Goehler LE. Cytokine-to-brain communication: a review & analysis of alternative mechanisms. *Life Sci* 1995;57:1011-26.
154. Weinberger DR. Implications of normal brain development for the pathogenesis of schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* 1987;44:660-669.

-
155. Widner B, Laich A, Sperner-Unterweger B, Ledochowski M, Fuchs D. Neopterin production, tryptophan degradation, and mental depression--what is the link? *Brain Behav Immun* 2002;16:590-595.
 156. Wilke I, Arolt V, Rothermundt M, Weitzsch C, Hornberg M, Kirchner H. Investigations of cytokine production in whole blood cultures of paranoid and residual schizophrenic patients. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 1996;246:279-84.
 157. Wyatt RJ, Henter I. Rationale for the study of early intervention. *Schizophr Res* 2001;51:69-76.
 158. Yaffe K, Lindquist K, Penninx BW et al. Inflammatory markers and cognition in well-functioning African-American and white elders. *Neurology* 2003;61:76-80.
 159. Yolken RH, Bachmann S, Ruslanova I et al. Antibodies to *Toxoplasma gondii* in individuals with first-episode schizophrenia. *Clin Infect Dis* 2001;32:842-44.
 160. Zhu Y, Kodvawala A, Hui DY. Apolipoprotein E inhibits toll-like receptor (TLR)-3- and TLR-4-mediated macrophage activation through distinct mechanisms. *Biochem J* 2010;428:47-54.
 161. Zuckerman L, Rehavi M, Nachman R, Weiner I. Immune activation during pregnancy in rats leads to a postpubertal emergence of disrupted latent inhibition, dopaminergic hyperfunction, and altered limbic morphology in the offspring: a novel neurodevelopmental model of schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* 2003;28:1778-89.

7 Anhang

7.1.1 Positive and Negative Syndrome Scale (PANSS)

PANSS	
Bitte beurteilen Sie den Patienten nach folgender Skala (PANSS: "Positive And Negative Syndromes Scale")	
Die sieben Bewertungsstufen entsprechen zunehmenden Schweregraden des psychopathologischen Zustandes:	
Positiv-Skala	
P1. Wahnideen	<input type="checkbox"/> .1 <input type="checkbox"/> .2 <input type="checkbox"/> .3 <input type="checkbox"/> .4 <input type="checkbox"/> .5 <input type="checkbox"/> .6 <input type="checkbox"/> .7
P2. Formale Denkstörungen	<input type="checkbox"/> .1 <input type="checkbox"/> .2 <input type="checkbox"/> .3 <input type="checkbox"/> .4 <input type="checkbox"/> .5 <input type="checkbox"/> .6 <input type="checkbox"/> .7
P3. Halluzinationen	<input type="checkbox"/> .1 <input type="checkbox"/> .2 <input type="checkbox"/> .3 <input type="checkbox"/> .4 <input type="checkbox"/> .5 <input type="checkbox"/> .6 <input type="checkbox"/> .7
P4. Erregung	<input type="checkbox"/> .1 <input type="checkbox"/> .2 <input type="checkbox"/> .3 <input type="checkbox"/> .4 <input type="checkbox"/> .5 <input type="checkbox"/> .6 <input type="checkbox"/> .7
P5. Größenwahn	<input type="checkbox"/> .1 <input type="checkbox"/> .2 <input type="checkbox"/> .3 <input type="checkbox"/> .4 <input type="checkbox"/> .5 <input type="checkbox"/> .6 <input type="checkbox"/> .7
P6. Mißtrauen/Verfolgungswahn	<input type="checkbox"/> .1 <input type="checkbox"/> .2 <input type="checkbox"/> .3 <input type="checkbox"/> .4 <input type="checkbox"/> .5 <input type="checkbox"/> .6 <input type="checkbox"/> .7
P7. Feindseligkeit	<input type="checkbox"/> .1 <input type="checkbox"/> .2 <input type="checkbox"/> .3 <input type="checkbox"/> .4 <input type="checkbox"/> .5 <input type="checkbox"/> .6 <input type="checkbox"/> .7
Negativ-Skala	
N1. Affektverflachung	<input type="checkbox"/> .1 <input type="checkbox"/> .2 <input type="checkbox"/> .3 <input type="checkbox"/> .4 <input type="checkbox"/> .5 <input type="checkbox"/> .6 <input type="checkbox"/> .7
N2. Emotionaler Rückzug	<input type="checkbox"/> .1 <input type="checkbox"/> .2 <input type="checkbox"/> .3 <input type="checkbox"/> .4 <input type="checkbox"/> .5 <input type="checkbox"/> .6 <input type="checkbox"/> .7
N3. mangelnder affektiver Rapport	<input type="checkbox"/> .1 <input type="checkbox"/> .2 <input type="checkbox"/> .3 <input type="checkbox"/> .4 <input type="checkbox"/> .5 <input type="checkbox"/> .6 <input type="checkbox"/> .7
N4. soziale Passivität und Apathie	<input type="checkbox"/> .1 <input type="checkbox"/> .2 <input type="checkbox"/> .3 <input type="checkbox"/> .4 <input type="checkbox"/> .5 <input type="checkbox"/> .6 <input type="checkbox"/> .7
N5. Schwierigkeiten beim abstrakten Denken	<input type="checkbox"/> .1 <input type="checkbox"/> .2 <input type="checkbox"/> .3 <input type="checkbox"/> .4 <input type="checkbox"/> .5 <input type="checkbox"/> .6 <input type="checkbox"/> .7
N6. Mangel an Spontanität und Flüssigkeit in der Sprache	<input type="checkbox"/> .1 <input type="checkbox"/> .2 <input type="checkbox"/> .3 <input type="checkbox"/> .4 <input type="checkbox"/> .5 <input type="checkbox"/> .6 <input type="checkbox"/> .7
N7. stereotype Gedanken	<input type="checkbox"/> .1 <input type="checkbox"/> .2 <input type="checkbox"/> .3 <input type="checkbox"/> .4 <input type="checkbox"/> .5 <input type="checkbox"/> .6 <input type="checkbox"/> .7
Gesamtscore Positiv-Skala	<input type="text" value=""/> <input type="text" value=""/>
Gesamtscore Negativ-Skala	<input type="text" value=""/> <input type="text" value=""/>
Fortsetzung auf der nächsten Seite	

PANSS	
Die sieben Bewertungsstufen entsprechen zunehmenden Schweregraden des psychopathologischen Zustandes:	
Allgemeine Psychopathologie-Skala	
G1. Sorge um die Gesundheit	<input type="checkbox"/> .1 <input type="checkbox"/> .2 <input type="checkbox"/> .3 <input type="checkbox"/> .4 <input type="checkbox"/> .5 <input type="checkbox"/> .6 <input type="checkbox"/> .7
G2. Angst	<input type="checkbox"/> .1 <input type="checkbox"/> .2 <input type="checkbox"/> .3 <input type="checkbox"/> .4 <input type="checkbox"/> .5 <input type="checkbox"/> .6 <input type="checkbox"/> .7
G3. Schuldgefühle	<input type="checkbox"/> .1 <input type="checkbox"/> .2 <input type="checkbox"/> .3 <input type="checkbox"/> .4 <input type="checkbox"/> .5 <input type="checkbox"/> .6 <input type="checkbox"/> .7
G4. Anspannung	<input type="checkbox"/> .1 <input type="checkbox"/> .2 <input type="checkbox"/> .3 <input type="checkbox"/> .4 <input type="checkbox"/> .5 <input type="checkbox"/> .6 <input type="checkbox"/> .7
G5. Manierismen und unnatürliche Körperhaltung	<input type="checkbox"/> .1 <input type="checkbox"/> .2 <input type="checkbox"/> .3 <input type="checkbox"/> .4 <input type="checkbox"/> .5 <input type="checkbox"/> .6 <input type="checkbox"/> .7
G6. Depressive Verstimmung	<input type="checkbox"/> .1 <input type="checkbox"/> .2 <input type="checkbox"/> .3 <input type="checkbox"/> .4 <input type="checkbox"/> .5 <input type="checkbox"/> .6 <input type="checkbox"/> .7
G7. Motorische Verlangsamung	<input type="checkbox"/> .1 <input type="checkbox"/> .2 <input type="checkbox"/> .3 <input type="checkbox"/> .4 <input type="checkbox"/> .5 <input type="checkbox"/> .6 <input type="checkbox"/> .7
G8. unkooperatives Verhalten	<input type="checkbox"/> .1 <input type="checkbox"/> .2 <input type="checkbox"/> .3 <input type="checkbox"/> .4 <input type="checkbox"/> .5 <input type="checkbox"/> .6 <input type="checkbox"/> .7
G9. ungewöhnliche Denkinhalte	<input type="checkbox"/> .1 <input type="checkbox"/> .2 <input type="checkbox"/> .3 <input type="checkbox"/> .4 <input type="checkbox"/> .5 <input type="checkbox"/> .6 <input type="checkbox"/> .7
G10. Desorientiertheit	<input type="checkbox"/> .1 <input type="checkbox"/> .2 <input type="checkbox"/> .3 <input type="checkbox"/> .4 <input type="checkbox"/> .5 <input type="checkbox"/> .6 <input type="checkbox"/> .7
G11. Mangelnde Aufmerksamkeit	<input type="checkbox"/> .1 <input type="checkbox"/> .2 <input type="checkbox"/> .3 <input type="checkbox"/> .4 <input type="checkbox"/> .5 <input type="checkbox"/> .6 <input type="checkbox"/> .7
G12. Mangel an Urteilsfähigkeit und Einsicht	<input type="checkbox"/> .1 <input type="checkbox"/> .2 <input type="checkbox"/> .3 <input type="checkbox"/> .4 <input type="checkbox"/> .5 <input type="checkbox"/> .6 <input type="checkbox"/> .7
G13. Willensschwäche	<input type="checkbox"/> .1 <input type="checkbox"/> .2 <input type="checkbox"/> .3 <input type="checkbox"/> .4 <input type="checkbox"/> .5 <input type="checkbox"/> .6 <input type="checkbox"/> .7
G14. mangelnde Impulskontrolle	<input type="checkbox"/> .1 <input type="checkbox"/> .2 <input type="checkbox"/> .3 <input type="checkbox"/> .4 <input type="checkbox"/> .5 <input type="checkbox"/> .6 <input type="checkbox"/> .7
G15. Selbstbezogenheit	<input type="checkbox"/> .1 <input type="checkbox"/> .2 <input type="checkbox"/> .3 <input type="checkbox"/> .4 <input type="checkbox"/> .5 <input type="checkbox"/> .6 <input type="checkbox"/> .7
G16. aktives soziales Vermeidungsverhalten	<input type="checkbox"/> .1 <input type="checkbox"/> .2 <input type="checkbox"/> .3 <input type="checkbox"/> .4 <input type="checkbox"/> .5 <input type="checkbox"/> .6 <input type="checkbox"/> .7
<p>Gesamtscore Allgemeine Psychopathologie-Skala <input style="width: 40px; height: 20px;" type="text"/></p> <p>Gesamtscore der 3 Skalen <input style="width: 40px; height: 20px;" type="text"/></p>	

8 Danksagung

Ich bedanke mich im besonderen Maße bei Prof. Dr. med. Dipl.-Psych. Norbert Müller für die sehr herzliche, kontinuierliche und ergebnisorientierte Betreuung während allen Phasen der Doktorarbeit. Prof. Müller hat großen Anteil daran, dass ich wissenschaftliches Arbeiten und Schreiben erlernen konnte und diese Fähigkeiten in Form dieser Arbeit sowie Veröffentlichungen und Postervorträgen ausbauen durfte.

Meinen beiden Betreuerinnen, Dr. med. Daniela Krause und Dr. med. Judith Matz, danke ich sehr herzlich für die stetige, verlässliche und kompetente Begleitung. Besonders Dr. Daniela Krause danke ich für die hervorragende Zusammenarbeit bei der Erstellung der Veröffentlichungen. Prof. Dr. med. Rudolf Gruber danke ich für die sehr gute Betreuung und die sehr hilfreichen Korrekturanregungen.

Ich möchte mich besonders bei allen bedanken, die Anteil an der Entstehung und Verwirklichung dieser Arbeit hatten und mit denen ich direkt zusammenarbeiten durfte: Elif Weidinger und Agnes Wildenauer als meine Mitdoktorandinnen, Maggie Wüllner und Stefanie Kirsch als die besten Ansprechpartnerinnen im Rheumalabor der Poliklinik der LMU, PD Dr. med. Markus J. Schwarz, Michael Obermeier und Dr. med. Sandra Dehning. Vielen herzlichen Dank!

Ich danke von Herzen meiner Familie und meinen Freunden für ihre Motivation und Geduld. Meinen Eltern, Dr. phil. Beate Wagner und Dieter Schubmann-Wagner, gilt mein größter Dank. Eure Unterstützung und Liebe hat mich immer weit getragen – so auch durch sämtliche Phasen dieser Arbeit und meines Studiums. Diese Doktorarbeit ist für Euch.

