

Untersuchung des zellulären Immunsystems

schizophrener Patienten

mittels Durchflusszytometrie

Sabine Kroiß Benninger

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

Direktor: Prof. Dr. H.-J. Möller

**Untersuchung des zellulären Immunsystems
schizophrener Patienten
mittels Durchflusszytometrie**

Dissertation

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

vorgelegt von
Sabine Kroiß Benninger
aus Neumarkt - St. Veit

2002

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Dipl.-Psych. N. Müller

Mitberichterstatter: PD Dr. H. Engelmann, Prof. Dr. H. Wekerle,
Prof. Dr. Dr. M. Albus

Promovierte Mitbetreuer: PD Dr. med. R. Gruber, Dr. med. M. Riedel

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h. c. K. Peter

Tag der mündlichen Prüfung: 31.10.2002

Inhaltsverzeichnis

I. Einführung	6
1. Ätiologie der Schizophrenie	6
1.1. Hirnforschung	6
1.1.1. Neuropathologie	6
1.1.2. Neurotransmitter	7
1.2. Genetische Faktoren	8
1.3. Perinatale Faktoren	9
1.4. Immunologische Faktoren	10
1.4.1. Virushypothese	10
1.4.2. Autoimmunhypothese	14
1.5. Phänotypischer Ansatz	16
2. Psychoneuroimmunologie (PNI)	19
2.1. Hintergrund der PNI	19
2.2. Das zelluläre Immunsystem	21
2.3. Die Stressreaktion	28
2.4. Das Zytokin-Netzwerk des Gehirns	31
3. Problemstellung	34
II. Material und Methoden	36
1. Material	36
1.1. Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	36
1.2. Geräte	36
1.3. Antikörper	37
1.4. Untersuchungsmaterial	38
1.4.1. Patienten und Kontrollpersonen	38
1.4.2. Definition von Subgruppen	40
1.4.3. Zusätzliche Patientengruppe	40
2. Methoden	42
2.1. Probenverarbeitung	42
2.1.1. Isolierung von Lymphozyten aus Vollblut	42

2.1.2. Einfrieren und Auftauen von Zellen	43
2.2. Durchflusszytometrie	44
2.2.1. Grundlagen der Durchflusszytometrie	44
2.2.2. Fluoreszenzfärbung	48
2.2.3. Messung mit dem Durchflusszytometer (FACScan™, B&D)	52
2.2.4. Auswertung der Daten	54
2.3. Statistik	56
III. Ergebnisse	57
1. T-Zellen (CD3)	57
1.1. Subpopulationen CD4 und CD8	57
1.2. „Naive“ T-Zellen (CD45RA)	58
1.3. T-„Gedächtnis“-Zellen	60
1.3.1. Expression von CD45RO	60
1.3.2. Expression von CD58 und CD60	61
1.4. Expression von HLA-DR	63
2. Natürliche <i>Killerzellen</i> (NK-Zellen, CD16/56)	64
3. B-Zellen (CD19) und Expression von CD5	65
4. Interleukinrezeptoren	66
5. Vergleich mit Phänotypen	68
IV. Diskussion	73
V. Zusammenfassung	83
VI. Literaturverzeichnis	85
VII. PANSS – Manual: Bewertungsbogen	101
VIII. Danksagung	105
IX. Curriculum	106

I. Einführung

1. Ätiologie der Schizophrenie

Die Schizophrenie wird zu den endogenen Psychosen gezählt, mit den typischen Symptomen der Störung von Wahrnehmung, Denken und Empfinden und des Ich-Erlebens. Erstmals beschrieben wurde die Schizophrenie 1896 von Kraepelin, der Sie als „Dementia praecox“ bezeichnete (Kraepelin, 1896). Den Begriff „Schizophrenie“ führte 1911 Eugen Bleuler (Bleuler, 1911) ein. Obwohl die Schizophrenie eine Veränderung der Emotionen und auch in manchen Fällen eine Beeinträchtigung der kognitiven Fähigkeiten mit sich bringt, wird sie von Gemütsstörungen und Demenzen klar unterschieden, beides Erkrankungen, die oben genannte Symptome als primäre Störung zeigen. Die Schizophrenie ist eine relativ häufige Erkrankung mit einem Erkrankungsrisiko im Laufe des Lebens von ca. 1% („Lifetime-Prävalenz“). Das Alter der Erstmanifestation liegt in 50% der Fälle zwischen dem 20. und 30. Lebensjahr, wobei Männer im Durchschnitt 5 Jahre früher als Frauen erkranken (Lieb und Brunnhuber, 1993). Weltweit tritt die Schizophrenie etwa gleich häufig auf, unabhängig von kulturellem, sozialem oder klimatischem Umfeld (Crow, 1994b).

Bis heute ist die Ätiologie der Erkrankung ungeklärt. Eine Vielzahl von Faktoren wurden und werden noch diskutiert, die mit der Ätiopathogenese der Schizophrenie in Zusammenhang gebracht werden. Es hat sich herausgestellt, dass nicht nach einer einzigen Ursache für die Krankheitsentstehung gesucht werden kann, sondern dass zum Verständnis dieser Erkrankung eine Reihe von Faktoren betrachtet werden müssen. Auf die wichtigsten Ansätze zur Klärung der Pathogenese der Schizophrenie soll im Folgenden kurz eingegangen werden.

(siehe auch *Reviews*: Crow, 1994b; Tsuang und Faraone, 1995; McGuffin et al., 1987; Cardno und Farmer, 1995; Wyatt, 1996; Kirch, 1993; Yolken und Torrey, 1995).

1.1. Hirnforschung

1.1.1. Neuropathologie

Von morphologisch-anatomischer Seite konnten bislang keine für die Schizophrenie pathognomonischen neuropathologischen Befunde erhoben werden. Bildgebende Verfahren zur Darstellung des Gehirns schizophrener Patienten *in vivo*, wie Computertomographie, Magnetresonanz- und Positronen-Emissions-Tomographie (MRT und PET) stellten verschiedene, allerdings unspezifische Veränderungen der Hirnstruktur fest. Die am

häufigsten beschriebene und immer wieder reproduzierte Veränderung ist eine Erweiterung der Seitenventrikel, die unabhängig von psychiatrischer Behandlung und Chronizität der Erkrankung auftritt. Der Ort der strukturelle Läsion, aufgrund derer es zu dieser Ventrikelvergrößerung kommt, konnte jedoch bisher nicht identifiziert werden (Hyde und Weinberger, 1990). In weiteren neuroradiologischen Verfahren und postmortem Histologien wurden relative Gewebsdefizite im Bereich des limbischen Systems, v. a. im Hippocampus gefunden (DeLisi et al., 1988). Histopathologische Untersuchungen haben keine für Schizophrenie spezifischen Merkmale erbracht, wie dies z. B. die Neurofibrillen bei der Alzheimerschen Demenz sind. Mittels PET zeigten Ingvar und Franzen (1974) erstmals eine verminderte Durchblutung des frontalen Cortex und damit Hinweise für ein funktionelles Defizit. Auch neuropsychologische Studien konnten eine niedrigere Durchblutung des frontalen Cortex bei Schizophrenen feststellen, so dass sich nun die Frage nach dem Pathomechanismus dieser Funktionsminderung stellt. Die Befunde stützen die Hypothese eines Defizits in der Frühentwicklung des Gehirns als Ursache für das spätere Auftreten einer Schizophrenie, möglicherweise verbunden mit einer weiterbestehenden Reifungs- und Funktionsstörung des zentralen Nervensystems (ZNS). Neuere Techniken werden helfen, die neuropathologischen und -physiologischen Grundlagen aufzudecken (Hyde und Weinberger, 1990).

1.1.2. Neurotransmitter

Die Hypothese, die eine Störung des Gleichgewichts von Neurotransmittern bzw. eine biochemische Fehlregulation des Gehirns als Ursache für die schizophrene Symptomatik sieht, beruht hauptsächlich auf deren Behandlungserfolg mit Neuroleptika. Bei den Neuroleptika handelt es sich um eine Substanzklasse von Dopaminantagonisten, deren biochemische Wirkung vor allem über dopaminerge Rezeptoren vom Typ D₂ erfolgt, wobei Clozapin, eine relativ neu entwickelte Substanz, an dopaminergen und serotonergen Rezeptoren ansetzt. Auch eine Rolle des glutaminergen Systems im Gehirn wird in diesem Zusammenhang diskutiert. Jedoch spricht vieles dafür, dass es zu dieser Funktionsstörung der Neurotransmission als Folge eines anderen Primärdefektes kommt (Mukherjee und Mahadik, 1994).

1.2. Genetische Faktoren

Es ist bekannt, dass es sich bei der Schizophrenie um eine Erkrankung mit genetischer Prädisposition handelt. Erste Hinweise auf eine Erbllichkeit der Schizophrenie ergaben sich, als man Anfang des Jahrhunderts erkannte, dass diese Erkrankung familiär gehäuft auftritt. Genauere Untersuchungen zum Einfluss von erblichen und Umweltfaktoren wurden anhand von Adoptions- und Zwillingsstudien durchgeführt (Gottesmann und Shields, 1976). Die bekannteste Studie aus den 60er Jahren von Kety et al. (1968) untersuchte schizophrene Patienten, die im Kindesalter adoptiert wurden und fand, dass genetisch Verwandte ein erhöhtes Erkrankungsrisiko tragen. Die Prävalenz der Schizophrenie ist höher bei den biologischen Verwandten als in der Adoptivfamilie (Gottesman, 1991). Auch Zwillingsstudien führten zu dem Ergebnis, dass das Risiko für einen eineiigen Zwilling, wenn der andere Zwilling an Schizophrenie erkrankt ist, ebenfalls zu erkranken wesentlich höher ist als bei zweieiigen Zwillingen. In einer Übersichtsarbeit von Moldin (1998), die Familien- und Zwillingsstudien der Jahre 1920 bis 1987 zusammenfasst, wird das Risiko für das Auftreten einer Schizophrenie unter monozygoten Zwillingen gegenüber der Normalbevölkerung als 48-fach erhöht angegeben, 11-fach erhöht für erstgradig Verwandte, 4,25-fach für Verwandte zweiten und doppelt so hoch für Verwandte dritten Grades. Die Konkordanz bei monozygoten Zwillingen betrug durchschnittlich 46%, auch wenn sie in unterschiedlichen Familien aufgewachsen sind, wohingegen die Konkordanzrate dizygoter Zwillinge nur durchschnittlich 14% betrug. Diese Ergebnisse bedeuten, dass das Erkrankungsrisiko mit dem Grad der Verwandtschaft steigt, jedoch auch, dass genetisch identische Individuen nicht gleich häufig erkranken, was für ein Zusammenwirken von erblicher Veranlagung und äußeren Faktoren spricht. Die Suche nach verantwortlichen Genen gestaltet sich allerdings sehr schwierig. Bislang wurden bis zu zehn unterschiedliche Genorte und chromosomale Anomalien diskutiert, die mit der Erkrankung in Verbindung gebracht werden. Allerdings sind die Ergebnisse oft widersprüchlich und nicht reproduzierbar bzw. würden nur einen sehr kleinen Anteil der Schizophrenien betreffen. (Tsuang und Faraone, 1995; McKusick et al., 1986). Verschiedene Autoren haben gezeigt, unter anderem Murray et al. (1985) in einer Analyse genetischer Studien, dass es sich nicht um eine monogenetische Erkrankung handeln kann, das heißt, dass die Erkrankung nicht durch ein einziges dominant oder rezessiv vererbtes Gen weitergegeben wird, sondern von Heterogenie oder einem Zusammenwirken mehrerer Gene unterschiedlicher chromosomaler Lokalisation ausgegangen werden muss. Die Vererbung erfolgt also eher nach dem Muster von Diabetes mellitus oder Koronarer Herzkrankheit, indem viele Gene einen additiven Effekt auf die Krankheitsentstehung haben (Gottesmann,

1991). Je nach Anzahl der beteiligten Gene spricht man von oligogener (20-30 Gene) oder polygener Vererbung (>100 Gene). Entsprechend unterscheidet sich der Beitrag der einzelnen Gene zur Krankheitsentstehung. Der Ansatz der Genetiker geht nun weg von der einfachen Kopplungsanalyse hin zu Assoziationsstudien und zieht unterschiedliche genetische Mechanismen, die die Genexpression beeinflussen können, in Betracht (McGuffin et al., 1994). Darüber, dass genetische Faktoren eine unerlässliche Rolle als prädisponierende Faktoren spielen, sind sich alle Autoren einig. Umweltfaktoren tragen zusätzlich mehr oder weniger zur Krankheitsentstehung bei. Von einigen Untersuchern wird zwischen „sporadischer“ und „familiärer“ Form der Schizophrenie unterschieden, wobei erstere mehr, letztere weniger durch Umweltfaktoren bedingt sein soll.

1.3. Peristatische Faktoren

Unter den peristatische Faktoren, die dazu führen, dass bei genetischer Prädisposition die Schwelle zur Erkrankung überschritten wird, stehen auch Faktoren zur Diskussion, die die neuronale Entwicklung und Reifung des Gehirns bereits embryonal beeinflussen könnten.

Die oben genannten strukturellen Veränderungen des Gehirns sind mit einer Pathologie in der Gehirnentwicklung vereinbar. In Zwillingsstudien wurde festgestellt, dass der erkrankte monozygote Zwilling größere hirmorphologische Abweichungen als der gesunde Zwilling aufweist., wie z. B. größere Seitenventrikel (Reveley et al., 1982), MRT-Veränderungen (Casanova et al., 1990) oder Durchblutungsminderung im Frontalhirn (Berman et al., 1992). Auch haben Patienten mit nicht-familiärer Schizophrenie eher Strukturveränderungen als familiär schizophrene Patienten (Lyons et al., 1989; Vita et al., 1994). Somit sind diese Veränderungen auf den Einfluss von äußeren Faktoren zurückzuführen. Epidemiologische Untersuchungen haben niedriges Gewicht der Mutter bei Konzeption und Nahrungsmangel während des ersten Trimesters (Susser et al., 1996), sowie Influenza-Virusinfektionen während des zweiten Trimesters (Mednick et al., 1988; O’Callaghan et al., 1991; Sham et al., 1992) mit einem erhöhten Risiko für Schizophrenie assoziiert. Bemerkenswert ist dabei, dass vor allem das zweite Trimester in der Entwicklung des ZNS eine große Rolle spielt, gekennzeichnet durch kortikale neuronale Migration. O’Callaghan et al. (1992) und DeLisi et al. (1988) fanden häufiger Geburtskomplikationen bei Patienten mit familiärer Schizophrenie, Hollister et al. (1996) konnte ein dreifach höheres Risiko für Geburten mit Rhesus D Inkompatibilität nachweisen: Faktoren, die ebenfalls eine Schädigung des Gehirns zur Folge haben könnten. Weiterhin wurde ein Zusammenhang mit dem Aufwachsen in der Stadt, mit

älteren Geschwistern und in großen Haushalten auf kleinem Raum gefunden (Yolken und Torrey, 1995). Zahlreiche Studien zeigen einen um 5-8 % höheren Anteil von in Winter-/Frühlingsmonaten Geborenen unter Schizophrenen, sowohl auf der nördlichen als der südlichen Hemisphäre (Torrey et al., 1997). Dies könnte auf Infektionen, perinatalen Gehirnschaden aufgrund von Frühgeburtlichkeit oder Ernährungsmangel zurückzuführen sein - alles Ereignisse, deren Auftretenshäufigkeit sich mit der Jahreszeit ändert und die Einfluss auf die Entwicklung des zentralen Nervensystems haben könnten.

1.4. Immunologische Faktoren

1.4.1. Virushypothese

Zur Erklärung der eben aufgeführten epidemiologischen Beobachtungen sind (pränatale) Virusinfektionen mehrfach diskutiert worden (Mednick et al., 1988; Torrey und Kaufmann, 1986, Crow, 1994a, Murray et al., 1992; Yolken und Torrey, 1995; DeLisi, 1996; Stöber et al., 1997). **Virusinfektionen der Mutter während der Schwangerschaft** und deren Immunreaktion bzw. die Reaktionen des Feten werden als Ursache für eine pränatale Gehirnschädigung angesehen, die für die Entwicklung einer Schizophrenie prädisponieren soll. Allerdings führten verschiedene Studien, die anhand von Grippe-Epidemien den Zusammenhang zwischen Influenza der Schwangeren und Schizophrenie der Nachkommen untersuchten, zu unterschiedlichen Ergebnissen (Crow, 1994a).

Virusinfektionen bieten sich als Ursache aller chronischer Erkrankungen des zentralen Nervensystems unbekannter Ätiologie an. Zum einen sind Viren bekannt für Neurotropie und ihre Fähigkeit, in einen latenten Status mit periodischer Reaktivierung zu treten (z. B. DNA-Viren der Herpesvirus-Familie), zum anderen können sich virale Enzephalitiden mit Symptomen einer Schizophrenie präsentieren. So wird bei HIV (*Human Immunodeficiency Virus*) -Infektionen über initiale ZNS-Störungen berichtet, die einer Psychose ähneln (Jones et al., 1987). Schon Bleuler (1911) vermutete eine Verbindung zwischen infektiösen Prozessen und Schizophrenie, was durch das Auftreten von psychotischen Symptomen bei Enzephalitiden wie Neurosyphilis und der Encephalitis lethargica in den 1920er Jahren unterstützt wurde. Folglich könnten Virusinfektionen auch als **unmittelbare Auslöser** einer Schizophrenie eine Rolle spielen. Diese Hypothese wird gestützt von Beobachtungen während einer Influenza-Pandemie 1918 in Boston Mass (Menninger, 1926). Ein Drittel der an Influenza erkrankten Patienten, die während dieser Zeit in das Boston Psychopathic Hospital eingewiesen wurden, erhielten die Diagnose einer Schizophrenie, alle davon im

Alter von 18-30 Jahren. Die Psychose manifestierte sich mit Abklingen des Fiebers, bei einigen brachte die Virusinfektion eine latent vorbestehende Psychose zum Ausbruch.

Denkbar ist auch, dass die **Aktivierung latenter Virusinfektionen** für die Manifestation einer Schizophrenie verantwortlich gemacht werden kann (Waltrip et al., 1990). Viren aus der Gruppe der Herpesviren haben die Fähigkeit, im ZNS zu persistieren, ebenso wie das Masernvirus und auch das HI-Virus, ein Retrovirus, das sich zudem durch den Einbau ins Genom auszeichnet und so über Jahre inaktiv vorliegen kann. Die Aktivierung einer latenten Herpes Simplex Virusinfektion führt beispielsweise zu einer Enzephalitis, die im Anfangsstadium einer akuten Schizophrenie ähneln kann (Raskin und Frank, 1974). Die ZNS-Schädigung durch eine virale Infektion muss nicht unbedingt über zytopathische Effekte erfolgen, sondern auch eine subtilere Beeinträchtigung von Zellfunktionen, Störung von Neurotransmittern und Zytokinproduktion durch Viren ist denkbar (Oldstone, 1989). So könnten Virusproteine endogene Neurotransmitter nachahmen oder ZNS-Rezeptoren blockieren und dadurch zu einer Störung der ZNS-Funktion führen (Pert et al., 1988). Wie Yolken und Torrey (1995) in ihrer Übersichtsarbeit schreiben, beeinflussen einige Viren den Dopaminmetabolismus und zeigen verschiedene Neuroleptika antivirale Wirkungen *in vitro* und *in vivo*. Waltrip et al. (1990) vertreten die Theorie, dass eine Reaktivierung latenter ZNS-Viren, beispielsweise durch Stress, zu immunologischen Veränderungen, insbesondere zu einer gestörten Interferon (IFN) - α Regulation führt. Ein Exzess an IFN α soll je nach Ausmaß, Zeitpunkt und anatomischer Lokalisation die individuell unterschiedlichen Manifestationen der Schizophrenie verursachen. Interessant erscheint dabei, dass IFN α bekannt ist für ZNS-Exzitation und bei therapeutischer Gabe, z. B. zur Behandlung einer chronischen Virushepatitis oder von malignen Melanomen, als unerwünschte Wirkung psychotische Episoden und Persönlichkeitsveränderungen bis hin zum Suizid beobachtet werden (Schäfer et al., 1999; Heeringa et al., 1998). Für IFN α sind auch Opioid- und ACTH-ähnliche Wirkungen beschrieben (Blalock und Smith, 1980 und 1981). Beides sind Substanzen, die mit dem Dopaminsystem interagieren, was wiederum mit dem Dopamin-Modell der Schizophrenie in Einklang gebracht werden könnte (Schmauss und Emrich, 1985; Waltrip et al., 1990). Die (Re-)aktivierung einer Virusinfektion im ZNS könnte also ursächlich über eine erhöhte IFN α -Produktion das Neurotransmitter- und Hormonsystem des Gehirns beeinflussen.

Die Suche nach Hinweisen für stattgefundene Virusinfektionen erbrachte u. a. erhöhte Titer für Antikörper gegen die Herpesviren HSV-1 und Cytomegalievirus (CMV) im Liquor Betroffener (Libikova et al., 1979; Torrey et al., 1982; Kaufmann et al., 1983; Van Kammen

et al., 1984). Die Interpretation dieser Ergebnisse ist erschwert durch die Tatsache, dass Seropositivität für die untersuchten Viren beim Erwachsenen nicht Ausnahme, sondern die Regel ist. Auch Transmissionexperimente, d. h. Inokulation von Zellkulturen und Tieren mit - potentiell infektiösem - Liquor und Hirngewebe Schizophrener führte nicht zu konsistenten Ergebnissen, wenngleich Schwartz und Stevens (1988) in mehreren Passagen zellfreien Mediums auf einer neuronalen Zell-Linie denselben übertragbaren Effekt auf das Wachstum der Zellen beobachten konnten.

Ein direkter, sehr sensitiver Virusnachweis von Herpesviren, mehreren RNA-Viren und anderen neurotrophen Viren in Hirngewebe und Liquor Schizophrener mittels PCR (*Polymerase Chain Reaction*) -Technik wurde von Alexander et al. (1992), Sierra-Honigmann et al. (1995) und umfangreich zuletzt von Taller et al. (1996) versucht, führte jedoch jeweils zu negativem Ergebnis.

Es gibt zahlreiche weitere Untersuchungen bezüglich Veränderungen **immunologischer Parameter** bei Schizophrenen (Dahmen und Hiemke, 1997; De Beaurepaire et al., 1994). Der anfänglichen Beobachtung einer immunologischen Hyporeaktivität im Sinne einer geringeren kutanen Reaktion auf intradermal injizierte Antigene, wie Pertussis-Impfstoff (Vaughan et al., 1949) oder Histamin (Ermala und Autio, 1951) bei unbehandelten Schizophrenen folgten eine Fülle weiterer immunologischer Untersuchungen und Befunde. So wurde über atypische Lymphozyten berichtet, wie sie z. B. bei der Mononukleose und anderen Viruserkrankung gefunden werden (Fessel und Hirata-Hibi, 1963; Hirata-Hibi et al., 1982; Kokai et al., 1993) und über Veränderungen von Lymphozyten-Subpopulationen, reduzierter T-Zellzahl (Coffey et al., 1983), erhöhter Anzahl von B-Zellen und CD5-positiven B-Zellen (McAllister et al., 1989b), wobei die Ergebnisse nicht immer replizierbar waren (Ganguli und Rabin, 1993a). Hirata-Hibi et al. (1993) beschreiben den sogenannten „P-Lymphozyt“ als eine Lymphozytenform, die bei Schizophrenen und deren Angehörigen bis zu 60% der Population ausmachen soll.

Liquoruntersuchungen zeigten ein erhöhtes Gesamtprotein als Hinweis auf eine Blut-Hirn-Schrankenstörung, sowie unterschiedliche Befunde bzgl. Immunglobulinen im Liquor (Bruetsch et al., 1942; Kirch et al., 1985 und 1992; Hoechtlen-Vollmar und Müller, 1992). Mittels Elektrophorese wurden auch abnorme Proteinbanden gefunden, vergleichbar denen bei HSV-Enzephalitis, Multipler Sklerose und der Parkinsonschen Erkrankung (Ahokas et al., 1985; Harrington et al., 1985).

Zytokine spielen als Mediatoren der Immunantwort eine große Rolle bei Infektionen und immunologischen Vorgängen. Veränderte Konzentrationen von Interleukinen und Interferonen weisen auf ein infektiologisches oder immunologisches Geschehen hin und sind aus diesem Grund bei psychiatrischen Patienten intensiv untersucht worden. Für α -Interferon, Interleukin-2 (IL-2) und Interleukin 2-Rezeptoren existieren zahlreiche Studien (Villemain et al., 1989; Yolken und Torrey, 1995; Kirch, 1993). Während für ersteres die Befunde sehr auseinanderweichen, finden mehrere Gruppen eine erniedrigte IL-2 Produktion von Lymphozyten Schizophrener, manche im Zusammenhang mit dem Auftreten von Autoantikörpern (Libikova et al., 1979; Preble und Torrey, 1985; Villemain et al., 1989; Ganguli et al., 1992), sowie eine erhöhte Streubreite bzw. Erhöhung des IL-6 Spiegels (Shintani et al., 1991; Ganguli et al., 1994, Xu et al., 1994; Maes et al., 1995b). Daneben wird von einer Erhöhung löslicher IL-2 Rezeptoren (sIL-2R) im Serum berichtet (Rapaport et al., 1989 und 1993; Maes et al., 1995a; O'Donnell et al., 1996; Müller et al., 1997a). Im Liquor Schizophrener wurden von Kirch et al. (1985) verschiedene auffällige Parameter beschrieben, sowie erhöhte Werte für IL-2, die mit der Rückfall-Wahrscheinlichkeit positiv korrelieren (Licinio et al., 1993; McAllister et al., 1995). Alle diese erhobenen Befunde legen eine Beteiligung des Immunsystems in der Pathophysiologie der Schizophrenie nahe, ohne eine definitive Erklärung über den Zusammenhang zwischen Infektion und psychiatrischer Erkrankung geben zu können.

Ebenso wie die immunologischen Befunde, lässt sich auch die genetische Komponente der Schizophrenie mit der Virushypothese vereinbaren, da Virusinfektionen des ZNS ebenfalls durch genetische Faktoren ermöglicht bzw. erleichtert werden können. Als mögliche Mechanismen können genetische Determinanten von Rezeptoren, Immunantwort und zugrundeliegender Gewebspathologie in Betracht gezogen werden (Yolken und Torrey, 1995). Gründe für den ausbleibenden direkten Nachweis von Virusmaterial bzw. Infektionserregern könnten sein:

- Eine Infektion in utero oder perinatal, wobei der Erreger ca. 20 Jahre später bei Manifestation der Schizophrenie nicht mehr nachweisbar ist. Die Infektion könnte die Entwicklung beeinflussen oder auch einen Autoimmunprozess in Gang setzen.
- Die Infektion geschieht durch ein ubiquitär vorhandenes Virus oder durch unterschiedliche Viren, die jeweils bei entsprechender Disposition oder dem Vorhandensein kritischer Faktoren eine ungewöhnliche (immunologische) Reaktion des ZNS induzieren (Vgl.: Subakute Sclerosierende Panenzephalitis durch Masernvirus).

- Alternativ ist auch an synergistische Wirkung zweier Erreger zu denken bzw. an ein bislang noch unbekanntes und mit gängigen Methoden nicht erfassbares infektiöses Agens, wobei es sich z. B. um ein Retrovirus handeln könnte.
- Ein direkter Virusnachweis ist natürlich auch erschwert bei sehr geringer Konzentration bzw. ungleicher Verteilung im Gehirn.

1.4.2. Autoimmunhypothese

Die Vermutung, dass die Schizophrenie letztlich eine Ursache in einem Autoimmun-geschehen haben könnte, welchem seinerseits Virusinfektionen als Auslöser zugrunde liegen könnten, wird seit langem diskutiert (Wright et al., 1993; Kirch, 1993). DeLisi et al. (1985) unterstreichen die Rolle der Immunreaktion auf eine initiale Infektion, die letztlich in ein autoreaktives Geschehen gegen ZNS-Gewebe münden kann. Oben genannte immunologische Auffälligkeiten unterstützen die Annahme eines Autoimmun-geschehens, ebenso wie die Tatsache, dass es viele Parallelen zwischen der Schizophrenie und Erkrankungen aus dem Formenkreis der Autoimmunerkrankungen gibt. Dazu gehören die Erstmanifestation im jungen Erwachsenenalter, eine genetische Komponente und auch der chronisch-rezidivierende Verlauf ist beiden Erkrankungsformen gemeinsam. Einige Studien haben auch eine Assoziation des HLA (*Human Leukocyte Antigen*)-Systems mit dem Auftreten von Schizophrenie beschrieben (Müller et al., 1993a), unter anderem Goldin et al. (1987) für den HLA-A9 Locus und Wright et al. (1996) für HLA-DRB1. Für einige häufige Erkrankungen sind Assoziationen mit dem HLA-System bekannt, wie z. B. Diabetes mellitus, Multiple Sklerose und Ankylosierende Spondylitis. Diese Erkrankungen haben – ähnlich der Schizophrenie - die Tendenz familiär gehäuft aufzutreten ohne klassische Mendelsche Vererbung. Stevens (1988) führt die Parallelen von Epidemiologie und klinischem Verlauf von Schizophrenie und Multipler Sklerose auf, einer Erkrankung, die mit Infektionen und Autoimmunmechanismen in Verbindung gebracht wird. Darüberhinaus können Autoimmunerkrankungen selbst zu psychotischen Symptomen führen, womit gezeigt ist, dass Immunprozesse sehr wohl einen Einfluss auf ZNS-Funktionen haben. Für den Lupus erythematodes, die Sklerodermie, das Sjögren-Syndrom und das Antiphospholipidsyndrom wurden ZNS-Immunprozesse nachgewiesen (Krüger, 1984; Müller, 1997b; Raps et al., 1986; Kurtz und Müller, 1994).

Von Knight (1982) wurde versucht, die Autoimmunhypothese mit den Störungen des Neurotransmittersystems bei Schizophrenen in Einvernehmen zu bringen, indem er Auto-

Antikörper postulierte, die mit endogenen ZNS-Rezeptoren, z. B. Dopaminrezeptoren, interagieren. Es gibt mehrere Berichte über den Nachweis von antinukleären Antikörpern (ANA), Anticardiolipin-Antikörpern und insbesondere von Antikörpern gegen Hirngewebe bei Schizophrenen (DeLisi et al., 1985; Legros et al., 1985; Ganguli et al., 1987; Canoso et al., 1990). Heath et al. (1989) identifizierten einen IgG-Antikörper bei schizophrenen Patienten, der in der Septumregion des Gehirns bindet. Auch Antikörper gegen ein 60kDa *Heat-Shock* Protein wurden beschrieben (Kilidireas et al., 1992; Schwarz et al., 1998a).

Die Beobachtung, dass rheumatoide Arthritis, eine Autoimmunerkrankung, signifikant seltener bei Schizophrenen auftritt wurde von Eaton et al. (1992) gemacht und in verschiedenen Studien reproduziert. Inwieweit dies im Zusammenhang mit einer veränderten Immunsituation oder anderen peristatischen Faktoren zu sehen ist, sei dahingestellt. Zieht man eine Autoimmunpathogenese der Schizophrenie in Betracht, so muss das Vorliegen einer Immunaktivierung gefordert werden. Die zwei Haupt-Komponenten des Immunsystems sind dabei von Interesse, nämlich

- die **zelluläre** Komponente,
- die **humorale** Komponente in Form von Antikörpern und Zytokinen als Mediatoren der Immunantwort.

Über Antikörper und Zytokinbefunde, die auf eine Aktivierung des Immunsystems hinweisen, wurde bereits oben und im Rahmen der Virushypothese kurz gesprochen. Hier soll nochmals auf **Veränderungen des zellulären Immunsystems** eingegangen werden.

Bereits Anfang des 20. Jh. berichten Bruce und Peebles (1904) über erhöhte Leukozytenzahlen während der Akutphase der Erkrankung, ein Befund, der sich auch durch Stress oder Dehydratation erklären ließe. Hirata-Hibi et al. (1982 und 1993) finden aktivierte und morphologisch atypische Lymphozyten bei schizophrenen Patienten. Mit funktionellen Veränderungen befassten sich Studien von DeLisi et al. (1983) und Sasaki et al. (1994), die eine erniedrigte Aktivität von *Natural Killer* (NK) -Zellen bei akuter Exazerbation feststellen, wobei letzterer zudem eine Erhöhung des CD25-Antigens beschreibt, welches einem IL-2 Rezeptor entspricht und auf aktivierten T-Lymphozyten exprimiert wird. Veränderungen der Aktivität von NK-Zellen werden kontrovers diskutiert (McDaniel et al., 1992b; Ghosh und Chattopadhyay, 1993).

Weitere Studien beurteilen Lymphozyten-Subpopulationen und finden unter anderem eine Erhöhung der T-Zellzahl (Coffey et al., 1983) und der CD4-positiven T-Zellen (Müller et al., 1993a und b), eine Erniedrigung der B-Zellzahl (DeLisi et al., 1982) und eine veränderte

Ratio von Helfer-/ Suppressorzellen (Nyland et al., 1980; DeLisi et al., 1983; Müller et al., 1991). Besonders interessant sind die CD5-positiven B-Lymphozyten. Vor allem diese Subgruppe von B-Zellen wird mit Autoimmunität in Verbindung gebracht und ist fähig Auto-Antikörper zu bilden. Bei Schizophrenen wurde unabhängig von Neuroleptika-Medikation eine Vermehrung dieser Zellen beschrieben (McAllister et al., 1989a und b), die jedoch von anderen Autoren nicht bestätigt werden konnte (Villemain et al., 1989). Weiter wurde eine erniedrigte IL-2 Produktion stimulierter T-Lymphozyten, vergleichbar auch für den Lupus erythematodes beschrieben (Villemain et al., 1989). Von Sperner-Unterweger et al. (1989 und 1992) wurde die Neopterin-Exkretion als Parameter der T-Zellaktivität untersucht und eine Erhöhung unter medikamentöser Therapie gefunden. Auch kommt es unter Therapie zum Anstieg der Zahl der T-Helferzellen (Müller et al., 1993b).

Mit der Frage, wie man sich die Interaktionen zwischen Immunsystem und (zentralem) Nervensystem vorstellt, beschäftigt sich das Feld der Psychoneuroimmunologie. Am Beispiel der Stressreaktion soll darauf später näher eingegangen werden. Modelle der Fehlregulation im Stress-System lassen sich auf viele psychische Erkrankungen anwenden, eine ursächliche Beziehung zu erkennen ist Gegenstand von Grundlagenforschung und klinischen Untersuchungen.

1.5. Phänotypischer Ansatz

Obwohl die Diagnose der Schizophrenie klinisch anhand standardisierter Klassifikationen zuverlässig gestellt werden kann, handelt es sich doch um ein Krankheitsbild unterschiedlicher Ausprägung, das mehr oder weniger breit gefasst wird. Es wurden verschiedene Versuche einer differenzierten Einteilung anhand des Phänotyps unternommen, in der Hoffnung, dass diese den Rückschluss auf ätiologische Subgruppen ermöglichen (Cardno und Farmer, 1995).

Vor allem drei **Einteilungen in Subtypen** erscheinen interessant:

- positiv / negativ
- paranoid / nicht-paranoid
- familiär / sporadisch.

Die Subtypisierung anhand Crow's Typ I und II (1980 und 1985) orientiert sich am Auftreten **positiver und negativer Symptomatik**, wobei Typ I mit positiven Symptomen wie Wahn, Halluzinationen und Denkstörungen einhergeht. Das gute Ansprechen auf Neuroleptika weist

bei diesem Typ auf eine Störung im dopaminergen System hin. Typ II hingegen zeigt als negative Symptome Affektverflachung, Sprachverarmung, eventuell intellektuelle Beeinträchtigung und eine Assoziation mit strukturellen Veränderungen. Allerdings konnte diese Einteilung nicht aufrechterhalten werden, weshalb Crow (1985) einen „*mixed type*“, also ein Vorkommen beider Typen in einer Person postulierte, gleichwohl aber von derselben Ätiologie ausgehend. Eine feinere Abstufung der Typen unternahmen Andreasen und Olsen (1982), die für Positiv- und Negativsymptomatik je eine Punkteskala entwickelten (SAPS und SANS). Die positiven und negativen Syndrome stellen darin jeweils die Endpunkte der Skalen dar. Individuen, die auf beiden Skalen Punkte machen, werden als „gemischt“ betrachtet. Diese phänotypische Einteilung konnte von mehreren Untersuchern nachvollzogen werden.

Die klassische Subtypisierung in **paranoide und nicht-paranoide** Formen wurde bereits von Kraepelin (1896) durchgeführt. Hier soll erwähnt werden, dass es sich beim paranoiden Typ wohl um den stabilsten Typ der Schizophrenie handelt, charakterisiert durch ein Erkrankungsalter >25 Jahre, organisierte Wahnvorstellungen und Halluzinationen und ohne Affektveränderungen mit der besseren Prognose. Farmer et al. (1983) definierte in Cluster-Analysen chronisch Schizophrener einen hebephrenen „H“-Typ und paranoiden „P“-Typ, Subtypen, die ebenfalls an anderen Populationen bestätigt wurden. Durchgehend wird berichtet, dass Verwandte eines Patienten mit paranoider Schizophrenie ein niedrigeres Erkrankungsrisiko für alle Typen der Schizophrenie haben als Verwandte von nicht-paranoiden oder von hebephrenen Schizophrenen (McGuffin et al., 1987).

Die Unterscheidung von **sporadischer und familiärer** Form wurde bereits erwähnt und schlägt bei den familiären Fällen eine mehr genetische, bei den sporadischen Fällen eine mehr umweltbedingte Ätiologie vor (Murray et al., 1985). Auch hier konnten die Untergruppen in statistischen Multivariant-Analysen verschiedener Untersucher bestätigt werden, so finden z.B. Castle et al. (1994) einen „*neurodevelopmental*“ Typ A, einen „paranoiden“ Typ B und einen „schizoiden“, weniger gut definierten Typ C.

Trotz aller Anstrengungen klinische Subtypen zu definieren, bleibt weiterhin zu klären, ob diese wirklich qualitativ durch unterschiedliche ätiologische Faktoren bedingt sind, oder ob es sich vielmehr um Unterschiede allein auf klinisch-syndromaler Ebene handelt. Laut Cardno und Farmer (1995) sind die Unterschiede der Phänotypen quantitativ und mit homogener Ätiologie vereinbar im Rahmen eines „*Liability-Threshold*“ Modells, das auch von anderen Autoren vorgeschlagen wurde (Falconer, 1965; Reich et al., 1972). Dieses Modell postuliert,

dass die Schizophrenie aus multiplen genetischen und (unbekannten) Umweltfaktoren resultiert, die in der Bevölkerung gleichmäßig verteilt sind und der *Liability* (= dt. Empfänglichkeit, Neigung) entsprechen, wobei sich individuelle Einzelfaktoren addieren, bis eine gewisse Grenze (= *Threshold*) zur Manifestation der Erkrankung überschritten wird. Die Autoren schlagen eine größere *Liability* für nicht-paranoide Schizophrenie mit vorwiegend negativen Symptomen und / oder familiärer Form und eine geringere *Liability* für paranoide Schizophrenie mit positiver Symptomatik und / oder sporadischem Auftreten vor. In diesem Modell stellen demnach oben genannte phänotypischen Einteilungen in Wirklichkeit Subtypen eines Kontinuums dar (McGuffin et al., 1987; Abb.1).

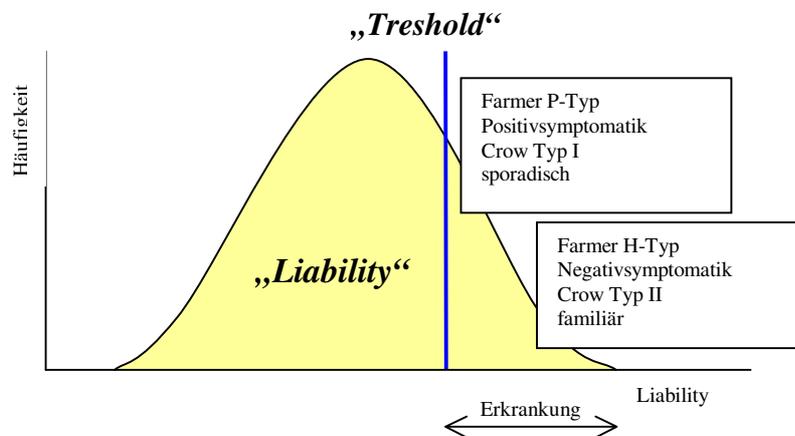


Abb. 1: „Liability-Threshold“ Modell der Schizophrenie (modifiziert aus McGuffin et al., 1987): Verteilung von genetisch und umweltbedingter Empfänglichkeit (=Liability) für die Schizophrenie in der Bevölkerung. Die verantwortlichen Faktoren addieren sich für jedes Individuum, bis eine bestimmte Grenze (=Threshold) überschritten wird und es zur Manifestation der Erkrankung kommt. Eingetragen sind phänotypischer Untergruppen, die mehr oder weniger hohe Positionen der „Liability“ – Skala für Schizophrenie einnehmen sollen.

Der Versuch, verschiedene Ansätze und Modelle zusammenzuführen, könnte zu einer „natürlichen“ Klassifizierung führen, die zur Klärung der Ätiologie der Schizophrenie beitragen würde und für die zukünftige Behandlung und Prognose dieser Erkrankung Bedeutung hätte.

2. Psychoneuroimmunologie (PNI)

2.1. Hintergrund der PNI

Es ist allgemein bekannt, dass sich Körper und Psyche gegenseitig beeinflussen und nicht unabhängig voneinander betrachtet werden können. Viele körperliche Erkrankungen haben psychische Ursache, womit sich die Psychosomatik beschäftigt, und umgekehrt wirkt sich auch das körperliche Wohlbefinden auf den psychischen Zustand aus. Das Gebiet der Psychoneuroimmunologie erforscht das Zusammenspiel von Körper und Psyche, wobei das (neuro-)endokrine System und das Immunsystem als Kommunikationspartner beider Seiten betrachtet werden (Henning, 1998). Bis vor wenigen Jahren war über die biochemischen Voraussetzungen dieser Interaktionen noch wenig bekannt. Dem Immunsystem stehen zelluläre und humorale Einheiten zur Verfügung, die als Abwehrsystem mit dem Pathogen interagieren. Dabei wird die Immunreaktion selbst durch eine Reihe von *Feedback*-Mechanismen reguliert, kann aber auch durch endokrine und zentralnervöse Vorgänge moduliert werden (Schedlowski, 1994). Allen drei Systemen gemeinsam ist die Fähigkeit zur Kommunikation über weite Distanzen, wobei über chemische Botenstoffe Signale übermittelt werden. Es bestehen auch anatomische Verbindungen zwischen Nerven- und Immunsystem. Ein Beispiel hierfür ist die afferente sympathische Innervation der meisten lymphatischen Organe. Auch auf zellulärer Ebene findet eine Interaktion der Systeme statt. So tragen Lymphozyten beispielsweise Bindungsstellen für Adrenocorticotropes Hormon (ACTH), Monoamine und Neuropeptide, darunter vor allem für Opiate. Diese Rezeptoren weisen auf einen Einfluss des Hormon- und Nervensystems auf die Immunfunktion hin (Abb. 2). Auf der anderen Seite können Immunmodulatoren wie IL-1 die Hypothalamus-Hypophysenachse beeinflussen und den zentralen Metabolismus von Noradrenalin und Serotonin stimulieren (Galinowski et al., 1992).

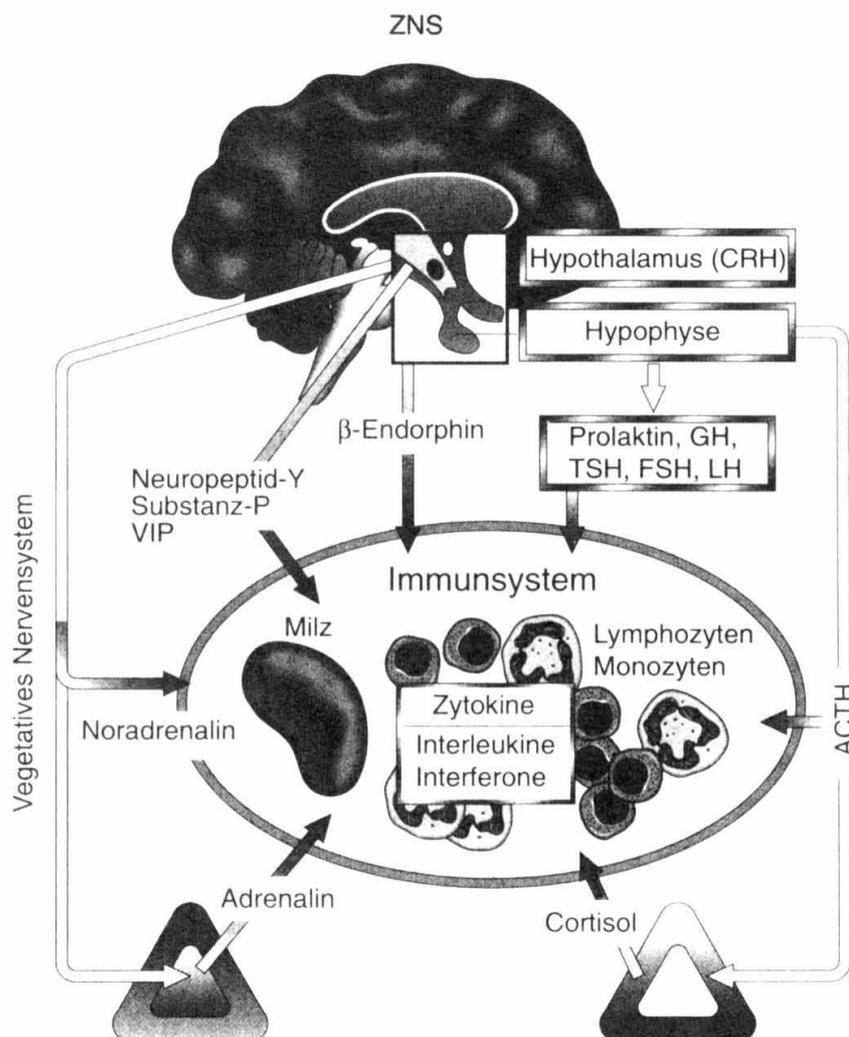


Abb. 2: Schematische Darstellung der Interaktion zwischen Neuroendokrinem- und Immunsystem.

(aus Schedlowski, 1996)

ACTH = Adrenocorticothropes Hormon, CRH = *Corticotropin-Releasing* Hormon, VIP = Vasoaktives Intestinales Peptid, GH = *Growth Hormone*, TSH = Thyroidea-Stimulierendes Hormon (Thyreotropin), FSH = Follikel-Stimulierendes Hormon, LH = Luteinisierendes Hormon.

Im Hinblick auf die Vorstellung, dass für die Pathogenese psychischer Erkrankungen – hier insbesondere der Schizophrenie – Fehlregulationen des Immunsystems im Sinne einer Autoimmunreaktion von Bedeutung sein könnten, ist es besonders interessant, die Verknüpfung von Immunsystem und ZNS zu untersuchen. Im Folgenden wird die Stressreaktion als klassisches Beispiel für neuroendokrine Wirkungen auf das Immunsystem und das Zytokin-Netzwerk des Gehirns mit seinen neuro-immunologischen Implikationen genauer beschrieben. Zuvor soll ein kurzer Überblick über Aufbau, Reifung und Funktion des zellulären Immunsystems gegeben werden.

2.3. Das zelluläre Immunsystem

Träger des zellulären Immunsystems sind Zellen der lymphatischen Reihe, die in ihrer Entwicklung verschiedene Reifungsprozesse durchlaufen und für die spezifische Immunantwort verantwortlich sind. Daneben finden sich phagozytierende Granulozyten und Monozyten / Makrophagen als primäres Abwehrsystem, die der myeloischen Reihe entstammen. Beide erfüllen ihre Aufgabe in der Abwehr von Krankheitserregern und potentiell schädlichen Stoffen im Zusammenspiel mit dem Komplementsystem, Zytokinen und Interleukinen.

Lymphozyten erhalten in den primären immunologischen Organen ihre **Prägung**, wodurch sie befähigt sind, „fremd“ von „selbst“ zu unterscheiden und eine Toleranz gegenüber eigenen Antigenen entwickeln. Für die T-Lymphozyten geschieht dies im Thymus und für die B-Lymphozyten bereits im Knochenmark („Bursa“-Äquivalent bei Vögeln). Alle Lymphozyten besitzen spezifische Rezeptoren an ihrer Oberfläche, um Antigene zu erkennen. T-Zellen entwickeln sich im Thymus in mehreren Phasen in denen die Expression von T-Zell Rezeptor und Korezeptoren modifiziert wird. Nach erfolgter Selektion wird am Ende eine reife Lymphozytenpopulation in die Peripherie entlassen, die selbstrestringiert spezifisch auf fremde Antigene reagieren kann. Die reifen T-lymphozytären Subpopulationen sind unter anderem T-Helfer und zytotoxische T-Zellen, die eine regulatorische Wirkung auf die Immunantwort haben indem sie Zytokine wie IL-2 und Interferon γ freisetzen. Zytotoxische T-Zellen sind für die Elimination von Tumorzellen und virusinfizierten Zellen zuständig (siehe unten).

Von Bedeutung für die Prozessierung und Präsentation von Antigenen ist der **Major Histocompatibility Complex (MHC)**, dessen Moleküle sich auf der Oberfläche jeder Körperzelle befinden. Der kodierende Genkomplex auf Chromosom 6 ist hochpolymorph und wird beim Menschen als HLA (*human leucocyte antigen*)-System bezeichnet. Dabei gibt es getrennte Regionen für MHC-Klasse-I und -II Moleküle, die jeweils drei Hauptgene kodieren. Dies sind HLA-A, -B und -C für MHC-I und HLA-DP, -DQ und -DR für MHC-II. Moleküle der MHC-Klasse I werden Peptidfragmente aus dem Zytosol der infizierten Zellen gezeigt (z. B. Viruspartikel) und über MHC-II Moleküle Peptide fremder Mikroorganismen nach komplexer intrazellulärer Prozessierung, das heißt Schneiden und Transport an die Zelloberfläche. MHC-II wird nur auf professionell antigenpräsentierenden Zellen (=APC) wie Makrophagen und B-Lymphozyten exprimiert. Es besteht die Vermutung, dass die genetische Prädisposition für Autoimmunerkrankungen mit der Art und Weise der Antigenbearbeitung

und -präsentation zusammenhängt. Schon vor 25 Jahren wurde entdeckt, dass die Spondylitis ankylosans mit HLA-B27 assoziiert ist. Mittlerweile hat man festgestellt, dass fast alle Autoimmunerkrankungen mit bestimmten HLA-Typen assoziiert sind, wobei unterschiedliche Typen eine Rolle spielen. Dieser Zusammenhang erscheint sinnvoll, da an allen Autoimmunerkrankungen T-Zellen beteiligt sind und deren Fähigkeit, auf ein bestimmtes Antigen zu reagieren vom MHC-Typ abhängt.

B-Lymphozyten internalisieren die an ihre Oberflächenrezeptoren gebundenen Antigene und produzieren dann spezifisch gegen diese gerichtete Antikörper. Dabei stellt ein B-Lymphozyt jeweils Antikörper einer der fünf möglichen Immunglobulin (Ig)-Klassen her. Primär sind dies IgM-Antikörper, die Antigen-Antikörper-Komplexe bilden und die Elimination des so gebundenen Antigens erleichtern. Später werden IgG-Antikörper hergestellt, welche über einen langen Zeitraum zur Abwehr des spezifischen Antigens dienen können. Die Infektionsabwehr führt über die Bindung der Antikörper an das jeweilige Pathogen zur Neutralisierung, Opsonierung mit folgender Phagozytose oder Aktivierung des Komplementsystems mit Bakteriolyse. Ist die akute Auseinandersetzung mit dem Pathogen vorüber, werden einige B-Lymphozyten zu Gedächtniszellen (*memory-cells*), die bei erneutem Kontakt mit demselben Antigen innerhalb kürzester Zeit die entsprechenden IgG-Antikörper ausschütten können. T-Lymphozyten steuern die B-Zell Differenzierung, den Wechsel der Produktion von einem Ig-Isotyp zum anderen und das Entstehen von B-Gedächtniszellen über selektive Aktivierung und Zytokinabgabe.

Die unterschiedlichen Lymphozyten-Subpopulationen lassen sich in der Durchflusszytometrie durch monoklonale Antikörper gegen ihre jeweiligen **Oberflächenantigene** bestimmen. Diese „*Cluster of Differentiation*“ (CD)-Moleküle sind charakteristisch für die jeweiligen Subtypen und deren Funktionen. Die unterschiedlichen Stadien, die Lymphozyten während ihrer Reifung durchlaufen, spiegeln sich in der Expression bestimmter CD-Moleküle wider. Für die T-Zelle sind dies die Moleküle CD3, CD4, CD8 und T-Zell Rezeptoren. Die Vorläuferzellen aus dem Knochenmark exprimieren keines dieser Moleküle bis zu ihrer Aktivierung im Thymus. Dort treten sie in verschiedene Reifungsphasen ein mit Koexpression von CD4 und CD8 bis schließlich „einfach positive“ CD4- oder CD8-tragende Zellen in die Peripherie exportiert werden. Gleichzeitig erfolgen Umordnungen des T-Zell Rezeptors (TCR). Eine geringe Anzahl von „doppelt negativen“ T-Zellen bildet den γ/δ -TCR. In der Regel tragen reife T-Lymphozyten allerdings den α/β -TCR.

Eine Übersicht über wichtige Oberflächenmoleküle, die häufig auch in psychoneuroimmunologischen Untersuchungen eingesetzt werden, und deren Träger gibt Tabelle 1.

CD-Antigen	Expression auf	Funktion
CD2	T- und NK-Zellen	Adhäsionsmolekül, vermittelt Aktivierung
CD3	Alle T-Zellen	Assoziiert mit T-Zellrezeptor, Signalvermittlung
CD4	T-Helferzellen	Korezeptor für MHC-II
CD8	Zytotoxische / T-Suppressorzellen, gering auf NK-Zellen	Korezeptor für MHC-I
CD16	NK-Zellen, Neutrophile, Monozyten	Fc-Rezeptor, vermittelt Phagozytose
CD19	Alle B-Zellen	Korezeptor für B-Zellen
CD20	B-Zellen ab dem Prä-B-Stadium	Regulation der Aktivierung
CD25	T- und B-Zellen, Monozyten	IL-2 Rezeptor (α -Kette), Zellaktivierung
CD40	B-Zellen, Monozyten	Interaktion mit T-Zellen
CD45RA	Untergruppen von T- und B-Zellen, Granulozyten, Monozyten	Naive T-Zellen
CD45RO	Aktivierte T-Gedächtniszellen, B-Zellen, Granulozyten, Monozyten	Erleichterte T-Zellbindung, erhöhte Sensibilität
CD56	NK-Zellen	Adhäsionsmolekül (NCAM-Isoform)
CD58	hämatopoetische und nicht-hämatopoetische Zellen	= <i>leukocyte function-associated antigen-3</i> (LFA-3), Adhäsionsmolekül, bindet CD2
HLA-DR	B-Zellen, aktivierte T-Z., Monozyten, Makrophagen	MHC-II Antigen

Tab. 1: „Cluster of differentiation“ (CD)-Moleküle und ihre jeweilige Expression auf lymphatischen Zellen.

Die **T-Zellantwort** erfolgt streng MHC-restringiert, wobei CD8-positive Zellen nur mit MHC-I und CD4-positive Zellen mit MHC-II interagieren. Entscheidend für eine T-Zell Aktivierung ist die Interaktion zwischen dem T-Zellrezeptor und dem Peptid auf dem MHC-Molekül einer APC. Zusätzlich müssen weitere kostimulierende Oberflächenmoleküle, wie z. B. CD28 der T-Zelle und der B7-Rezeptor der APC interagieren. Fehlt diese kostimulierende

Bindung, führt dies zu Anergie oder Apoptose der T-Zelle, wie dies der Fall wäre beim Kontakt mit einer nicht professionell antigenpräsentierenden Zelle (Abb. 3).

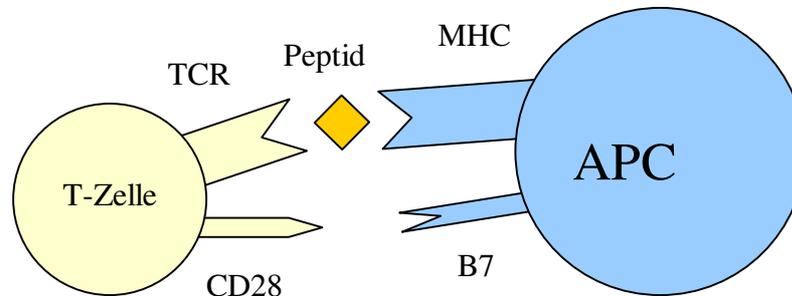


Abb. 3: Aktivierung einer T-Zelle: Die Antigen-präsentierende Zelle (APC) zeigt auf ihrem MHC-Rezeptor das prozessierte Antigen und geht eine Bindung mit dem T-Zell Rezeptor (TCR) ein. Die Aktivierung erfolgt nur bei gleichzeitiger Bindung von B7 und CD28 als zweites Signal.

Bei erfolgreicher Bindung wird eine naive T-Zelle aktiviert. Sie produziert IL-2, das dann die Proliferation und Differenzierung zur T-Effektorzelle steuert. Alle Effektorzellen können nunmehr auf das entsprechende Antigen in Verbindung mit MHC reagieren, ohne dass eine Kostimulation vorliegen muss. Das bedeutet, dass nun alle infizierten Zellen unmittelbar bekämpft werden können. Im Falle der Aktivierung eines CD8-positiven Lymphozyten über MHC-I wird dieser zur cytotoxischen T-Zelle, die gezielt virusinfizierte Zellen abtöten kann. Die Funktion der CD4-positiven T-Helferzellen (Th) liegt in der Regulation und Unterstützung der Immunreaktion durch Zytokine. Wichtig ist die Unterscheidung zwischen Th1 und Th2-Zellen, wobei erstere vor allem Interferon γ , IL-2 und Tumornekrosefaktor (TNF)- β ausschütten und proinflammatorische Wirkung haben (inflammatorische CD4-T-Zellen). Diese Zellen leiten eine zelluläre Immunantwort ein und aktivieren Makrophagen. Die eigentlichen CD4-Helferzellen Th2 hingegen produzieren vor allem IL-4, -5 und -10 und triggern die humorale Immunantwort indem sie B-Zellen zur Antikörperproduktion anregen. Die Differenzierung zu einem der beiden Phänotypen hängt unter anderem von der Dichte der Liganden, die bei der ersten Stimulation präsentiert werden, ab. Eine geringe Antigenpräsentation reicht aus, dass die Entwicklung zu Th2-Zellen erfolgt und es zur raschen Antikörperproduktion und Abwehr extrazellulärer Erreger kommt. Zur Stimulation von Th1-Zellen für die Abwehr intrazellulärer Erreger, die sich relativ langsam vermehren, muss eine

höhere Antigenschwelle überschritten werden. Die beiden Zellarten regulieren sich und damit die Immunantwort gegenseitig über *Feedback*-Mechanismen (Abb. 4).

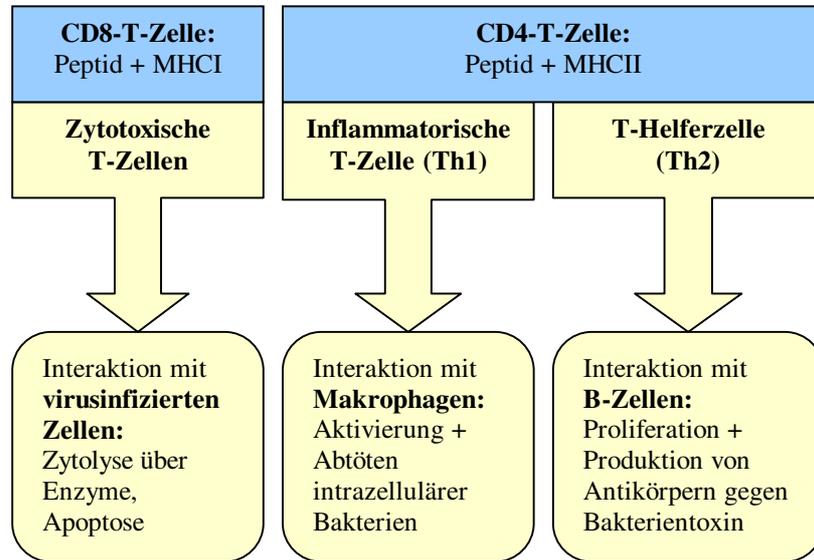


Abb. 4: Die drei Arten von Effektorzellen werden von Peptid / MHC-Komplexen aktiviert und führen letztlich zu unterschiedlichen Abwehrmechanismen (nach Janeway und Travers, 1995).

Um die Reaktivität von Lymphozyten zu bestimmen werden in Studien oft Mitogene verwendet, die die Teilung dieser Zellen aktivieren. Dies sind z. B. Phytohämagglutinin (PHA) für T-Zellen und *Pokeweed Mitogen* (PWM) für B-Zellen. Auch die Menge der produzierten Zytokine, insbesondere IL-1, IL-2 und Interferon γ , wird zur Beurteilung der Immunaktivität herangezogen.

Autoimmunreaktionen werden durch Fehlregulationen im spezifischen, v. a. zellulären Immunsystem hervorgerufen. Immunkompetente Zellen sind normalerweise in der Lage „selbst“ zu erkennen. Während der Ontogenese setzt sich das Immunsystem mit den eigenen Strukturen auseinander, wobei jedoch einige isoliert bleiben und nicht direkt in Kontakt mit dem Immunsystem treten können. Dies sind z. B. Auge, Gehirn, Gonaden und der schwangere Uterus / Placenta. Potentiell autoaggressive Lymphozyten werden meist im Thymus ausgefiltert und durch die Auslösung von programmiertem Zelltod (=Apoptose) eliminiert. Einige wenige dieser Lymphozyten gelangen in das periphere lymphatische Gewebe, wo sie in der Regel stumm bleiben. Kommt es jedoch zum Kontakt mit einem Selbst-Antigen, das von einer APC präsentiert wird, wird eine Immunreaktion ausgelöst. Eine Aktivierung dieser

Zellen führt zu deren Proliferation und Differenzierung mit folgender Inflammation des betroffenen Gewebes. Auch Antigene, die den eigenen strukturell ähnlich sind, können eine entsprechende Reaktion verursachen, da sie zu verschieden sind, um toleriert zu werden und doch nicht verschieden genug, um eine wirkliche Immunität zu induzieren. So gibt es beispielsweise ein Maus-Modell für eine Autoimmun-Keratitis, die durch einen Hüllproteinanteil des Herpes simplex Virus hervorgerufen wird, der einem Epitop des Keratinmoleküls ähnlich ist (Zhao et al., 1998).

CD4-T-Zellen spielen auch eine Rolle bei Autoimmunerkrankungen und sind dort oft prädominant. Die hohe Produktion von Autoantikörpern, die bei den meisten Autoimmunerkrankungen gesehen wird, benötigt die Stimulation durch T-Helferzellen. So sind beispielsweise beim systemischen Lupus erythematodes chronisch stimulierte B-Zellen vorhanden. Dies weist darauf hin, dass spezifische autoreaktive T-Helferzellen Peptidstrukturen in Autoantigenen erkennen und folglich die Produktion von Autoantikörpern unterhalten. Bei der rheumatoiden Arthritis erkennen inflammatorische CD4-T-Zellen Gelenk-Antigene und führen zur destruktiven Entzündungsreaktion. Um derartige Immunreaktionen zu stoppen werden therapeutische Versuche mit monoklonalen Antikörpern gegen T-Helferzellen unternommen (Tyndall, 2000). Interessant ist auch die Beobachtung, dass Autoimmunerkrankungen oft durch unspezifische Infektionen, beispielsweise grippale Infekte, ausgelöst werden. Erklärbar wäre dies durch die erhöhte Dichte von Peptid-beladenen MHC-Molekülen, so dass die Aktivierung von T-Zellen durch eine größere Anzahl von „Treffern“ auf den TCR erleichtert wird.

Die Differenzierung und Proliferation der Effektorzellen geschieht im lymphatischen Gewebe, das diese anschließend verlassen und über die Blutbahn an den Ort der Infektion wandern. Hierbei spielt die zusätzliche Expression von **Adhäsionsmolekülen** eine Rolle. Ruhende, naive T-Zellen exprimieren den Rezeptor L-Selektin, der sie in den Lymphknoten leitet (sogenannter *homing*-Rezeptor) und relativ wenig Adhäsionsmoleküle CD2, LFA-1 (*lymphocyte function-associated antigen-1* oder CD11a) und CD45RA. Nach Aktivierung wird vermehrt CD2 und LFA-1 exprimiert, welches die Bindungsfähigkeit der T-Lymphozyten an die infizierten Zielzellen erhöht. Die Expression von L-Selektin stoppt und es kommt zur Bildung des Integrins VLA-4 (*very late antigen-4*) als *homing*-Rezeptor für vaskuläres Endothel am Entzündungsort. Außerdem wandelt sich die hochmolekulare Isoform des CD45-Moleküls CD45RA, das sich auf naiven T-Zellen findet, durch alternatives Spleißen in die CD45RO-Isoform, die sich mit dem TCR und CD4 an der Zelloberfläche verbindet. Dadurch wird die Stimulierung der T-Zelle durch geringe Mengen von Peptid /

MHC-Komplexen erleichtert. Einige dieser so entstandenen Zellen verhalten sich nicht wie Effektorzellen, sondern produzieren IL-2, reagieren auf Antigenkontakt mit klonaler Expansion und zeigen erst dann die Eigenschaften einer Th1/2-Zelle. Diese Zellen werden als CD4-T-Gedächtniszellen bezeichnet. Sie haben ein verändertes Muster an exprimierten Oberflächenmolekülen - ähnlich den aktivierten T-Effektorzellen - darunter eine 30x höhere CD45RO- und 10x höhere CD58 (= LFA-3)-Expression als naive T-Zellen.

Wie oben bereits erwähnt, erfolgt die Reifung der B-Zellen im Knochenmark, von wo aus sie noch als „naive“ B-Zellen mit selbsttoleranten Rezeptoren ausgestattet in der Peripherie zirkulieren. Erfolgt kein Kontakt mit einem Antigen, sind B-Zellen kurzlebig und werden rasch durch neue B-Zellen aus dem Knochenmark ausgetauscht. Etwa die Hälfte des zirkulierenden B-Zell Pools besteht aus langlebigen B-Zellen, die die Gedächtniszellen umfassen. Eine Gruppe von B-Zellen mit sehr speziellen Eigenschaften sind die **CD5-positiven B-Zellen**. Diese entstehen in einer frühen Phase der Ontogenese, vermutlich pränatal aus einer unreifen Stammzelle und haben die Fähigkeit zur Selbsterneuerung. Neben dem CD5-Molekül exprimieren diese Zellen IgM an ihrer Oberfläche. CD5 kann CD72, ein weiteres B-Zell Molekül, binden und begünstigt eine B-Zell Interaktion, über deren nähere Bedeutung noch wenig bekannt ist. Die CD5-B-Zellen bilden die größte Population in der Bauchhöhle und produzieren einen Großteil der Immunglobuline im Normalserum, sind jedoch kaum an der adaptiven Immunantwort beteiligt. Die Rezeptoren und damit die Antikörper dieser Zellen sind wesentlich weniger vielfältig als die der konventionellen B-Zellen und zeichnen sich durch Polyspezifität aus, das heißt, sie können mehrere Liganden binden, bevorzugt bakterielle Polysaccharide. Die Antikörperantwort erfolgt T-Zell unabhängig. Ihre Eigenschaft der Selbstreplikation macht sie zur Quelle von Tumorzellen bei der chronisch lymphatischen Leukämie.

Es besteht eine große Ähnlichkeit zwischen diesen und den **γ/δ -T-Zellen**. Auch deren genaue Funktion ist noch unklar. Sie haben ebenfalls eine geringe Rezeptorvielfalt und nicht die Fähigkeit eines immunologischen Gedächtnisses. T-Zellen mit γ/δ -TCR befinden sich an Epithelien von Körperoberflächen, wo sie infizierte Zellen erkennen und abtöten. Vermutlich reagieren sie dabei auf Veränderungen der infizierten Zelle selbst oder auf ausgeschüttete Stress- oder Hitzeschockproteine. Die Reaktion beider Zelltypen ist also von geringer Spezifität und dient am ehesten der ersten Abwehr bis die adaptative Antwort greift. Zusätzlich scheinen sie bei bestimmten Krankheitserregern, z. B. Mykobakterien, eine besondere Rolle zu spielen. Möglicherweise handelt es sich um eine evolutionäre Übergangsform in der Entwicklung der adaptiven Immunreaktion.

Eine weitere Zellart des Immunsystems, die relativ selbständig Funktionen in der Abwehr übernimmt, sind die **Natürlichen Killer (NK)-Zellen**, die aus der lymphoiden Reihe kommen, ca. 12-15% der peripheren Lymphozyten ausmachen und über deren Entwicklung wenig bekannt ist. Sie haben ihre Bedeutung in der frühen Phase einer Infektion durch intrazelluläre Krankheitserreger, insbesondere Herpesviren und Listerien. NK-Zellen erkennen infizierte Zellen vermutlich an einer Konformationsänderung oder geringeren Expression von MHC-I Molekülen, wie dies bei virusinfizierten Zellen der Fall ist, und vernichten diese. Ihre Aktivität erhöht sich bei Anwesenheit von verschiedenen Zytokinen, wobei IL-12 und TNF- α die Produktion großer Mengen an Interferon γ auslösen.

(siehe auch: Janeway und Travers, 1995; Abbas et al., 2000)

2.3. Die Stressreaktion

Schon Anfang dieses Jahrhunderts erkannte man den Zusammenhang zwischen Adrenalininjektionen und einer Erhöhung der Lymphozytenzahl im peripheren Blut, die damals über die sympathische Innervation und Kontraktion der Milz mit mechanischer Lymphozytenausschüttung erklärt wurde (Frey und Tonietti, 1925). Es folgten verschiedene Untersuchungen, die einen Anstieg von Lympho- und Leukozytenzahlen in unterschiedlichsten Stress-Situationen fanden. Stress resultiert aus der Konfrontation des Organismus mit psychischen und physischen Belastungen. Ausgangspunkt der Überlegungen ist die „Cannonsche Notfallreaktion“ (Cannon, 1932): Der Körper reagiert bei akuter Bedrohung mit der Erregung des sympathischen Nervensystems und Hemmung des parasympathischen Systems. Dieses Reaktionsmuster wird vor allem durch die Katecholamine Adrenalin und auch Noradrenalin als Neurotransmitter in Gang gesetzt. Das ursprüngliche Ziel der Reaktion ist die Einstellung des Körpers auf Kampf oder Flucht, also „*fight or flight*“, in Sekundenschnelle. Nach einigen Minuten erst erfolgt die Aktivierung der klassischen Kaskade mit der Ausschüttung von neuroendokrinen Hormonen. Angeregt von Noradrenalin aus Nervenzellen des hinteren Stammhirns (blauer Kern: *Locus coeruleus*) schütten hypothalamische Zentren (v.a. paraventriculärer Kern) CRH aus, dieses regt die Produktion von Corticotropin (ACTH) in der Hypophyse an, welches seinerseits über den Blutkreislauf in der Nebennierenrinde zur Ausschüttung von Cortisol führt. Daneben werden auch in unterschiedlichem Ausmaß andere (Hypophysen-) Hormone sezerniert, die eine noch unklare Rolle im Stressgeschehen spielen. Cortisol ist für eine Vielzahl physiologischer Veränderungen verantwortlich (z. B. Glucosebereitstellung) und nimmt Einfluss auf

immunologische Prozesse im Sinne einer Immunsuppression. Ein Großteil der Effekte ist dabei auf die Hemmung der Zytokinproduktion zurückzuführen.

Für die längerfristige Adaptation des Organismus an Dauerstress beschreibt Selye (1956) das „Allgemeine Adaptationssyndrom“, das über drei Phasen verläuft und durch die Trias der Nebennierenrindenhypertrophie, Atrophie lymphatischer Organe und Entwicklung von Magengeschwüren gekennzeichnet ist. Die anfängliche Alarmphase wird von der Widerstandsphase gefolgt, in der sich der Organismus an die Anforderung adaptiert und endet schließlich in der irreversiblen Erschöpfungsphase. Das biochemische Stressmodell auf der Ebene von sympathiko-adrenalem System und HPA-Achse (*Hypothalamus-Pituitary gland* (dt. Hypophyse)-*Adrenal gland* (dt. Nebenniere); Abb. 5) steht vereinfachend für eine weit komplexere Interaktion und die Reaktion einer großen Zahl neuroendokriner Transmittersubstanzen und deren modulierende Wirkung auf immunologische Funktionen (Brown, 1994; Calabrese et al., 1987).

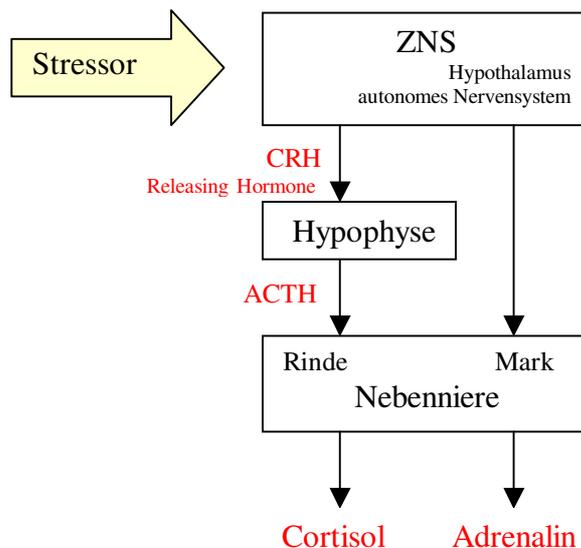


Abb. 5: Endokrine Stressreaktion: Gesteigerte Sympathikusaktivität und Ausschüttung von Adrenalin durch das Nebennierenmark als schnelle Stressantwort. Nach ca. 10min führt die Aktivierung der HPA-Achse zur Freisetzung von Cortisol.

Berücksichtigung finden müssen ebenso psychologische Abläufe, der kognitive Umgang mit Stress und die Mechanismen des Einzelnen zur Verarbeitung und Stress-Bewältigung. Bei erfolgreicher Bewältigung wird die generelle Aktivierung reduziert, im anderen Fall kommt es eventuell zu tonischer Aktivierung mit Konsequenzen für die Gesundheit und dem Entstehen psychosomatischer Erkrankungen (Levine und Ursin, 1991). Der Sinn des ganzen

Prozesses liegt demnach in der Anpassung der psychophysischen Ressourcen des Individuums an Umwelthanforderungen. Bei der Depression beispielsweise wird eine chronische Aktivierung des Stress-Systems im Gehirn postuliert mit nachfolgender Kaskade über CRH, ACTH und ständiger Cortisolfreisetzung aus der Nebennierenrinde (Chrousos und Gold, 1992). Normalerweise erfolgt ein negatives *Feedback* über Glukokortikoid-Rezeptoren im Gehirn. Diese Drosselung soll bei Depressiven gestört sein. Zentrale Schaltstelle sind CRH-produzierende und noradrenerge Nervenzellen, die sich gegenseitig beeinflussen und auf verschiedene Neurotransmitter und Peptidmodulatoren reagieren. Man stellt sich vor, dass antidepressive Medikamente über die Neurotransmitter die Steuerung des Stress-Systems beeinflussen. Aufgaben des Stress-Systems im Gehirn sind unter anderem die Bestimmung des allgemeinen Erregungsniveaus und die emotionale Färbung des Erlebten. Anatomisch bestehen Verbindungen von Hypothalamus und Stammhirn zum Großhirn, auch über dopaminerge Neuronen, die Fasern ins mesolimbische System entsenden, welches wiederum Motivation-Belohnungs-Verstärkungsverhalten steuert. Die Verbindungen zwischen CRH-Neuronen und Hippocampus mit Amygdala sind wichtig für das Erinnern und die emotionale Analyse von Informationen, die sich auf die stressauslösenden Umwelt Ereignisse beziehen. Eine Fehlregulation im Stress-System ließe sich auch auf andere psychische Erkrankungen anwenden, wobei die ursächliche Beziehung zwischen Psychose und gestörter Stressreaktion noch ergründet werden muss (Gershon und Rieder, 1993).

Die Auswirkungen von Stress auf die Immunfunktion sind komplex und erstrecken sich vor allem auf die zelluläre Komponente des Immunsystems. Ursächlich sind vor allem neuroendokrine Parameter für diese Veränderungen verantwortlich. So berichtet Schedlowski (1994) in einer Studie, die Probanden nach Fallschirmabsprung als akutem Stressor untersucht, von einem signifikanten Anstieg der T-Zellen und der Expression von Aktivitätsmarkern, der Erhöhung der NK-Zellzahl und deren Aktivität, sowie dem Abfall unter die Ausgangswerte zwei Stunden nach Exposition. Es wurde festgestellt, dass insbesondere Katecholamine die zelluläre Immunfunktion beeinflussen, speziell die NK-Zellen und deren Aktivität. Auch andere Studien finden nach belastenden Lebensereignissen, chronischer Stressexposition oder depressiver Symptomatik immer wieder niedrige CD4-, CD8- und NK-Zellzahlen bzw. eine reduzierte Zellproliferation (Schedlowski, 1994).

Eine noch weitgehend unbekannt Rolle in der Stressantwort tragen die Neuropeptide. Es wurde gefunden, dass Neuropeptide, die in Gehirn und Hypophyse als Signalüberträger fungieren, stressassoziiert auch von Lymphozyten gebildet werden können. Gleichzeitig tragen Lymphozyten Rezeptoren für Neurotransmitter und Hormone, die darauf hinweisen,

dass diese Peptide neben der Regulation von neuro-endokrinem System auch immunmodulatorisch in der Körperperipherie wirken. Diese Hormone können sowohl auto-, para-, sowie vermutlich endokrin wirken und schließen somit die Möglichkeit eines bidirektionalen Informationsflusses zwischen neuroendokrinem und Immunsystem ein (Blalock, 1994). Mittlerweile wurden über 20 Neuropeptide in Zellen des Immunsystems identifiziert, darunter sind besonders das Proopiomelanocortin (POMC) als Vorläufer von ACTH, Endorphinen, Enkephalinen und der hypothalamischen Peptide, das Vasoaktive Intestinale Peptid (VIP), Prolaktin und die Substanz P von Interesse. Diese werden bei akutem Stress sezerniert und können direkt oder indirekt (z.B. über Zytokinausschüttung) die Lymphozytenfunktion und -migration beeinflussen.

Diskutiert man den Einfluss psychischer Vorgänge auf das Immunsystem, so ist es auch interessant zu sehen, dass umgekehrt auch das Immunsystem mit dem zentralen Nervensystem interagiert und dort zu Veränderungen führt. Eine Rolle spielen dabei vor allem die Zytokine, Interleukine und Interferone, die teils über die Blut-Hirn-Schranke ihren Weg in das ZNS nehmen und direkt an zentralnervöse Zellen binden. Es ist bekannt, dass das Immunsystem des Gehirns, welches von Astrozyten und Mikroglia gebildet wird, ebenfalls diese Substanzen als Signalvermittler benutzt.

(siehe auch: Schedlowski, 1994; Schedlowski, 1996)

2.4. Das Zytokin-Netzwerk des Gehirns

Das ZNS galt lange als immunologisch isoliertes System, das durch die Blut-Hirnschranke von Blutzirkulation und Lymphsystem abgegrenzt ist. Inzwischen weiß man, dass es sehr wohl ein Immunsystem des Gehirns gibt, das auch in Kontakt mit dem peripheren System treten kann. So können beispielsweise aktivierte T-Zellen ins ZNS wandern und über ansässige Gliazellen an zentralnervösen Immunreaktionen teilnehmen. Ein Modell hierfür ist die experimentelle allergische Enzephalitis, bei der autoreaktive aktivierte T-Zellen in das ZNS einwandern, die Blut-Hirnschranke stören und über Zytokin- und Chemokinproduktion Makrophagen anlocken. Es wird vermutet, dass gliale Zellen selbst, darunter vor allem Mikroglia, als APC fungieren können, da sie entsprechende Oberflächenmoleküle (MHC-II, B7 und Adhäsionsmoleküle) *in vitro* und *in vivo* exprimieren können (Shrikant und Benveniste, 1996). Zudem besitzen sie die Fähigkeit der Migration und Phagozytose, sowie der Produktion von Zytokinen. Das bedeutet, dass sie Entzündungsreaktionen veranlassen können, die unter Umständen wichtig sind um einen Infektionsherd oder Tumor zu

bekämpfen. Gleichzeitig bedeutet es, dass mikrogliale Reaktionen im ZNS unter strengster Kontrolle stehen müssen, da eine übermäßige Aktivität fatale Folgen hätte, wie dies beispielsweise bei der AIDS-Demenz oder auch bei Alzheimerschen Demenz der Fall ist (Streit und Kincaid-Colton, 1996). Morgan und Gasque (1996) beschreiben die Funktion der Astrozyten als Träger eines unabhängigen, voll funktionsfähigen Komplementsystems des ZNS, das von Zytokinen getriggert wird und der Abwehr von Viren dient. Eine Aktivierung kann allerdings ebenso Neuronen und Oligodendrozyten angreifen und so eine Rolle bei Neurodegeneration oder Demyelinisierung spielen.

Die Wirkung von Zytokinen im Organismus ist vielfältig. Sie reicht von der Induktion von Akute-Phase Proteinen in der Leber, der Modulation und Verstärkung der Immunantwort (IL-1, IL-6), dem Unterhalten von Entzündungsreaktionen mit Erhöhung der Permeabilität von Blutgefäßen und dem Anlocken von Immunzellen (TNF- α , IL8) bis zur Erhöhung der Körpertemperatur und psychischer Alteration. Dass Zytokine neben der peripheren Funktion auch eine zentralnervöse Wirkung haben, wurde zuerst für Interferon entdeckt. Später fand man, dass IL-1 und IL-6 zur Ausschüttung von ACTH und Endorphinen führen, vergleichbar mit hypothalamischen *Releasing*faktoren (Blalock, 1994).

Interleukine werden einerseits endogen von aktivierten Astrozyten und Mikroglia gebildet (Merill, 1992; Müller und Ackenheil, 1998a), andererseits erhalten zirkulierende Zytokine exogen Zugang zum ZNS. Sie gelangen teils aktiv (Banks und Kastin, 1991), teils mittels erleichtertem Transport durch die Blut-Hirnschranke oder nehmen den Weg über zirkumventrikuläre Organe (Hashimoto et al., 1991). Eine weitere Vorstellung ist, dass IL-1 mit endothelialen IL-1R des zerebralen Gefäßsystems interagiert und sekundäre Moleküle stimuliert, die ihrerseits lokal Neuronen beeinflussen können (Blalock, 1994). Auch so könnten Interleukine zwischen Immunsystem und ZNS vermitteln. Die Lage von IL-1R auf Gliazellen um Arteriolen und im Plexus chorioideus deutet eine enge Kommunikation an (Wong und Licinio, 1994). Interleukin-Rezeptoren werden im Gehirn in Hippocampus, Plexus chorioideus, Meningen und Hypophysenvorderlappen, auf neuronalen und glialen Zellen exprimiert (Ban, 1994). Das Muster der Rezeptorverteilung spiegelt vermutlich die Rolle der Zytokine in der neuronalen Transmission wider und kann durch Zytokine ausgelöste Verhaltenseffekte, ihre Regulation von Appetit und Schmerz erklären.

Für die wichtigsten aktivierenden Zytokine IL-1, IL-2, IL-6 und TNF- α sind verschiedene Funktionen im Gehirn bekannt (Müller, 1997b; Müller und Ackenheil 1998a). Bei entzündlichen Erkrankungen setzen sie **Immunprozesse** im ZNS in Gang, sie sind beteiligt

an der Regulation der **Blut-Hirnschranke** und beeinflussen die **HPA-Achse**. Dies geschieht vor allem über IL-1, das direkt eine CRH-Freisetzung aus der Hypophyse bewirkt und zur Sensitivierung durch Hochregulation der Expression von IL-1R führt. Auch CRH führt zur vermehrten Expression von IL-1R auf hypophysären Zellen, d. h. bei Stress spricht die Hypophyse vermehrt auf das inflammatorische Zytokin IL-1 an, was in vivo in einer erhöhten Glukokortikoidantwort und Immunsuppression resultieren kann (Besedovsky et al., 1986; Blalock, 1994). Ähnlich stimuliert IL-6 die Freisetzung hypothalamischer und hypophysärer Hormone, wie Prolaktin, GH und LH (Spangelo et al., 1989). Außerdem scheinen Zytokine relevant für die physiologische **ZNS-Entwicklung** zu sein, indem sie Gliawachstum und neurale Differenzierung bestimmen (Merill, 1992). Müller beschreibt in Übersichtsarbeiten (1997b; Müller und Ackenheil 1998a) stimulierende und hemmende Effekte von Zytokinen auf dopaminerge, serotonerge, noradrenerge und cholinerge **Neurotransmission**, die zudem verschiedenen Gehirnregionen zugeordnet werden können. Eine periphere IL-1 Gabe führt zu Noradrenalin- und Serotoninsekretion, eine intrazerebrale Applikation zeigt eine Beeinflussung des Dopaminstoffwechsels, der ansonsten hauptsächlich von IL-2 moduliert wird (Shintani et al., 1993). Auch IL-6 führt im Tierversuch zu einem erhöhten Umsatz von Dopamin und Serotonin (Zalcman et al., 1994). Interessant ist auch die Tatsache, dass Noradrenalin seinerseits dosisabhängig die Produktion von IL-6 in Astrozyten stimuliert und somit als Neurotransmitter die Zytokinkaskade auslösen kann (Dunn, 1992). Daneben ist IL-6 Mediator bei der Exazerbation von Autoimmunerkrankungen im ZNS (Norris und Benveniste, 1993).

Immun- und neuroendokrines System verfügen also beide über ein Zytokin-Netzwerk und benutzen dieselben Transmitter, sprechen damit eine gemeinsame chemische Sprache. Es erscheint sinnvoll, dass die Produktion von Neuropeptiden durch Immunzellen für beide, das Immun- und Nervensystem relevant ist, ebenso können Zytokine neuronalen Ursprungs als Neurotransmitter fungieren und im Gehirn auto- und parakrine Aufgaben übernehmen. Manche Autoren sehen das Immunsystem als sensorische Kapazität nicht-kognitiver Stimuli, die in biochemische Information umgewandelt werden und so vom neuroendokrinen System wahrgenommen werden können (Blalock, 1994).

Für **psychiatrische Erkrankungen** ist dieses Netzwerk von Bedeutung, wenn man eine Immunaktivierung im ZNS als pathogenetischen Faktor annimmt. Gerade bei der Schizophrenie kommt den Zytokinen, und darunter vor allem dem IL-2, eine Schlüsselrolle zu. Neben dem klinischen Befund, dass die Gabe von IL-2 dosisabhängig zu psychotischen Symptomen führt (Denicoff et al., 1987) gibt es auch Untersuchungen über Veränderungen

der Liquorkonzentration von IL-2 bei Schizophrenen als Prädiktor für die Rückfall-Wahrscheinlichkeit (McAllister et al., 1995). Ebenfalls in diese Richtung weisen die Befunde, dass IL-2 die dopaminerge Neurotransmission fördert, bei Autoimmunprozessen erhöht ist - was die Autoimmunhypothese der Schizophrenie stützen würde - (Licinio et al., 1993) und dass IL-2 Rezeptoren im Hippocampus zu finden sind (Alonso et al., 1993). Für eine Interaktion zwischen ZNS und peripherem Immunsystem spricht auch eine Störung der Blut-Hirnschranke, die bei einem Teil schizophrener Patienten nachgewiesen werden konnte (Kirch et al., 1985; Müller und Ackenheil, 1995; Schwarz et al., 1998b).

Das Problem aller erhobenen immunologischen Befunde stellen die zum Teil fehlende Replizierbarkeit der Daten und die relativ geringgradigen Abweichungen dar. Beispielsweise ist die von Preble und Torrey (1985) beobachtete Interferon-Erhöhung weit unter der, die in akuten Infektionen gesehen wird. Dies bedeutet, dass die immunologischen Befunde kein hochaktives infektiöses oder Autoimmungeschehen reflektieren. Außerdem muss laut Kirch (1993) berücksichtigt werden, dass in den meisten Studien langjährig kranke Patienten unter nicht unerheblicher Neuroleptika-Medikation eingeschlossen waren, welche ihrerseits immunologische Parameter beeinflussen kann. Ebenso bringt ein langjähriger chronischer Verlauf Unsicherheiten in der Beurteilung der Parameter mit sich. Deshalb erscheint es vor allem wichtig, Medikationseffekte von einer zugrundeliegenden primären Störung des Immunsystems zu unterscheiden. In vorliegender Arbeit sollen weitere Subpopulationen von Lymphozyten bei Neuroleptika-naiven bzw. über einen längeren Zeitraum unbehandelten Schizophrenen bestimmt und im Verlauf der Erkrankung unter Medikation betrachtet werden.

3. Problemstellung

Bezüglich der Pathogenese der Schizophrenie gibt es verschiedene Erklärungsmodelle, die genetische, peristatische und immunologische Faktoren für die Entstehung der Erkrankung geltend machen. Zahlreiche Studien haben Veränderungen des Immunsystems bei Schizophrenen gefunden, die zum einen im Zusammenhang mit Virusinfektionen gesehen werden und zum anderen Ähnlichkeiten zu Autoimmunerkrankungen aufweisen, so z.B. Veränderungen des Zytokinsystems in peripherem Blut und Liquor, des zellulären Immunsystems und Nachweis verschiedener Antikörper.

Vor dem Hintergrund der Hypothese der (Auto-)immunpathogenese der Schizophrenie hat diese Arbeit die Untersuchung des zellulären Immunsystems bei Schizophrenen zum Thema.

Im Bezug auf das zelluläre Immunsystem wurden in verschiedenen Studien unter anderem aktivierte und atypische Lymphozyten beschrieben, eine erhöhte T- und CD4+-Zellzahl, eine Verschiebung der Ratio von Helfer-/Suppressorzellen, erniedrigte B-Lymphozyten, vermehrte CD5-Expression, sowie verschiedene funktionelle Veränderungen. Diese Befunde werden z.T. kontrovers diskutiert, vor allem die Ergebnisse der Zytokinstudien sind oft nicht reproduzierbar (vgl. Kap. 1.1.4. und 1.2.4.). Wie oben beschrieben besteht eine enge Kommunikation zwischen peripherem Immunsystem und ZNS, vor allem über das Zytokin-Netzwerk mit Bedeutung für die Funktion und Entwicklung des ZNS. Der Einfluss der Psyche auf Immunfunktionen ist Thema der Psychoneuroimmunologie und wurde beispielhaft anhand des Stress-Systems dargestellt. Bei wechselseitiger Beeinflussung stellt die Unterscheidung von ursächlichen und sekundären Veränderungen ein Problem dar. Ein wichtiger Faktor, der in der Untersuchung schizophrener Patienten berücksichtigt werden muss, ist die Medikation mit Neuroleptika, da diese mit dem Neurotransmitter- und Immunsystem interagieren.

Um Medikationseffekte herausfinden zu können, wird in vorliegender Arbeit ein Kollektiv von zunächst Neuroleptika-freien schizophrenen Patienten der Psychiatrischen Universitätsklinik der LMU München untersucht. Mittels Durchflusszytometrie wird die Expression einer Auswahl von Oberflächenantigenen bestimmt, die insbesondere mit der Aktivierung des Immunsystems oder Autoimmunprozessen in Zusammenhang gebracht werden und auch eine Ergänzung zu den bereits veröffentlichten Daten darstellen. Dies sind, neben den Subpopulationen der CD4- und CD8-positiven T-Zellen, die Expression von Aktivierungsmarkern und Adhäsionsmolekülen wie CD45RA, CD45RO, CD58, CD60, HLA-DR, die Interleukinrezeptoren CD25, CD126 und die Population der NK-Zellen und CD5-exprimierender B-Zellen (vgl. Kap. 1.2.3.). Dabei werden sowohl Veränderungen im Vergleich zu Kontrollen wie auch im klinischen Verlauf unter Therapie betrachtet, um eine Korrelation von immunologischen Parametern zu psychopathologischem Befund bzw. eine Wirkung von Neuroleptika auf das Immunsystem zu erfassen. Es werden Subgruppen gebildet bezüglich psychopathologischem Befund, Erstmanifestation und Therapieansprechen, mit dem Ziel gegebenenfalls immunologische Veränderungen zuordnen zu können.

II. Material und Methoden

1. Material

1.1. Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Paraformaldehyd		Fluka Chemie
Natriumacid		Fluka Chemie
PBS Dulbecco		Biochrom KG
Milchpulver		BioRad-Laboratories
RPMI 1640		Biochrom KG
Ficoll		Biochrom KG
Fetal Calf Serum		Boehringer Mannheim
Dimethylsulfoxid (DMSO)		Sigma
Trypanblau		
Reagenzgefäße	1,5 ml	Eppendorff
	12 ml	Sarstedt
Pipettenspitzen		Sarstedt
Latexhandschuhe Peha-Safe		Hartmann

1.2. Geräte

Zentrifugen:

Omnifuge 2.ORS		Heraeus Sepatech
Mikro Rapid/K		Haettich
Pipetten	10-1000 μ l	Eppendorf
Mikroskop		Leitz
Neubauer-Zählkammer		
Durchflusszytometer (FACScan)		Becton&Dickinson
Software		CellQuest

1.3. Antikörper

Verwendet wurden monoklonale Antikörper vom Typ IgG1 bzw. IgG2a, die mit drei unterschiedlichen Fluoreszenzen markiert waren:

CD3	FITC	Immunotech
CD3	Tricolor®	Caltag Laboratories
CD4	FITC	Caltag Laboratories
CD4	PE	Becton&Dickinson
CD4	Tricolor®	Caltag Laboratories
CD5	PE	Becton&Dickinson
CD8	Tricolor®	Caltag Laboratories
CD11a	FITC	Caltag Laboratories
CD16	PE	Becton&Dickinson
CD19	Tricolor®	Caltag Laboratories
CD25	PE	Becton&Dickinson
CD45RA	PE	Coulter
CD45R0	FITC	Dako
CD49d	PE	Labgen
CD56	PE	Becton&Dickinson
CD58	PE	Immunotech
CD62l	FITC	Pharmingen
CD126	PE	Labgen
HLA-DR	PE	Becton&Dickinson
T-Zell-Rezeptor- γ/δ	FITC	Becton&Dickinson

indirekte Färbung:

CD60	—	Überstand von 3B2-Zellen, freundliche Überlassung durch Prof. Rieber (Dresden)
anti-Maus- μ	PE	Dianova

Isotyp-Kontrolle:

MsIgG1	FITC/PE	Becton&Dickinson
IgG2a	FITC/PE	DAKO

1.4. Untersuchungsmaterial

1.4.1. Patienten und Kontrollpersonen

Die Untersuchung wurde von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät genehmigt. Die Probanden wurden gemäß den dort festgelegten Bestimmungen aufgeklärt und gaben ihr freiwilliges Einverständnis zur Teilnahme. Die Auswahl und Diagnosestellung der Patienten erfolgten mittels „strukturiertem klinischen Interview“ (*SCID*) nach der DSM-III-R (Spitzer et al., 1990). Die Diagnosen waren 24 x paranoider Typ (295.3), 6 x desorganisierter Typ (295.1) und 1 x schizophreniforme Störung (295.4) Diese wurden durch mindestens zwei Untersucher gesichert. Weitere psychische oder somatische Erkrankungen, insbesondere aktive inflammatorische oder immunologische Prozesse wurden durch Anamnese, körperliche Untersuchung und Routine-Labortests ausgeschlossen. Nikotinkonsum war bei 9 Patienten bekannt und wurde von weiteren 9 Patienten verneint. Für 13 Patienten lagen diesbezüglich keine Angaben vor. 6 Patienten hatten einen nahen Verwandten mit psychiatrischer Erkrankung.

Es wurden Blutproben von insgesamt 31 akut erkrankten schizophrenen Patienten untersucht. Die Blutentnahme von je 20-50 ml fand vormittags zwischen 9⁰⁰ und 11⁰⁰Uhr statt. Pro 20 ml Blut wurden 1000 IE Heparin Novo zur Antikoagulation zugefügt.

Alle Patienten waren mindestens 3 Monate ohne neuroleptische Behandlung, darunter waren 12 Patienten Neuroleptika-naiv, d. h. es handelte sich um die Erstmanifestation der Erkrankung. Unter den Patienten mit mehreren Manifestationen war es 9 x die zweite, 3 x die dritte, 5 x die vierte und 2 x die fünfte Krankheitsepisode. Während des stationären Aufenthaltes, noch vor Beginn der Studie, erhielten 11 Patienten Benzodiazepine.

Der psychopathologische Befund wurde anhand der PANSS-Skala (= *Positive and Negative Syndrome Scale*; Kay et al., 1986) erfasst. Diese besteht aus drei Kategorien: Einer Plus-Skala und einer Negativ-Skala mit je 7 Bewertungseinheiten, die die Ausprägung von positiven bzw. negativen Symptomen beurteilen, und einer Globalskala, die 16 Untereinheiten enthält. Für jede Untereinheit werden je nach Ausprägung 1-7 Punkte gegeben. Daraus errechnen sich der Gesamt- und der Globalscore (Messinstrument siehe Kap. VII). Bei Aufnahme hatten die Patienten einen durchschnittlichen Globalscore von $41,6 \pm 8,3$ Punkten (von 28 bis 62) und einen Positiv-Wert von $19,6 \pm 5,6$ Punkten (von 9 bis 33). Der Negativ-Score lag im Mittel bei $21,4 \pm 8,0$ (von 7 bis 40) und der Gesamtscore betrug $82,1 \pm 15,6$ Pkt. (von 48 bis 114).

Von 16 Patienten, die sich unter Neuroleptikatherapie klinisch remittiert zeigten oder in einem Residualzustand befanden, konnte ein zweites Mal vor Entlassung Blut gewonnen werden. Damit konnten die Werte dieser Patienten vor und nach Behandlung verglichen werden. Die Neuroleptikatherapie entsprach allgemein üblichen Kriterien mit dem Ziel einer möglichst niedrigen neuroleptischen Erhaltungsdosis. Verwendet wurden Butyrophenone, Phenothiazine, Clozapin und andere atypische Neuroleptika. Ein Großteil der Patienten erhielt hochpotente Neuroleptika. 12 Patienten wurden mit Leponex® oder Zyprexa® behandelt, 3 Patienten mit Risperdal® und 4 Patienten mit niederpotenten Neuroleptika.

Bei der klinischen Nachuntersuchung lag der PANSS-Globalscore bei $21 \pm 2,6$ (Range 18-27), der Positiv-Score bei $8,8 \pm 1,5$ (Range 7-12), der Negativ-Score bei $10,8 \pm 4,2$ (Range 7-21) und der Gesamtscore bei $40,6 \pm 7,4$ (Range 32-58). Die Differenz der Scores vor und nach Behandlung sind: Globalscore $19,3 \pm 6,1$ (Range 10-33), Positiv-Score $12,0 \pm 6,4$ (Range 4-26), Negativ-Score $8,1 \pm 4,4$ (Range 2-16) und Gesamtscore $39,5 \pm 12,9$ (Range 20-69). Demnach hatte kein Teilnehmer im Verlauf eine Verschlechterung des psychopathologischen Status. Der Therapieerfolg wurde in einer Punkteskala von 0-4 Pkt. bewertet. Der Erfolg war bei 5 Patienten mäßig mit geringer Besserung und Entlassung in eine therapeutische Wohngemeinschaft (1 Pkt.). 20 Patienten wurden arbeitsfähig mit mäßiger bis guter Besserung entlassen (2-4 Pkt.), davon 8 teilweise arbeitsfähig in die Familie integriert (2 Pkt.), 6 gut gebessert und arbeitsfähig (3 Pkt.) und weitere 6 in Remission mit voller Arbeitsfähigkeit (4 Pkt.). Ein Patient zeigte keine klinische Besserung (0 Pkt.). Von 5 Patienten lagen diesbezüglich keine Angaben vor. Der stationäre Aufenthalt erstreckte sich im Mittel auf $2,1 \pm 1,4$ Monate (Range 0,5-7). Die gesamte Erkrankungsdauer betrug $48,3 \pm 55,3$ Monate (Range 0,5-228).

Als **Kontrollen** fanden sich 19 gesunde Probanden in ähnlicher Alters- und Geschlechtsverteilung: Das Durchschnittsalter der Patienten lag bei $32,7 \pm 8,9$ Jahren, der Kontrollen bei 28 ± 5 Jahren. Das Verhältnis männlich:weiblich betrug in der Gruppe der Schizophrenen 1:1,2, in der Gruppe der Behandelten war die Verteilung vergleichbar (1:1,14). Die Kontrollgruppe bestand aus etwas mehr Männern im Verhältnis 1,4:1. Auch die Kontrollpersonen stimmten der Teilnahme an der Studie nach Aufklärung zu. Es gab keine Hinweise auf das Vorliegen von akuten Erkrankungen oder psychiatrischen Störungen, sowie eine leere Familienanamnese im Bezug auf psychiatrische Erkrankungen.

1.4.2. Definition von Subgruppen

Um den Zusammenhang immunologischer Veränderungen mit psychopathologischem Befund und Ansprechen auf Neuroleptikatherapie abzuschätzen wurden die Patienten diesbezüglich in phänotypische Untergruppen eingeteilt, die miteinander verglichen wurden. Als Kriterium für einen ausgeprägten **psychopathologischen Befund** wurde ein PANSS-Score von >80 gesamt und >40 global bei Aufnahme gewählt. Diese Werte trennten deutlich zwei Gruppen voneinander, d. h. 15 von 16 Patienten mit einem Gesamtscore von >80 erreichten zugleich einen Globalscore von >40.

Zur Beurteilung des Zusammenhangs zwischen Ansprechen und immunologischem Befund wurden die 14 Patienten mit nur mäßigem **Therapieerfolg** (0-2 Pkt.) denjenigen mit guter Besserung bzw. Remission und anschließender Arbeitsfähigkeit (12 Patienten, 3-4 Pkt.) gegenübergestellt (jeweils vor und nach Behandlung) und mit der Kontrollgruppe verglichen.

Auch wurden Neuroleptika-naive Patienten mit **Erstmanifestation** der Schizophrenie getrennt betrachtet (10 Patienten unbehandelt, 6 Patienten auch nach Behandlung), um einen Einfluss einer zurückliegenden Vorbehandlung auszumachen bzw. die immunologische Situation bei Erstmanifestation im Vergleich zu späteren Manifestationen festzustellen.

Da bekannterweise **Alter und Geschlecht** einen Einfluss auf immunologische Variablen haben, wurden auch diesbezüglich Untergruppen gebildet und miteinander verglichen, d. h. Patienten, die älter als 35 Jahre waren mit jüngeren und Männer mit Frauen. Aufgrund fehlender Angaben konnte das Rauchen als intervenierender Faktor nicht ausreichend beurteilt werden.

1.4.3. Zusätzliche Patientengruppe

Für die Berechnung der Parameter der Expression von CD45RO und HLA-DR konnten Daten von weiteren 41 Patienten - Teilnehmer derselben Studie - einbezogen werden. Diese Daten wurden im Rahmen einer vorangehenden Arbeit nach den gleichen Kriterien erhoben. Auch bei diesen Patienten wurde die Expression von mehreren lymphozytären Oberflächenmolekülen mittels Durchflusszytometer gemessen. Die Messung wurde protokollgemäß am gleichen Gerät durchgeführt. Anschließend wurden für die Parameter CD45RO und HLA-DR, die in beiden Untersuchungen gemessen wurden, die Rohdaten aller Patienten durch denselben Untersucher (neu) ausgewertet. So konnten diese Parameter an einer größeren Population untersucht werden, was die statistische Aussagekraft der Ergebnisse erhöht.

Die Zusammensetzung dieser Population ergibt sich wie folgt: Sie umfasst insgesamt 72 Patienten, von denen 36 auch nach Behandlung untersucht wurden. Der Altersdurchschnitt der Patienten betrug $31,2 \pm 9,4$ Jahre (Range 18-63) mit einem Verhältnis von männlich:weiblich = 1,6:1. Die Kontrollgruppe war im Schnitt $29,2 \pm 7,7$ Jahre alt (Range 20-53) mit etwas mehr Männern (m:w=1,2:1). Von den Patienten waren 29 Neuroleptika-naiv bei Erstmanifestation. 22 Patienten waren zum zweiten Mal erkrankt, 6 zum dritten Mal, 8 zum vierten Mal und 7 Patienten das fünfte Mal oder mehr. Vor Untersuchung hatten 27 Patienten Benzodiazepine erhalten. 27 Patienten waren Raucher, 19 konsumierten kein Nikotin. Die Diagnosen nach DSM-III-R teilten sich auf in 46 x 295.3, 18 x 295.1, 4 x 295.4, 3 x 295.2 (katatoner Typ) und 1 x 295.6 (residualer Typ). Die Gesamtdauer der Erkrankung betrug $48 \pm 70,3$ Monate (Range 0.5-300). Durchschnittlich waren die Patienten $1,9 \pm 1,4$ Monate stationär (von wenigen Tagen bis 7 Monate). Bei Entlassung hatten sich 23 Patienten gut gebessert und waren arbeitsfähig (3-4 Pkt.). 26 Patienten zeigten mäßige klinische Besserung und konnten teilweise Arbeit aufnehmen (2 Pkt.). 16 Patienten waren nicht arbeitsfähig, wovon 11 in therapeutische Wohngemeinschaften aufgenommen werden konnten (1 Pkt.). Der psychopathologische Befund anhand der PANSS-Skala vor und nach Behandlung ist in Tabelle 3 dargestellt.

PANSS-Score	bei Aufnahme	nach Behandlung	Differenz
global	44.9±10.1 (16-69)	31.2±12.6 (18-62)	13.3±12.3 (-16-49)
positiv	21.2±6.6 (7-34)	11.9±5.6 (7-30)	9.6±7.8 (-7-27)
negativ	24.0±9.7 (4-45)	18.1±8.9 (7-37)	5.8±5.3 (-6-16)
gesamt	89.9±20.7 (46-137)	61.1±24.7 (32-119)	28.7±22.9 (-24-87)

Tabelle 2: PANSS-Score zur Bewertung des psychopathologischen Befundes der Patienten bei Aufnahme, sowie nach Behandlung. Angabe der Differenz vor / nach Behandlung als Mass des Therapieansprechens.

Damit liegt insgesamt eine relativ homogene Population von schizophrenen Probanden (und Kontrollen) vor, die sich in der Zusammensetzung hinsichtlich Alter, Geschlecht, Manifestationsereignissen, psychopathologischer Scores, Therapieverlauf und Outcome nur wenig von der primär untersuchten Patientengruppe unterscheidet. Somit können alle

Patienten zu einem Kollektiv zusammengefasst werden und die erhobenen Daten für beide Gruppen gemeinsam ausgewertet werden.

2. Methoden

2.1. Probenverarbeitung

2.1.1. Isolierung von Lymphozyten aus Vollblut

Die Auftrennung der peripheren mononukleären Zellen (PBMCs) aus den Blutproben der Patienten erfolgte unter sterilen Bedingungen über einen Dichte-Gradienten (Böyum, 1968). Dazu wird das heparinisierte Patientenblut 1:2 mit physiologischer Kochsalzlösung (0,9% NaCl) verdünnt. In 50 ml-Zentrifugenröhrchen wird je 15 ml Ficoll-Hypaque vorgelegt, das vorsichtig mit der gleichen Menge der Blutprobe überschichtet wird. Die Probe wird 30 min lang bei 800 g ohne Bremse zentrifugiert. Durch die Dichte des Ficolls (1,077 g/ml) lagern sich die PBMCs in einer dünnen Schicht auf dem Ficoll ab, während die Erythrozyten und auch die Granulozyten aufgrund höherer Dichte durchtreten können und auf den Boden des Röhrchens abzentrifugiert werden. (Abb. 6)

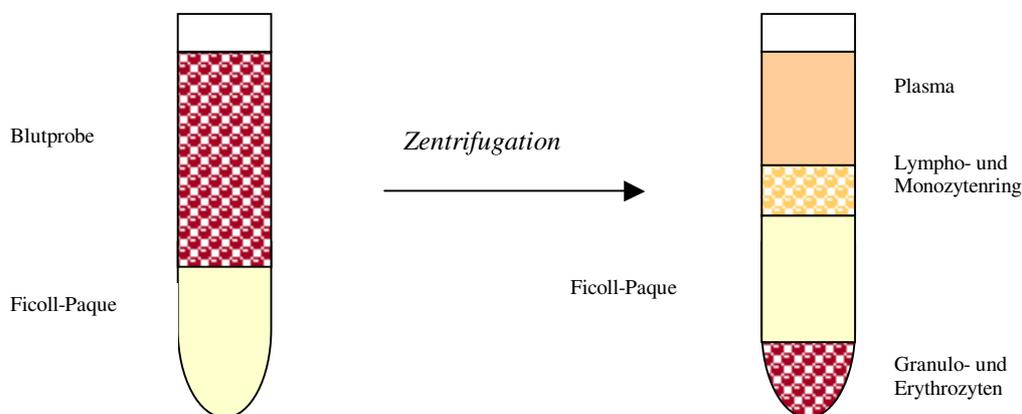


Abb. 6: Darstellung der **Isolierung von PBMCs** aus Vollblut über einen Ficoll-Gradienten:

Nach Überschichtung von Ficoll mit der Blutprobe und Zentrifugation kann der weißlich erscheinende Ring (Interphase) aus Lymphozyten / Monozyten abpipettiert werden.

Der weißlich erscheinende Ring mit den PBMCs wird nun sorgfältig mit der Pipette abgenommen und in ein neues 50 ml-Röhrchen überführt. Anschließend erfolgt ein Waschschrift, bei dem man das Röhrchen mit 0,9% NaCl auf ca. 40 ml auffüllt, mischt und

5 min bei 800 g zentrifugiert. Der Überstand wird abgekippt, das Pellet in 1 ml 0,9% NaCl resuspendiert.

Vor dem Einfrieren wird die Gesamtzahl der gewonnenen Zellen mit Hilfe der **Neubauer-Zählkammer** bestimmt. Dazu werden der Zellsuspension jeweils 10 µl entnommen und in einer Mikrotiterplatte mit 90 µl Trypanblau verdünnt (1:10). Nach entsprechender Vorbereitung der Neubauer Zellkammer (Reinigung mit 70% Ethanol und Aufbringen des Deckgläschens) werden 9 µl dieser Verdünnung in die Kammer gefüllt. Unter dem Mikroskop werden nur die vitalen Lymphozyten gezählt, die sich als gleichförmige runde Zellen mit hellem Hof darstellen. Bereits tote Zellen nehmen den Farbstoff Trypanblau auf und erscheinen als blaue, meist unförmige Zellen bzw. Zellschrott. Es werden mindestens drei Eckquadrate ausgezählt. Der Durchschnitt der Zellen in einem Quadrat ergibt die Gesamtzahl:

$$\text{Anzahl Zellen / Eckquadrat} \times 10 \text{ (Verdünnungsfaktor)} \times 10^4 = \text{Gesamtzahl / ml}$$

Pro Kryoröhrchen werden 3-5 Mio Zellen eingefroren.

2.1.2. Einfrieren und Auftauen von Zellen

Vor dem Aufteilen der Zellen in die oben festgelegte Anzahl von Kryoröhrchen erfolgt ein zweiter Waschschrift mit 0,9% NaCl. Die Röhrchen werden mit der jeweiligen Einfriernummer beschriftet und bei -20° vorgekühlt.

Nun resuspendiert man das Pellet in 0,5 ml Einfriermedium (RPMI1640 + 50% FCS) je Kryoröhrchen und stellt es auf Eis. Unter tropfenweiser Zugabe der gleichen Menge DMSO-Lösung (RPMI1640 + 20% DMSO) als Gefrierschutz wird das Röhrchen leicht geschüttelt und je 1 ml der Suspension in die vorgekühlten Kryoröhrchen pipettiert. Das Arbeiten auf Eis ist sehr wichtig, da DMSO für die Zellen schädlich ist. Der Einfriervorgang erfolgt über eine **Gefrierkette**. Zunächst werden die Proben bei -80°C eingelagert, dann aber nach frühestens zwei Stunden in den Stickstofftank (ca. -180°C) überführt, wo sie über einen längeren Zeitraum aufbewahrt werden können.

Die Zellen müssen rasch **aufgetaut** werden. Dazu legt man jeweils etwa 10 ml Vollmedium (RPMI1640 + 10%FCS) in ein 15 ml-Röhrchen vor. Die Kryoröhrchen werden aus dem Stickstofftank entnommen (der Transport erfolgt auf Eis bzw. Trockeneis) und im Wasserbad bei 37°C solange geschwenkt, bis ein erbsgroßes Eisstück verbleibt. Nun kippt man den Inhalt des Röhrchens in das vorgelegte Medium und taut den Rest durch Mischen auf. Es erfolgt

eine Zentrifugation für 10 min bei 400 g (1260 rpm) und Raumtemperatur. Der Überstand wird verworfen und das Pellet in 5 ml Medium resuspendiert, erneut 10 min zentrifugiert und in 5 ml Medium aufgenommen.

Von dieser Suspension verwendet man nun wiederum 10 µl für die Zellzählung und die Bestimmung der Zellkonzentration bzw. des Anteils an toten Zellen (s. o.).

Für die FACS-Analyse soll die Zellzahl je Probe $2,5 \times 10^5$ Zellen betragen.

2.2. Durchflusszytometrie

2.2.1. Grundlagen der Durchflusszytometrie

Bei der Durchflusszytometrie handelt es sich um eine elegante Technik zur Fluoreszenz-abhängigen multiparametrischen Analyse von Zellen in Suspension. Mit Hilfe markierter monoklonaler Antikörper erlaubt diese Technik, in kurzer Zeit die Lymphozyten-subpopulationen einer Blutprobe zu bestimmen. Die Durchflusszytometrie hat in den letzten 10-15 Jahren zunehmend Einzug auch in die klinische Zelldiagnostik gehalten, so z. B. zur Immunphänotypisierung lymphatischer Zellen im Rahmen der Diagnostik von Immundefekten oder HIV.

Voraussetzung für eine durchflusszytometrische Analyse sind Zellen in Suspension und spezielle Fluoreszenzfarbstoffe, die mit einem Argonlaser mit 480 nm Wellenlänge angeregt werden und deren Emissionslicht gemessen werden kann.

Das Gerät besteht aus drei Hauptanteilen, nämlich

- Flüssigkeitssystem,
- optischem System
- und Signalverarbeitung.

Die Probe wird mittels Überdruck durch eine Stahlkapillare transportiert, die auf das Zentrum der Messküvette gerichtet ist. Dort wird die Probe von der Hüllstromflüssigkeit erfasst und auf bis zu 7 m/sec beschleunigt. Durch diesen Vorgang der hydrodynamischen Fokussierung gelingt es, die Zellen wie im Gänsemarsch den Analysepunkt passieren zu lassen, wo der fokussierte Lichtstrahl auf die einzelne Zelle trifft. (Abb. 7)

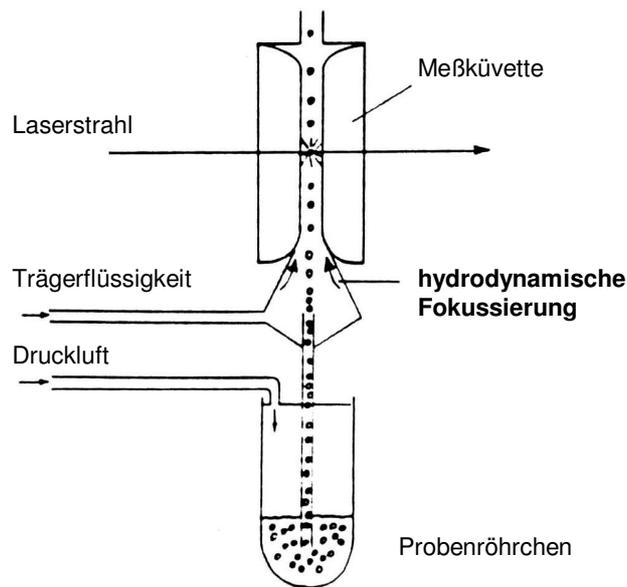


Abb. 7: Hydrodynamische Fokussierung: Die Zellen der Probensuspension werden mit Überdruck beschleunigt und gelangen so hintereinander aufgereiht in die Analysezone des Zytometers, wo sie einzeln vom Laserstrahl getroffen werden.

Gemessen werden optische Signale (Lichtstreuung und Fluoreszenz) die von den einzelnen fokussierten Partikeln ausgehen. Als Lichtquelle dient ein Argonlaser, dessen Emissionsspektrum im Absorptionsbereich verschiedener kommerziell erhältlicher Fluoreszenzfarbstoffe liegt. Laserlicht zeichnet sich durch konstante Strahlungsleistung, hohe Strahlungsintensität und gerichtete und kohärente Lichtwellen aus. (Abb. 8)

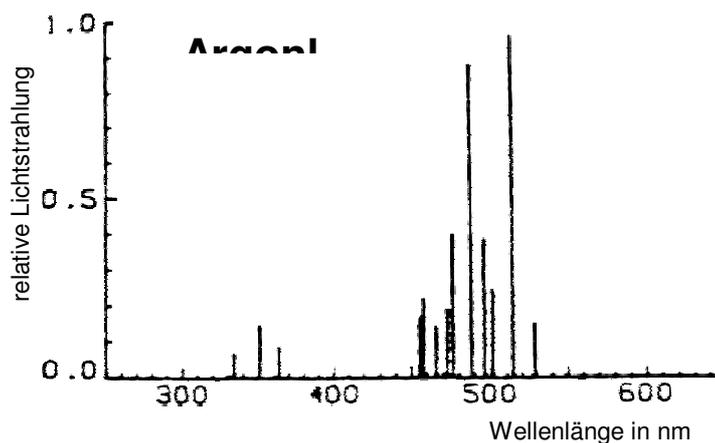


Abb. 8: Emissionsspektrum eines Argonlasers

Beim Argonlaser macht man sich die Emissionslinie bei 488 nm zunutze, um die Fluorochrome anzuregen. Die absorbierte Lichtenergie hebt die Elektronen auf ein höheres Energieniveau. Beim Rücksprung kommt es zur Emission eines Photons, der **Fluoreszenz**. Da

aber auch Energie in Form von Wärme verloren geht, ist das Emissionsspektrum energieärmer und damit langwelliger als das Anregungsspektrum. (Abb. 9)

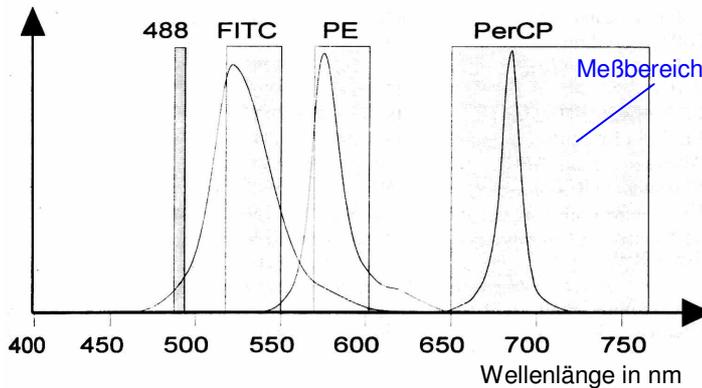


Abb. 9: Emissionsspektrum der Fluoreszenzfarbstoffe FITC, PE und PerCP bei Anregung mit dem Argonlaser (Wellenlänge: 488nm).

Verwendet wurden hier drei Fluorochrome, die innerhalb des Absorptionsbereichs von 488 nm angeregt werden. Die benutzten monoklonalen Antikörper sind mit je einem dieser Fluorochrome konjugiert. Aufgrund der unterschiedlichen Emissionswellenlängen können die drei Farben gleichzeitig gemessen werden (Tabelle 3). Bei Tricolor® handelt es sich um einen Tandem-Farbstoff aus PE und Cyan5.

Fluorochrom	Max. Exzitation	Max. Emission	Farbe
Fluorescein (FITC)	488nm	520nm	grün
Phycoerythrin (PE)	488nm	575nm	rot-orange
Tricolor® (TC)	488nm	667nm	dunkelrot

Tabelle 3: Angabe der Wellenlängen der Fluorochrome FITC, PE und TC

Neben der Fluoreszenz wird als weiterer Parameter das **Streulicht** gemessen. Abhängig von verschiedenen physikalischen Zelleigenschaften, wie Querschnittsfläche, Membranstruktur, Refraktionsindex und intrazellulären Bestandteilen, wird das Licht, das auf die Zelle trifft, unterschiedlich stark gestreut. Am größten ist die Streuung im Kleinwinkelbereich von 0-10°. Dieses Vorwärtsstreulicht, engl. „*Forward Angle Light Scatter*“ (FSC), korreliert mit dem Querschnitt der Zelle und lässt Rückschlüsse auf deren Größe zu. Den kleineren Teil, der im 90°-Winkel abgestrahlt wird, bezeichnet man als Seitwärtsstreulicht oder „*Side Angle Light Scatter*“ (SSC). Er entspricht dem Refraktionsindex und gibt Information über Granularität, Membranfaltung und äußere Form der Zelle. So lassen sich die wichtigsten Leukozytengruppen voneinander unterscheiden (Abb. 10) und eine getrennte Betrachtung z. B. von

Lymphozyten durch Eingrenzung (=Gating) ist ermöglicht. Dadurch kann man bei der Auswertung eine Vorauswahl der zu analysierenden Zellen treffen.

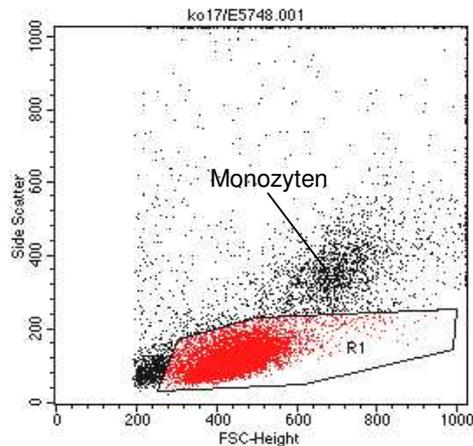


Abb. 10: Lymphozytengate: Anhand von Größe (x-Achse) und Granularität (y-Achse) lassen sich die einzelnen Zellpopulation eingrenzen (Gating). Die Region „R1“ umfasst die Lymphozyten; links davon befindet sich Zellschrott; die Population darüber besteht aus Monozyten.

Das optische System des Durchflusszytometers besteht aus einer Anregungs- und einer Detektionseinheit. Letztere ist axial für Vorwärtsstreulicht und orthogonal für Seitwärtsstreulicht und Fluoreszenz angeordnet. Verschiedene Optiken, Blenden und Filter zerlegen die Fluoreszenz in verschiedene Farbbereiche und trennen sie vom SSC. (Abb. 11)

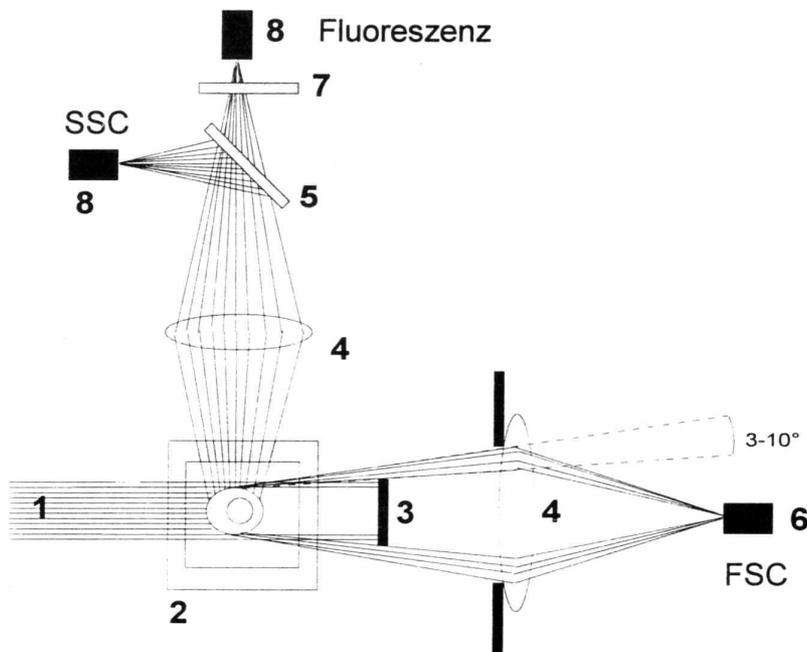


Abb. 11.: Aufbau eines Durchflusszytometers: Der Laserstrahl (1), der auf die Zelle in der Messküvette (2) trifft wird nach vorne und zur Seite gestreut. Ein System aus Spiegeln und Filtern leitet das Licht Photodetektoren zu, die die Signale in elektrische Impulse umwandeln. (3=Blockerstreifen, 4=Sammellinse, 5=Teilerspiegel, 6=Photodiode, 7= Lichtfilter, 8= Photomultiplier)

Die **Umwandlung** der optischen Signale geschieht über Photomultiplier und Photodioden in elektrische Pulse, die wiederum verstärkt werden. Die Elektronik muss nun die empfangenen Signale zeitlich der entsprechenden Zelle zuordnen und die echten Signale, die einen Schwellenwert (=Threshold) überschreiten, registrieren. Die Festlegung der elektronischen Schwelle bezieht sich auf einen bestimmten Auslöseparameter (=Trigger). Über einen Analog-Digitalwandler wird die Intensität der gemessenen Eigenschaften jeweils einer von 1024 Klassen zugeordnet und in Form einer Listendatei gespeichert. Das bedeutet, dass jeder Zelle eine Liste von unabhängigen Werten zugeordnet ist, die während des Messvorgangs gleichzeitig erfasst wurden. Dadurch ist es möglich, die Daten auch zu einem späteren Zeitpunkt erneut nach verschiedenen Kriterien auszuwerten und zu korrelieren. Pro Messung werden für gewöhnlich 10.000 Zellen aufgenommen (ca. 100-500 Zellen/sec).

(siehe auch: Schmitz und Rothe, 1994; Janeway und Travers, 1995)

2.2.2. Fluoreszenzfärbung

Um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten muss die Präparation und Färbung der Zellen nach einem standardisierten Protokoll erfolgen. Die Zellzahl wird auf $2,5 \times 10^5$ eingestellt, da mindestens 10^5 Zellen pro Analyse benötigt werden und durch den Wasch- und Färbeprozess mit Verlusten gerechnet werden muss. Die Färbung erfolgte direkt mit Fluoreszenzgekoppelten Antikörpern, in einem Fall (Anti-CD60) wurde eine indirekte Färbung über einen Fluoreszenz-markierten Anti- μ -Antikörper im zweiten Schritt verwendet (Abb. 12).

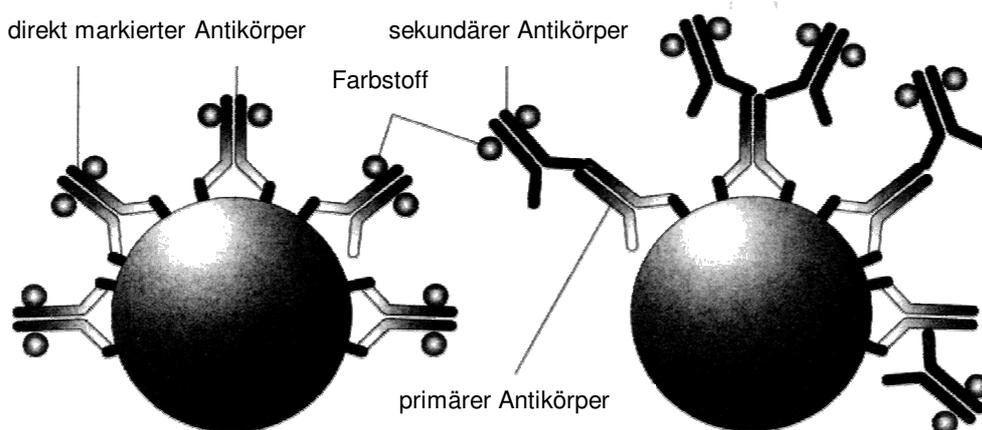


Abb. 12: Immunfluoreszenzfärbung: Bei einer Inkubation mit direkt markierten Antikörpern erfolgt die FACS- Analyse nach einmaligem Waschvorgang (links). In der indirekten Färbung werden die spezifisch bindenden Antikörper in einem zweiten Schritt von fluoreszenzmarkierten Antikörpern detektiert, die gegen die μ -Kette der Immunglobuline gerichtet sind (rechts).

Bei der **indirekten** Färbung wird der spezifisch bindende monoklonale Antikörper vom fluorochromierten polyklonalen Sekundärantikörper detektiert, was eine höhere Empfindlichkeit, aber auch eine Verstärkung des Hintergrunds zur Folge hat, da die Spezifität der Färbung abnimmt.

Der Vorteil einer **direkten** Färbung ist vor allem, dass in einem Ansatz verschiedene Antikörper gleichzeitig zugegeben werden können. Wichtig ist dabei, die Antikörperkonzentrationen so zu wählen, dass nur hochaffine Antigen-Antikörperreaktionen möglich sind und möglichst wenig unspezifische Kreuzreaktionen stattfinden. Gleichzeitig soll die Färbung aber auch intensiv genug sein, um positive und negative Zellen gut voneinander unterscheiden zu können.

Um die optimale Färbekonzentration zu erhalten wurde jeder Antikörper austitriert. Das heißt eine Probe wurde unter gleichen Bedingungen mit verschiedenen Antikörperkonzentrationen gefärbt, im Durchflusszytometer gemessen und so die beste Konzentration zur Diskriminierung zwischen Antigen-positiven und -negativen Lymphozyten ermittelt. (Beispiel: Abb. 13)

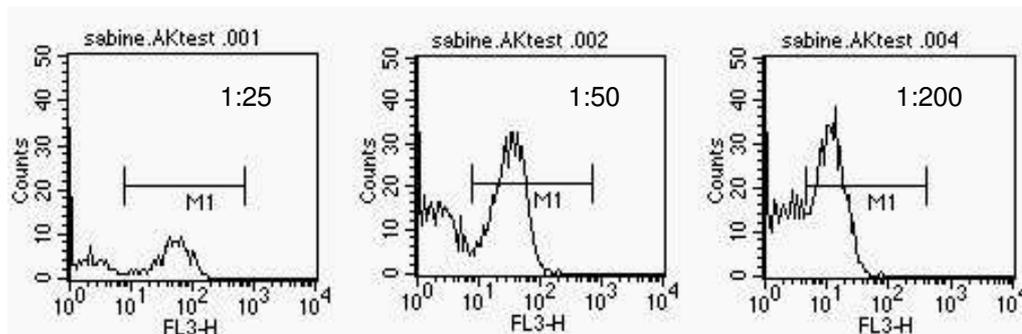


Abb. 13: Titration des Antikörpers CD3-Tri: Lymphozyten wurden mit Verdünnungen von 1:25 bis 1:200 des Tricolor®-markierten Antikörpers gefärbt. Die optimale Konzentration liegt bei 1:50 mit gutem Signal und Diskriminierung vom Hintergrund. „M1“ entspricht den CD3-positiven Lymphozyten.

Jede Probe wurde mit einem Panel von 14 unterschiedlichen Antikörperkombinationen in bestimmten Konzentrationen gefärbt und analysiert (Tab. 4).

Für die Untersuchung schwach exprimierter Antigene, wie z. B. der Aktivierungs-Antigene HLA-DR und CD25, wurden die sensitiveren PE-konjugierten Antikörper gewählt.

Tabelle 4: Antikörperpanel

Probenummer	AK-Kombination	Fluoreszenz	Isotyp	Endverdünnung
A	Standardmarker:			
	CD3	FITC	IgG1	1:50
	CD4	PE	IgG1	1:25
	CD8	TC	IgG2a	1:100
B	TCR- $\gamma\delta$	FITC	IgG1	1:20
	CD16	PE	IgG1	1:8
	CD56	PE	IgG1	1:15
	CD3	TC	IgG2a	1:50
C	CD5	PE	IgG2a	1:5
	CD19	TC	IgG1	1:30
D	Aktivierungsmarker:			
	CD62l	FITC	IgG2a	1:40
	CD45RA	PE	IgG1	1:30
E	CD62l	FITC	IgG2a	1:40
	CD45RA	PE	IgG1	1:30
	CD8	TC	IgG2a	1:100
F	CD45R0	FITC	IgG2a	1:15
	CD4	PE	IgG1	1:25
	CD8	TC	IgG2a	1:100
G	CD11a	FITC	IgG1	1:10
	CD4	PE	IgG1	1:25
	CD8	TC	IgG2a	1:100
H	CD4	FITC	IgG1	1:50
	CD49d	PE	IgG1	1:10
	CD8	TC	IgG2a	1:100
I	CD4	FITC	IgG2a	1:50
	HLA-DR	PE	IgG2a	1:20
	CD8	TC	IgG2a	1:100

Probenummer	AK-Kombination	Fluoreszenz	Isotyp	Endverdünnung
CD60	1. 3B2-Überstand		IgM	
	2. CD4	FITC	IgG1	1:50
	μ-Maus	PE	rabbit polyclonal	1:500
	CD8	TC	IgG2a	1:100
K	CD4	FITC	IgG2a	1:50
	CD126	PE	IgG1	1:10
	CD8	TC	IgG2a	1:100
L	CD4	FITC	IgG2a	1:50
	CD58	PE	IgG2a	1:15
	CD8	TC	IgG2a	1:100
M	CD4	FITC	IgG2a	1:50
	CD25	PE	IgG1	1:20
	CD8	TC	IgG2a	1:100
Isotyp-Kontrolle	IgG1	FITC	IgG1	1:10
	IgG2a	PE	IgG2a	1:10

Die Antikörperkombinationen wurden vorverdünnt in PBS / 1% Milchpulver + 0,1% Na-acid und im Dunkeln bei 4°C aufbewahrt.

Die Färbereaktion erfolgte in einem Volumen von 40 µl über 30 min auf Eis. Die Färbung lebender Zellen soll deswegen auf Eis (d. h. bei Temperaturen zwischen 4-12°) stattfinden, um stoffwechselbedingte Vorgänge zu verhindern, die eine Veränderung der Oberflächenantigene zur Folge hätten. Gerade wenn Zellantigene durch Antikörper quervernetzt sind („Capping“), kann es bei Raumtemperatur zum Abwerfen der vernetzten Rezeptoren kommen, was zur Verfälschung der Ergebnisse führen würde. Auch die Färbezeit von 30 min wurde streng eingehalten, da kürzere oder längere Zeiten zu einer unzureichenden Färbung bzw. einer Begünstigung unspezifischer Reaktionen führen. Das Waschen mit PBS konnte auf einmal bzw. zweimal beim indirekten Färben reduziert werden. Eine abschließende Fixierung der Zellen erfolgte mit 1% Paraformaldehyd / PBS, um ein potentiell Infektionsrisiko zu minimieren und die Messbedingungen auch über einen längeren Zeitraum stabil zu halten.

Es wurde also nach folgendem **Protokoll** vorgegangen:

- Vorlegen von $2,5 \times 10^5$ Zellen in jeweils 14 beschriftete Eppendorf-Röhrchen
- 10 min bei 6000 rpm zentrifugieren
- Überstand bis auf 20 μ l abnehmen, Pellet resuspendieren („aufratschen“)
- Antikörpermischungen vortexen, entsprechend je 20 μ l zugeben und erneut mischen
- Inkubation 30 min auf Eis
- je 1 ml PBS zugeben
- 10 min bei 6000 rpm zentrifugieren
- Überstand abkippen und in 200 μ l PBS / 1% Paraformaldehyd aufnehmen

Die gefärbten Proben wurden innerhalb weniger Stunden analysiert und bis dahin im Kühlschrank aufbewahrt.

2.2.3. Messung mit dem Durchflusszytometer (FACScan™, B&D)

Bevor mit der Messung der Proben begonnen werden kann, muss die Geräteeinstellung (= *Instrument Settings*) festgelegt und eine Aufnahmemaske kreiert werden.

Zur **Einstellung** wurde eine mit Anti-CD3-FITC/4-PE/8-TC gefärbte Probe verwendet. Die lineare elektronische Verstärkung der Signale für FSC und SSC und die logarithmische für die Fluoreszenzen wurde so gewählt, dass die Zellgruppen gut voneinander abgrenzbar waren. Die Threshold wurde anhand des FSC bestimmt und ließ noch Teile des Zellschrotts erkennen.

Um die spektrale Überlappung der Fluoreszenzfarbstoffe zu korrigieren, ist eine Einstellung der **Kompensation** zwischen den drei verwendeten Farbstoffen FITC, PE und TC notwendig. Dabei wird der jeweils in das andere Spektrum reichende Anteil der Farbe subtrahiert. Als Beispiel sei hier die Korrektur mit Hilfe der Anti-CD3-FITC/CD4-PE/CD8-TC gefärbten Zellen angeführt: Die Färbungen CD4+ und CD8+ schließen sich gegenseitig (nahezu) aus. Das bedeutet, dass die PE-gefärbte Zellwolke nicht weiter in den TC-Kanal reichen darf, als ungefärbte Zellen und umgekehrt (Abb. 14). Es ist zu beachten, dass bei Änderungen der Fluoreszenzsignalverstärkung auch die Kompensationseinstellung neu angepasst werden muss (Raffael et al. in: Schmitz und Rothe, 1994: S. 30).

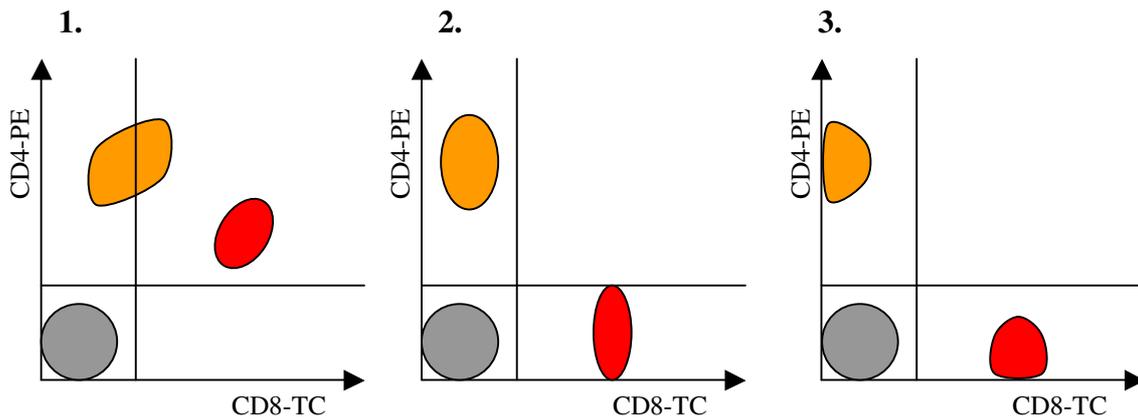
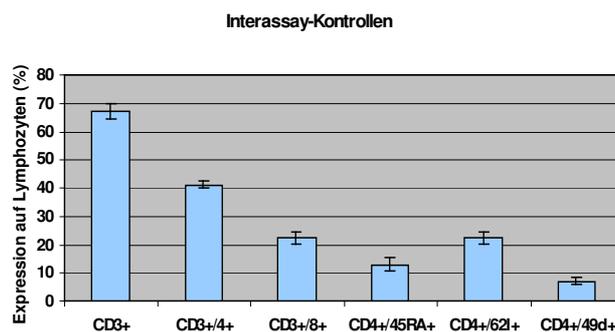


Abb 14: Zweifarbenkompensation: Färbung von Lymphozyten mit CD4-PE und CD8-TC als zwei distinkte Zellpopulationen. Bei korrekter Kompensation reicht die Fluoreszenz der PE-positiven Zellpopulation (orange) nicht über ungefärbte Zellen (grau) hinaus in den TC-Kanal und umgekehrt. (1=ohne Kompensation, 2=korrekte Kompensation, 3=Überkompensation)

Für die Datenaufnahme- und spätere Verarbeitung wurde das Programm CellQuest verwendet. Dem erstellten Aufnahme Fenster wurde ein **Lymphozyten-Gate** eingefügt, so dass während der Akquirierung der Daten 10.000 Ereignisse innerhalb des Gates gezählt wurden. Alle gewonnenen Daten wurden in entsprechenden Files gespeichert und auf magnetooptische Disketten geladen.

Zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse und dem Ausschluss eines systematischen Fehlers zwischen den einzelnen Messungen, wurde bei den ersten fünf Messungen immer, dann in jeder fünften Messung eine **Interassay-Kontrolle** mitgeführt. Dabei handelte es sich um dieselbe Blutprobe einer Kontrollperson, die jeweils für drei Antikörperkombinationen mitgefärbt und analysiert wurde. Es ergaben sich gut übereinstimmende Werte, deren Standardabweichungen im akzeptablen Bereich lagen. So war beispielsweise der Mittelwert der T-Zellen $67,2 \pm 2,7$ %. Die Werte für die CD3+/4+- Zellen lagen bei $41,2 \pm 1,3$ % und für CD3+/8+- Zellen bei $22,6 \pm 2,2$ %. Auch folgende Kombinationen hatten gut replizierbare Ergebnisse: CD4+/45RA+ mit $12,9 \pm 2,4$ %, CD4+/62l+ mit $22,4 \pm 2,1$ % und CD4+/49d+ mit $7 \pm 1,3$ %. (**Abbildung 15**)



2.2.4. Auswertung der Daten

Zur Auswertung der erhaltenen Daten stehen verschiedene Darstellungsformen zu Verfügung. Zum einen die Histogrammdarstellung, welche die Häufigkeitsverteilung eines Parameters wiedergibt, zum anderen das Punktehistogramm (=Dot Plot), das zwei Parameter zueinander in Beziehung setzt. (Abb. 16a)

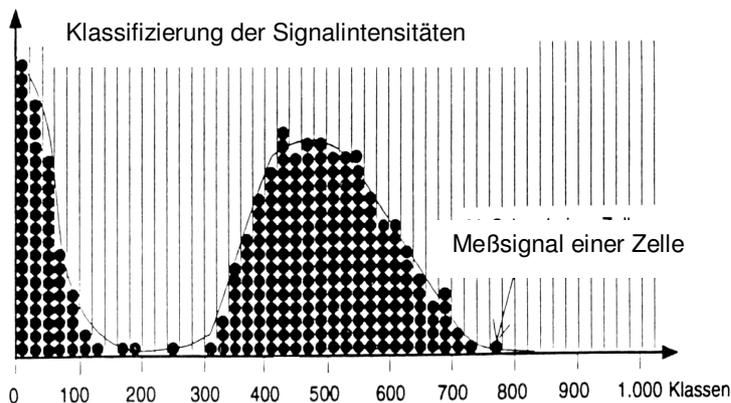
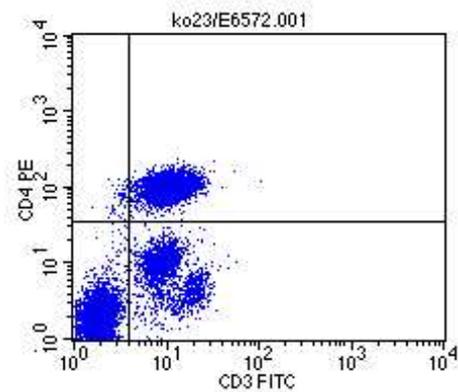


Abb. 16a: Histogrammdarstellung:

Jedes Signal wird logarithmisch verstärkt
und einer von 1024 Klassen zugeordnet.



Dot Plot:

Die Klassenwerte zweier Parameter werden
gegeneinander aufgetragen

Beim Dot Plot kann oft die visuelle Abschätzung der Zellpopulationen in den Punktwolken Schwierigkeiten bereiten, insbesondere bei hoher Zelldichte. In solchen Fällen wurden weitere Zweiparameterdarstellungen zur Auswertung herangezogen, die einen räumlichen Eindruck entstehen lassen, nämlich Konturlinien- und Gebirgsdarstellung. Diese berücksichtigen die Anzahl der Zellen an einem bestimmten Punkt der Darstellung: In Form von Isoamplituden bei ersterer bzw. als dreidimensionale Präsentation (Z-Achse = Zahl der Ereignisse) bei letzterer Darstellungsform. (Abb. 16b)

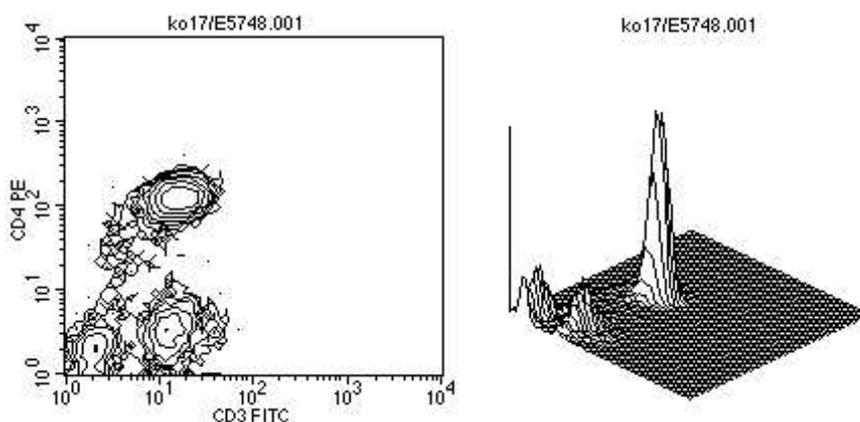


Abb. 16b: Konturlinien und Gebirgsdarstellung. Gleiche Zellpopulation wie im Dot Plot (Abb. 16a)

Die Auswertung wurde nur für Lymphozyten durchgeführt, das heißt, in die Berechnungen wurde nur die Lymphozytenpopulation einbezogen, die vorausgehend im Gate eingegrenzt wurde (erkennbar an bestimmter Größe und Granularität im FSC/SSC-Histogramm, s. S. 48).

Für weitere Bestimmungen wurden auch Gates für CD3+/4+ und CD3+/8+ Lymphozyten festgelegt und die Verteilung von interessierenden CD-Molekülen gesondert auf diesen Zellen betrachtet .

Die Dot Plot-Analyse wurde statistisch mittels Quadrantenanalyse ausgewertet. Dazu wurde in das jeweilige Analysefenster ein Kreuz eingefügt, das positive von negativen Zellpopulationen trennt, und daraufhin die Prozentzahl von Lymphozyten im entsprechenden Quadranten ermittelt. Auch im Histogramm wurden positive von negativen Zellen durch das Einfügen einer Marke getrennt. Die Festlegung der Grenze orientierte sich in unklaren Fällen an einer Negativkontrolle, in diesem Fall der Isotyp-Kontrolle des entsprechenden Immunglobulins. Alle Klassenwerte, in deren Bereich die Signale der Isotypkontrolle lagen, wurden im Rahmen von Autofluoreszenz und unspezifischer Antikörperbindung gesehen und als negativ betrachtet. Der so ermittelte begrenzende Wert wurde für die folgenden Messungen übernommen. (Abb.17)

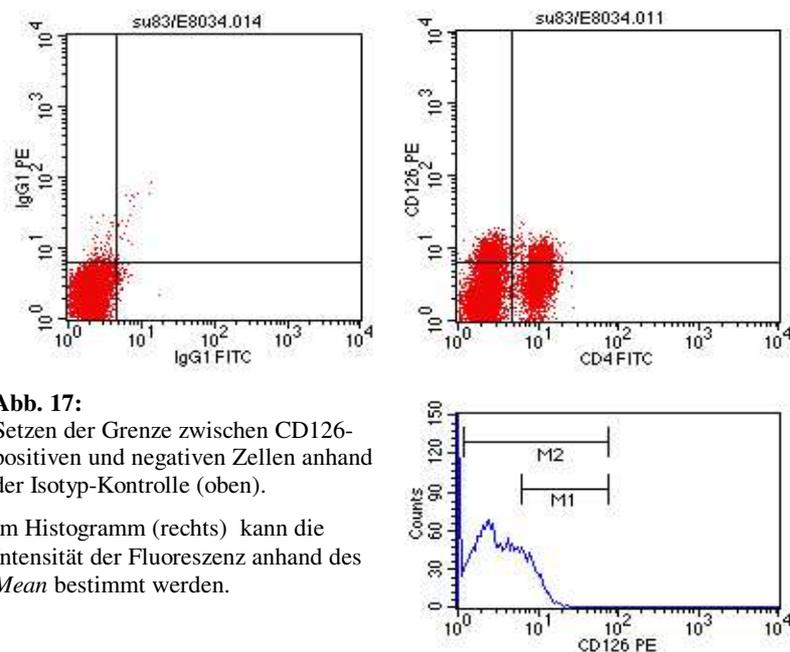


Abb. 17:
Setzen der Grenze zwischen CD126-positiven und negativen Zellen anhand der Isotyp-Kontrolle (oben).
Im Histogramm (rechts) kann die Intensität der Fluoreszenz anhand des *Mean* bestimmt werden.

Gerade für die Auswertung von schwach exprimierten Antigenen und Antigenen, die im Übergang einer ruhenden zur aktivierten Zelle zunehmend exprimiert werden, ist das korrekte Setzen der Marke von großer Bedeutung und oft problematisch. In diesen Fällen wurde neben der Prozentwertangabe auch die mittlere Fluoreszenzintensität (=Mean) der Proben berücksichtigt und verglichen. (Abb. 17)

Nach eben genannten Kriterien wurde eine **standardisierte Auswertemaske** für jede der 13 Antikörperkombinationen optimiert, so dass jede Probe nach denselben Kriterien bearbeitet werden konnte (siehe Anhang).

Als rechnerische Qualitätskontrolle der erhaltenen Ergebnisse wurden verschiedene Werte überprüft:

- Lymphozytensumme: $\%T (CD3+) + \%B (CD19+) + \%NK (CD16+/56+/3-) = 100+/-5\%$
- T-Zellen / Gate: Gleiche Prozentzahl von T-Zellen / Zellen im Gate in den verschiedenen Ansätzen beim gleichen Patienten
- CD4+/CD8+: $\%(CD3+/4+) + \%(CD3+/8+) = \%(CD3+) +/-5$

Die erhaltenen Prozent- und Meanwerte wurden für die unbehandelte und behandelte Patientengruppe und die Kontrollgruppe in Excel-Tabellen eingegeben und Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet.

2.3. Statistik

Vorliegende Studie wurde als explorative Studie angelegt. Als statistischer Test, also um die Signifikanz der Unterschiede zwischen den errechneten Werten von Patienten und Kontrollen zu erhalten, wurde der zweiseitige Student's t-Test für unverbundene Stichproben verwendet. Die Daten der Patienten, die vor und unter Neuroleptikatherapie untersucht wurden, wurden zusätzlich mit dem t-Test für verbundene Stichproben ausgewertet.

Für die Berechnung wurden auch Untergruppen der Patienten anhand des Phänotyps gebildet und versucht, Zusammenhänge von immunologischen Parametern mit psychopathologischem Befund und Verlauf der Erkrankung aufzudecken. Getrennt betrachtet und verglichen wurden folgende Gruppen (vgl. Kap. II: 1.4.2.):

- Neuroleptika-naive Patienten
- hoher PANSS-Score bei Aufnahme (gesamt>80 und global>40)
- Patienten mit gutem Therapieerfolg/Remission, sowie mäßigem/keinem Erfolg

Auch der Einfluss von Alter und Geschlecht auf die gemessenen Parameter wurde betrachtet.

III. Ergebnisse

1. T-Zellen (CD3)

1.1. Subpopulationen CD4 und CD8

Die Auswertung der Messung von CD3-positiven Lymphozyten (= T-Lymphozyten) und der Subpopulationen CD4 und CD8 erfolgte als Quadrantenanalyse, wobei für CD3+/CD8+ - Lymphozyten ein Gate gesetzt wurde (Abb. 18). Die Ergebnisse sind in Abbildung 19 und Tabelle 5 aufgeführt. Es wurden insgesamt mehr Patienten vor Behandlung (=„Unbehandelt gesamt“) untersucht, als nach Behandlung. Die Patienten, die nochmals untersucht werden konnten, wurden im Paartest vor und nach Behandlung gegenübergestellt (=„Gruppe der Behandelten“).

Es fand sich eine signifikante Erhöhung von CD4-positiven T-Zellen bei behandelten Schizophrenen im Vergleich zur Kontrollgruppe ($p < 0,05$). Dies spiegelt sich in der Gesamtzahl der T-Zellen wieder, die bei Schizophrenen nach Behandlung ebenfalls tendenziell höher war. Auch bei unbehandelten Schizophrenen waren die T-Zellen und die CD4+ -Zellen erhöht, jedoch unter dem Signifikanzniveau. Der Anteil an CD8+- T-Lymphozyten zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen. Es ist kein Behandlungseffekt zu beobachten.

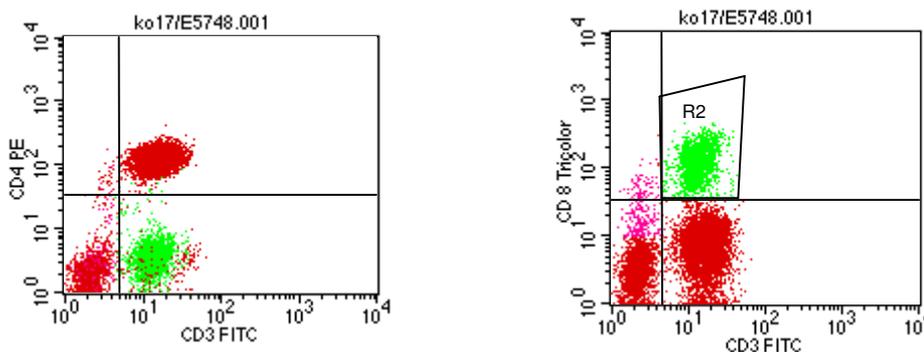


Abb. 18: Auswertung der CD3+/CD4+ (links) und CD3+/CD8+-Lymphozyten (rechts) mittels Quadrantenanalyse. Die doppelt positiven Lymphozyten finden sich jeweils im rechten oberen Quadranten. „R2“ entspricht dem Gate für die CD3+/CD8+-Zellen

Lymphozytenpopulation: (% peripherer Lymphozyten; Stabw)	CD3+ gesamt	CD3+/4+	CD3+/8+
Schizophrene Patienten:			
Unbehandelt gesamt	67.2±7.5	45.1±8.8	17.3±5.9
Gruppe der Behandelten:			
Unbehandelt	68.4±7.6	47.7±9.2	16.4±3.6
Behandelt	69.7±9.9	48.9±10.6*	16.5±3.5
Kontrollen	62.8±9.8	40.8±9.9	17.8±4.1

Tabelle 5: Ergebnis der Messung der CD3+-Lymphozyten und der Subpopulationen mit CD3/4- und CD3/8-Expression bei unbehandelten und behandelten Schizophrenen und Kontrollpersonen. Da nicht alle Patienten behandelt wurden, Vergleich der Gruppe der Therapierten im gepaarten t-Test vor Behandlung (=“Unbehandelt“) und nach Behandlung (=“Behandelt“). Prozentangaben von Mittelwert und Standardabweichung. * Unterschied zu Kontrollen signifikant mit $p < 0.05$

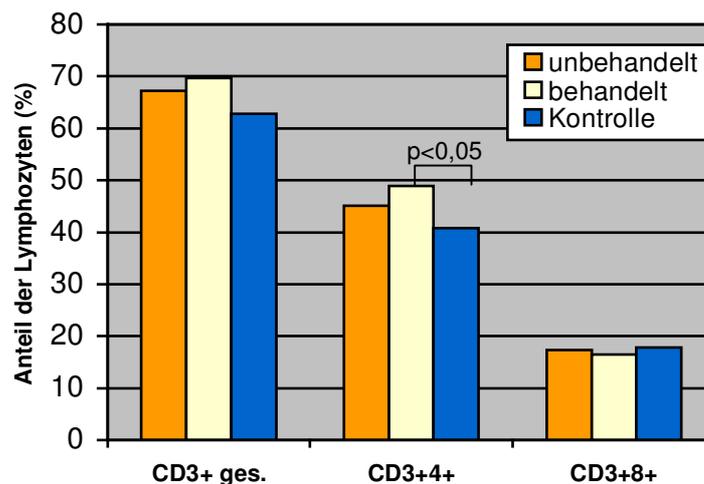


Abb. 19: Diagrammdarstellung der Ergebnisse aus Tabelle 5. Behandelte Patienten zeigen signifikant mehr CD3+/CD4+-Lymphozyten als gesunde Kontrollen.

1.2. „Naive“ T-Zellen (CD45RA)

Die Ergebnisse für die „naiven“ T-Zellen mit Expression von CD45RA sind in Abbildung 21 und Tabelle 6 dargestellt. Das Oberflächenmolekül CD45RA wurde in Kombination mit CD4+ und CD8+ gemessen. Die Auswertung erfolgte gemäss Abbildung 20. Bei schwieriger Abgrenzung von CD45RA-positiven Lymphozyten wurde zusätzlich die Histogrammdarstellung benutzt und die Mean-Werte der Expression auf CD4+ und CD8+ - Zellen erhoben. Betrachtet wurde die Expression bezogen auf CD4- und CD8-Zell

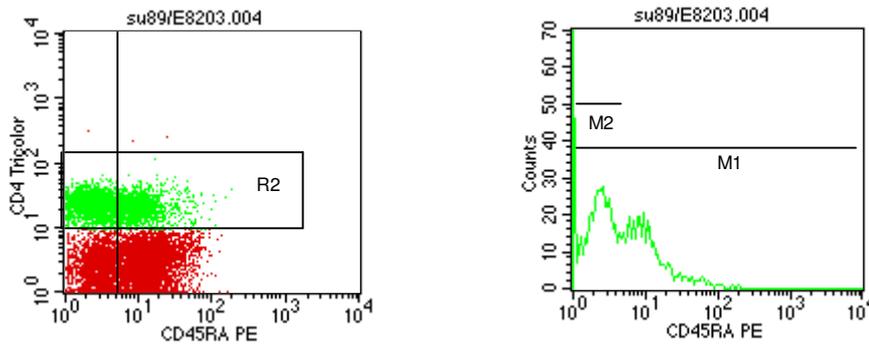


Abb. 20: Auswertung der CD45RA-positiven Lymphozytenpopulation. Dargestellt ist die Zweifarbenanalyse mit CD4/CD45RA. Zur zusätzlichen Auswertung der z.T. schwierigen Abgrenzung von CD45RA-positiven zu negativen Zellen in der Dot-Plot-Analyse erfolgte die Auswertung der Gesamtfluoreszenz ergänzend im Histogramm. Dazu wurden die CD4+-Lymphozyten im Gate R2 eingegrenzt. (Entsprechend für die CD8+-Lymphozyten)

Unbehandelte schizophrene Patienten hatten signifikant niedrigere Gesamtwerte von CD45RA+- Zellen als Kontrollen ($p < 0,05$); behandelte Patienten zeigten die gleiche Tendenz. Bei unbehandelten Schizophrenen fand sich eine verringerte Expression von CD45RA auf den CD4+- Lymphozyten ($p < 0,05$). Eine Erhöhung der Expression von CD45RA auf CD8-positiven Zellen unter Behandlung war nicht signifikant; in diese Richtung weist allenfalls der hohe Mean-Wert der CD45RA-Expression auf CD8+- Zellen Behandelter. Auffallend ist die große Streubreite der Expression von CD45RA vor allem bei den Patienten (vgl. Standardabweichungen). Die mitgeführte Interassay-Kontrolle dieser Markerkombination hatte für dieselbe Person geringere Standardabweichungen von $\pm 4,6$ für CD45RA+- gesamt, $\pm 3,5$ für CD4-/45RA+, $\pm 6,5$ für CD45RA+ auf CD4+ und $\pm 5,2$ für den Mean auf CD4+.

Expression von CD45RA: (% Lymphoz.; Stabw.)	gesamt	auf CD4+: CD45RA+	Mean auf CD4+	auf CD8+: CD45RA+	Mean auf CD8+
Schizophrene Patienten:					
Unbehandelt gesamt	55.0 \pm 10.5*	32.8 \pm 13.1*	9.4 \pm 3.6	54.8 \pm 14.1	18.7 \pm 5.7
Gruppe der Behandelten:					
Unbehandelt	54.8 \pm 10.1	34.3 \pm 11.3	9.2 \pm 3.5	52.5 \pm 13.8	17.2 \pm 5.2
Behandelt	55.7 \pm 12.4	36.7 \pm 13.6	10.2 \pm 3.8	56.9 \pm 14.5	22.0 \pm 8.9
Kontrollen	61.8 \pm 5.5	40.4 \pm 8.6	11.5 \pm 6.2	56.0 \pm 11	17.7 \pm 3.7

Tabelle 6: Ergebnis der Expression von CD45RA auf CD4+- und CD8+-Lymphozyten. Angabe von Prozentalem Anteil der CD45-Expression sowie Mean der Fluoreszenzintensität der jeweiligen Subpopulation. Einteilung vgl. Tabelle 5. * Unterschied zu Kontrollen signifikant mit $p < 0,05$

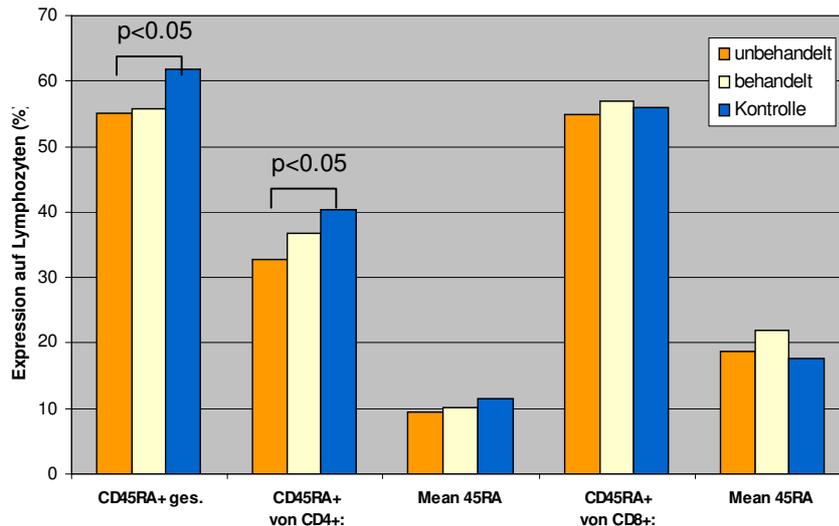


Abb. 21: Diagrammdarstellung der Ergebnisse aus Tabelle 6. Signifikant tiefere Expression von CD45RA auf Lymphozyten Schizophrener im Vergleich zur Kontrollgruppe, dabei signifikant tiefere Expression auf CD4+-Lymphozyten.

1.3. T-„Gedächtnis“-Zellen

1.3.1. Expression von CD45RO

Die Messung des Oberflächenmoleküls CD45RO, das nach Aktivierung an Stelle von CD45RA präsentiert wird und für die T-Gedächtniszelle kennzeichnend ist, wurde zusätzlich an einem größeren Panel schizophrener Patienten durchgeführt. Insgesamt konnten dazu Daten von 72 unbehandelten und 36 behandelten Individuen ausgewertet werden. Tabelle 7 und Abbildung 22 veranschaulichen die Ergebnisse.

Expression von CD45RO: (% Lymphoz.; Stabw.)	gesamt	CD4+/ 45RO+	auf CD4+: 45RO+	CD8+/ 45RO+	auf CD8+: 45RO+
Schizophrene Patienten:					
Unbehandelt gesamt	27.1±8.7*	15.8±5.3	38.8±10.9	4.0±1.9	25.0±7.9
Gruppe der Behandelten:					
Unbehandelt	27.7±7.7	16.0±5.3	38.8±10.2	4.1±1.8	26.0±7.6
Behandelt	30.6±10****	18.2±6.1*	41.3±13.7*	5.0±3.6*	29.7±11.0*
Kontrollen	23.1±8.1	14.0±5.8	35.2±11.5	3.7±1.8	22.4±8.7

Tabelle 7: Ergebnis der Expression von CD45RO auf Lymphozyten, Anteil von CD4+/CD45RO+- und CD8+/CD45RO+-Zellen sowie Anteil der CD45RO-positiven Zellen der jeweiligen Subpopulation. Einteilung vgl. Tabelle 5. **** Unterschied zu Kontrollen signifikant mit $p < 0.001$; * $p < 0.05$

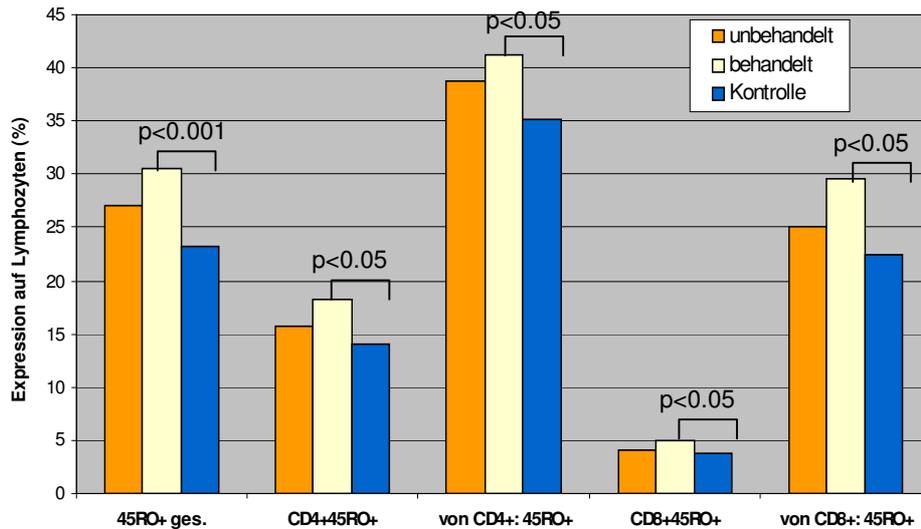


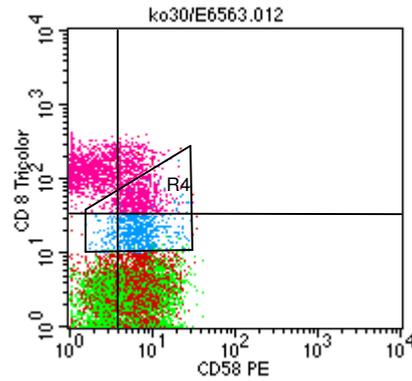
Abb. 22: Diagrammdarstellung der Ergebnisse aus Tabelle 7. Signifikant nonere Expression von CD45RO auf Lymphozyten behandelter Patienten im Vergleich zu Kontrollen, sowohl auf CD4- als auch auf CD8-positiven Lymphozyten.

Auffallend ist hier, dass während der Behandlung die Expression von CD45RO auf Lymphozyten deutlich zunimmt: von 23% bei Kontrollen auf 31% bei Schizophrenen nach Neuroleptikabehandlung ($p < 0,001$). Man sieht sowohl vermehrt CD4-, als auch CD8-positive T-Gedächtniszellen. Neben der Zahl von CD4+/ CD45RO+ -Zellen ($p < 0,05$) ist auch die Expression von CD45RO bezogen auf die CD4+-Zellen erhöht ($p < 0,05$). Die Prozentzahl CD45RO-tragender CD8+- Lymphozyten ist mit 3,7% bei Kontrollpersonen viel geringer. Gleichwohl zeigt sich auch hier ein Behandlungseffekt mit einem signifikanten Anstieg dieser Population ($p < 0,05$), ebenso erkennbar die höhere CD45RO-Expression auf CD8+-Lymphozyten ($p < 0,05$). Aber auch vor Behandlung beobachtet man bei Schizophrenen eine Erhöhung des Anteils CD45RO- positiver Zellen ($p < 0,05$).

1.3.2. Expression von CD58 und CD60

CD58 (=LFA-3) ist ein Adhäsionsmolekül, das an CD2 bindet und auf T-Gedächtniszellen stark exprimiert wird. Auch CD60 kommt auf einer Subpopulation von T-Gedächtniszellen vor (Wada et al., 1998). Beide Oberflächenmoleküle wurden in Kombination mit CD4 und CD8 bestimmt und ausgewertet. In der CD58-Auswertung wurde ein Gate (R4) für die NK-Zellen eingefügt (vgl. Abb. 23). Die Grenzsetzung zwischen „positiv“ und „negativ“ erfolgte mit Hilfe der Isotyp-Kontrolle und der Histogrammdarstellung. Die Expression von CD58 und CD60 auf CD4+- Lymphozyten ist jeweils in den ersten Spalten von Abbildung 24 und Tabelle 8 zu finden.

Abb. 23: Auswertung der CD58- und CD8-Expression auf Lymphozyten. Dabei stellen sich die NK-Zellen als Population mit mittlerer Expression von CD8 und hoher Expression von CD58 dar, die im Gate R4 getrennt betrachtet werden.



Expression von CD58 und CD60: (% Lymphoz.; Stabw.)	CD4+/ 58+	Mean v. CD58 auf CD4+	CD8+/ 58+	Mean v. CD58 auf CD8+	Mean v. CD58 auf NK	CD4+/ 60+	CD8+/ 60+
Schizophrene Patienten:							
Unbehandelt gesamt	17.7±7.8*	6.7±2.3	9.7±5.3	7.1±2.8	8.3±2.7	11.6±4.4**	2.5±1.8
Gruppe der Behandelten:							
Unbehandelt	19.2±7.5	6.8±2.2	11.6±5.7	7.5±2.9	8.5±2.6	11.8±2.9	2.2±1.4
Behandelt	19.0±7.8**	7.2±1.6***	11.1±4.5	8.4±4.3	9.0±1.3****	10.3±2.7*	2.1±1.5
Kontrollen	13.0±4.0	5.6±1.1	10.4±5.3	6.0±3.3	7.3±1.2	8.5±1.9	2.5±1.5

Tabelle 8: Ergebnis der Messungen der Expression von CD58 und CD60 jeweils auf CD4- und CD8-positiven Lymphozyten. Auswertung auch des Mean-Wertes der Fluoreszenz zur Beurteilung der Expressionsstärke der gesamten Population. Einteilung vgl. Tabelle 5. **** Unterschied zu Kontrollen signifikant mit $p < 0.001$; *** $p < 0.005$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$

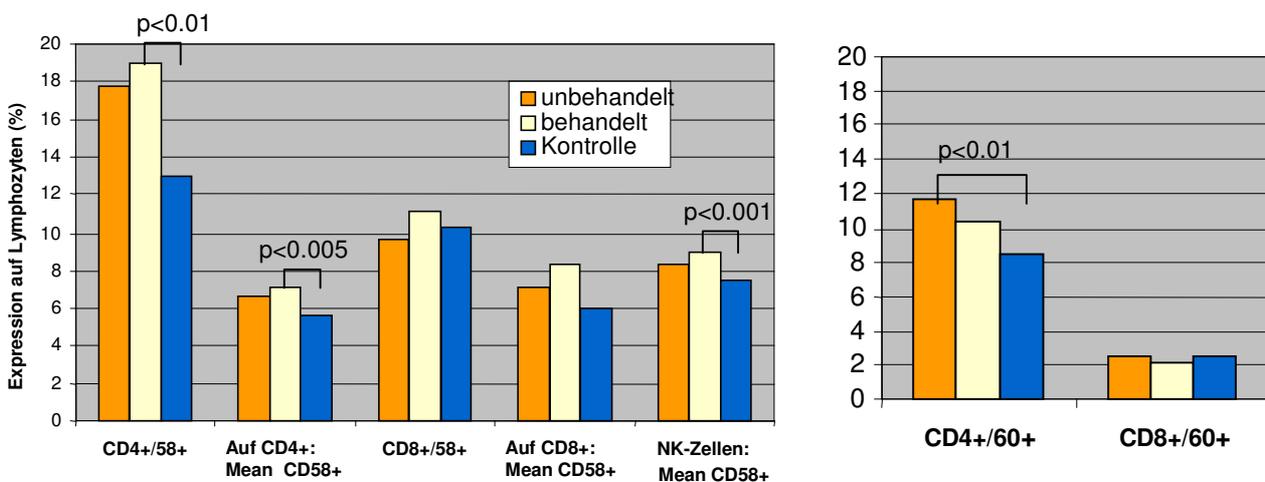


Abb. 24: Diagrammdarstellung der Ergebnisse aus Tabelle 8. Signifikante Erhöhung der Expression von CD58 auf CD4+-Lymphozyten bei Schizophrenen, insbesondere nach Behandlung. Erhöhte mittlere Expression von CD58 auch auf Natürlichen Killerzellen nachweisbar. CD60 wird signifikant mehr auf CD4+-Lymphozyten Schizophrener exprimiert.

Schizophrene (unbehandelt und behandelt) hatten einen signifikant höheren Anteil an CD4+/58+- Zellen als Kontrollen ($p < 0,05$ und $p < 0,01$). Die Mean-Werte der Expression von CD58 auf CD4+ waren nach Behandlung entsprechend erhöht ($p < 0,005$). Zusätzlich deutlich erhöht waren die Mean-Werte für CD58 auf NK-Zellen nach Behandlung ($p < 0,001$). Auch der Anteil an CD4+/60+- Zellen war bei unbehandelten und behandelten Schizophrenen signifikant höher ($p < 0,01$ und $p < 0,05$) als bei Kontrollen. CD60 ist auf CD8+- Zellen nur schwach exprimiert. Die Mean-Werte der Expression auf CD8+ und CD4+- Zellen unterschieden sich nicht signifikant (hohe Standardabweichung, Daten nicht gezeigt).

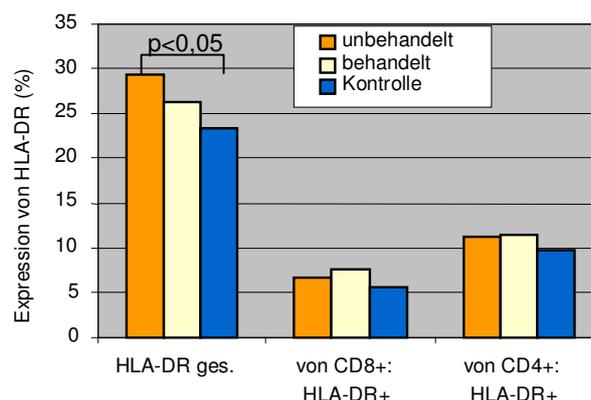
1.4. Expression von HLA-DR

HLA-DR wurde als später Aktivierungsmarker für T-Zellen in Kombination mit CD4 und CD8 bestimmt und unter Verwendung der Histogrammdarstellung ausgewertet. Die Lymphozyten der untersuchten Schizophrenen exprimierten häufiger das HLA-DR-Molekül als Kontrollen ($p < 0,05$), wobei bei behandelten Personen tendenziell häufiger HLA-DR auf CD8+- T-Lymphozyten gefunden wurde (Abb. 25 und Tabelle 9). Bei Einbeziehen einer Untersuchung von weiteren 41 Patienten, von denen 20 auch nach Behandlung getestet wurden, bestätigte sich der Trend der Erhöhung von HLA-DR-positiven T-Zellen. Hier war bei Unbehandelten und Behandelten die Expression auf CD4-Zellen erhöht.

Expression von HLA-DR: (% Lymphozyten; Stabw)	gesamt	auf CD8+	auf CD4+
Schizophrene Patienten:			
Unbehandelt gesamt	29.3±8.7*	6.8±2.7	8.1±2.7
Gruppe der Behandelten:			
Unbehandelt	28.3±9.3	6.9±3.0	7.7±2.6
Behandelt	26.4±11.1	7.6±3.4	8.5±2.6
Kontrollen	23.3±6.1	5.7±2.5	7.5±2.4

Tabelle 9: Ergebnis der Messung der Expression von HLA-DR auf Lymphozyten, sowie getrennt für CD4- und CD8-positive Lymphozyten. Einteilung vgl. Tabelle 5. * Unterschied zu Kontrollen signifikant mit $p < 0,05$

Abb. 25: Darstellung der Ergebnisse aus Tabelle 9. Signifikant höhere Expression von HLA-DR auf Lymphozyten bei unbehandelten Patienten im Vergleich zur Kontrolle.



2. Natürliche Killerzellen (NK-Zellen, CD16/56)

Die Messung von CD16 und CD56 wurde in Kombination mit CD3 und dem TCR- γ/δ durchgeführt. Die Darstellung beschränkt sich auf die Befunde für die CD16/56-Expression. In der Abbildung 26 sind beispielhaft die Ergebnisse für einen schizophrenen Patienten und eine Kontrollperson dargestellt. Wie auch der Tabelle 10 zu entnehmen ist haben Patienten, die akut an Schizophrenie erkranken deutlich weniger natürliche Killerzellen als gesunde Individuen ($p < 0,001$); ein Befund, der unter Behandlung kaum Änderung zeigt (Vgl. behandelt / Kontrollen: $p < 0,05$). Eine geringe Zahl von T-Lymphozyten exprimiert unverändert CD16/56. Wie oben beschrieben, wurde auf NK-Zellen von Betroffenen eine stärkere Expression von CD58 gefunden ($p < 0,001$).

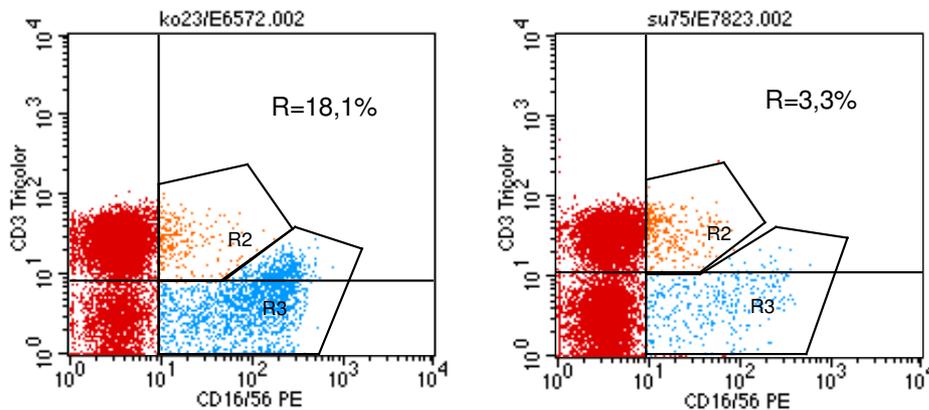


Abb. 26: Auswertung der Zwei-Farbenanalyse mit Antikörpern CD16/56-PE und CD3-Tricolor®. Die Kontrollperson (links) hat deutlich mehr CD3-/CD16/56+- NK-Zellen (= Gate R3) als der unbehandelte Patient.

Population CD16+/56+: (% Lymphozyten; Stabw)	gesamt	CD3+/16+/56+	NK-Zellen: CD3-/16+/56+
Schizophrene Patienten:			
Unbehandelt gesamt	12.7±5.7****	5.6±1.1	10.1±5.6****
Gruppe der Behandelten:			
Unbehandelt	13.6±5.2	3.0±0.9	10.6±5.4
Behandelt	14.6±4.5*	3.2±0.8	11.4±4.7*
Kontrollen	20.9±9.2	3.3±1.9	17.7±8.3

Tabelle 10: Anteil der Expression von CD16/56 auf Lymphozyten Schizophrener, Auswertung bzgl. CD3-negativer Zellen (=Natürliche Killerzellen). Einteilung vgl. Tabelle 5. **** Unterschied zu Kontrollen signifikant mit $p < 0,001$; * $p < 0,05$

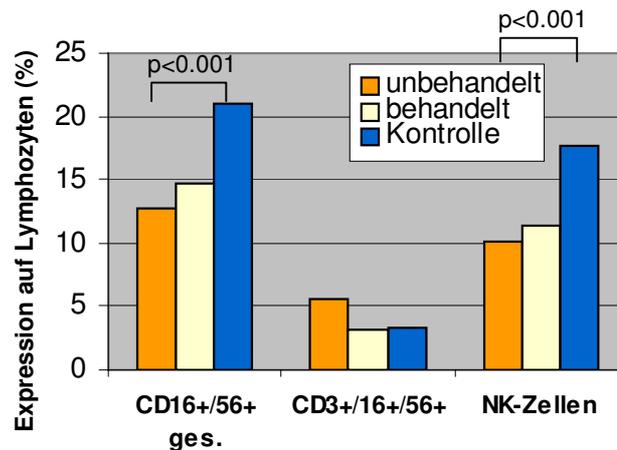


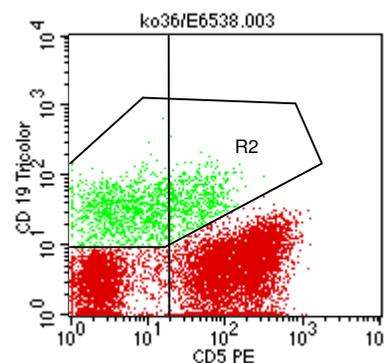
Abb. 26: Darstellung der Expression von CD16/56 auf Lymphozyten Schizophrener. Signifikant tieferer Anteil an Natürlichen Killerzellen bei Schizophrenen vor und nach Behandlung im Vergleich zu Kontrollen..

3. B-Zellen (CD19) und Expression von CD5

Die Expression von CD5 auf B-Zellen, die das Oberflächenmolekül CD19 tragen, wurde gemäss Abbildung 27 ausgewertet. Zwar hatten Patienten etwas mehr B-Lymphozyten als Kontrollen, diese zeigten aber eine signifikant geringere Expression von CD5, insbesondere vor Behandlung ($p < 0,001$), aber auch danach ($p < 0,05$). Um diesen Effekt besser beurteilen zu können, wurde die kleine Population stark positiver CD5- B-Zellen gesondert betrachtet. Es zeigte sich eine – jedoch nicht signifikante - Erniedrigung vor allem bei behandelten Schizophrenen. Allerdings fällt in der Gruppe der Patienten mit hoher CD5-Expression auf, dass man bei fast allen auch eine Erhöhung des lymphozytären Anteils an B-Zellen auf $>20\%$ feststellen kann. Im Gegensatz dazu liegt bei Kontrollpersonen mit hoher CD5-Expression nur selten ein hoher B-Zellanteil vor (1 Person von 6). Auch CD19-negative T-Zellen exprimierten unterschiedlich CD5. Hier hatte die unbehandelte schizophrene Gruppe deutlich höhere Werte als Kontrollen ($p < 0,05$; siehe Abb. 27 und Tabelle 11).

Abb. 27: Auswertung der CD5/19-

Expression. Das Gate R2 wurde gesetzt zur Betrachtung der CD19-positiven B-Zellen. Im rechten oberen Bereich werden Zellen mit hoher CD5-Expression erfasst.



Expression von CD5/CD19: (% Lymphozyten; Stabw)	CD19+ ges.	auf CD19+: CD5+	CD19+/5++	CD19-/5+
Schizophrene Patienten:				
Unbehandelt	13.4±5.9	27.3±7.3****	1.4±1.1	71.3±6.1*
Gruppe der Behandelten:				
Unbehandelt	12.3±4.7	27.0±6.8	1.0±0.4	72.4±5.8
Behandelt	12.3±5.9	29.6±8.6*	1.3±0.8	71.8±8.5
Kontrollen	10.6±3.2	39.2±13.2	1.9±1.2	65.3±11.6

Tabelle 11: Ergebnis der CD5-Expression auf CD19-positiven Zellen. Angabe des Anteils der CD19+-B-Zellen, die CD5 exprimieren und des Anteils an Zellen mit starker Expression von CD5 (++). Einteilung vgl. Tabelle 5. **** Unterschied zu Kontrollen signifikant mit $p < 0.001$; * $p < 0.05$.

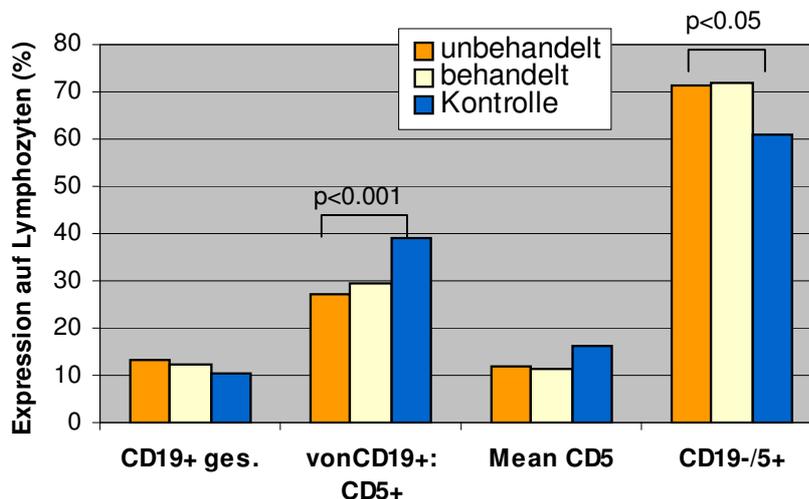


Abb. 28: Darstellung der Ergebnisse aus Tabelle 11. Der Anteil CD19+-Lymphozyten mit Expression von CD5 ist bei unbehandelten und behandelten Schizophrenen signifikant erniedrigt. Veränderungen im Mean (und in starker Expression) von CD5 liegen unter dem Signifikanzniveau.

4. Interleukinrezeptoren

Es wurde eine Messung von weiteren Oberflächenmolekülen auf CD4+ und CD8+- Zellen durchgeführt, die Interleukinrezeptoren von Lymphozyten repräsentieren: von **CD25**, der α -Kette des IL-2 Rezeptors, sowie von **CD126**, einer Untereinheit des IL-6-Rezeptors, die auf aktivierten B- und Plasmazellen stark exprimiert wird. Dabei stellte sich heraus, dass die Expression dieser Moleküle auf Lymphozyten zu gering ist, um positive von negativen zuverlässig abgrenzen zu können. Dies bedingt, dass ein Setzen des Cursors schwierig ist, da die Fluoreszenzstärke kaum über die der Isotyp-Kontrolle hinausreicht. Unterschiede sind vor allem anhand der Mean-Werte festzustellen.

Gleichwohl erreichten die gemessenen Werte für den IL-2 Rezeptor Signifikanzniveau. So hatte die Gruppe der Schizophrenen nach Behandlung $4,4 \pm 1,9\%$ CD4+/25+- Lymphozyten; damit im Vergleich zu Kontrollen ($1,8 \pm 1,0\%$) hochsignifikant mehr ($p < 0,0001$). Gleichzeitig lag der Mean mit $4,7 \pm 0,6$ höher als bei Kontrollen ($3,7 \pm 0,5$; $p = 0,0001$). Im Vergleich vor/nach Behandlung waren die Unterschiede ebenfalls signifikant. Dieselben Patienten hatten mit $3,1 \pm 2,7\%$ CD4+/25+- Zellen und einer mittleren Expression von CD25 von $4,2 \pm 0,8$ vor Medikation niedrigere Werte als danach ($p < 0,05$; Abb. 29 und Tabelle 12).

Die Auswertung der Messung von CD126 auf T-Lymphozyten ergab keine signifikanten Veränderungen.

Expression von CD25: (% Lymphozyten; Stabw)	CD4+/25+	Mean von CD25	CD8+/25+
Schizophrene Patienten:			
Unbehandelt gesamt	2.4 ± 2.2	4.2 ± 0.9	0.6 ± 2.1
Gruppe der Behandelten:			
Unbehandelt	3.1 ± 2.7	$4.2 \pm 0.8^*$	1.1 ± 2.8
Behandelt	$4.4 \pm 1.9^{*****}$	$4.7 \pm 0.6^{*****}$	0.4 ± 0.9
Kontrollen	1.8 ± 1.0	3.8 ± 0.5	0.2 ± 0.4

Tabelle 12: Messergebnis der Expression von CD25 auf CD4- und CD8-positiven Zellen. Einteilung vgl. Tabelle 5. ***** Unterschied zu Kontrollen signifikant mit $p < 0,0001$; * Unterschied zu **Behandelten** signifikant mit $p < 0,05$

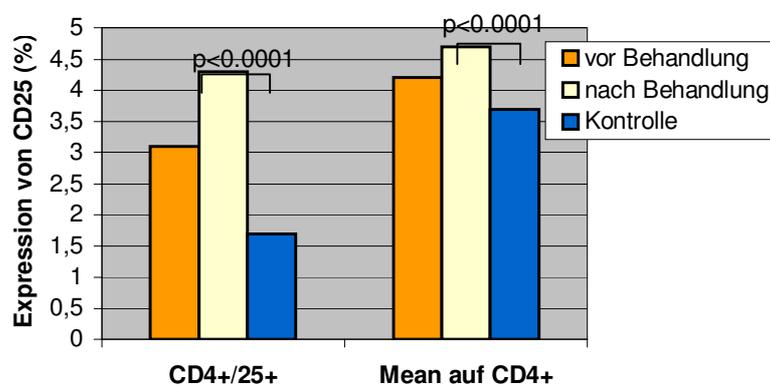


Abb. 28: Darstellung der Ergebnisse aus Tabelle 12. Signifikant höherer Anteil CD4+/25+-Lymphozyten bei Schizophrenen nach Behandlung.

Auf die Analyse der Expression von Adhäsionsmolekülen (CD62l, 49d, 11a) und des TCR- γ/δ soll hier nicht näher eingegangen werden. Diese Parameter sind Gegenstand einer anderen Arbeit (vgl. Müller et al., 1998b und 1999a).

5. Vergleich mit Phänotypen

Zur Identifizierung möglicher Subgruppen der schizophrenen Patienten und zur Evaluation des Einflusses von Neuroleptikabehandlung und des Zusammenhanges der immunologischen Veränderungen mit psychopathologischem Befund und Therapieansprechen wurden Untergruppen anhand dieser Parameter gebildet und gesondert betrachtet. Eine Gruppe bestand aus Patienten mit Erstmanifestation der Schizophrenie, also Neuroleptika-naiven Patienten (10 Patienten). Als zweite Gruppe wurden Patienten mit hohem PANSS-Wert (Gesamtscore >80, Globalscore >40) als Ausdruck einer ausgeprägten psychopathologischen Symptomatik (16 Patienten) mit anderen Patienten und Kontrollen verglichen. Im dritten Vergleich wurden die Patienten in solche mit gutem und schlechtem Therapieerfolg eingeteilt (12 vs 14 Patienten; vgl. Kapitel II: 1.4.2. und 2.3.).

Patienten mit **Erstmanifestation** zeigten keine signifikanten Unterschiede der beschriebenen lymphozytären Subpopulationen zu Patienten, die bereits Neuroleptika erhalten hatten. Als signifikant unterschiedlich zur Kontrollgruppe fanden sich folgende Werte (vgl. Tabelle 13): Eine signifikante Erniedrigung von CD16+/56⁻- Zellen bei unbehandelten Schizophrenen ($p < 0,05$) ohne signifikante Veränderung der NK-Zellpopulation selbst. Ebenso zeigte sich eine verminderte Expression von CD5 auf CD19⁻- Zellen bei Patienten mit Erstmanifestation vor und nach Behandlung ($p < 0,01$; $p < 0,05$). Der Mean der Expression von CD58 auf CD4⁺ und auf NK-Zellen lag bei behandelten Schizophrenen über dem Wert bei Kontrollen ($p < 0,05$). Auch hatten Neuroleptika-naive Patienten eine signifikante Erhöhung von CD4⁺/25⁻- Lymphozyten nach Behandlung ($p < 0,001$) mit einer Erhöhung des Mean von CD25 auf diesen Zellen ($p < 0,005$). Diese Befunde und auch die Werte nicht signifikant veränderter Parameter sind insgesamt in etwa vergleichbar mit der untersuchten Gesamtpopulation der Schizophrenen.

Auch in der Gruppe der Patienten mit **hohem PANSS-Score** bei Aufnahme konnten keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zu den übrigen Patienten gefunden werden. Im Vergleich zu gesunden Kontrollen unterschiedliche Befunde sind in Tabelle 13 aufgeführt. Die Patienten hatten erwartungsgemäß signifikant weniger CD16+/56⁺ und NK-Zellen ($p < 0,001$). Ebenso bestand eine geringere CD5-Expression auf CD19⁻- Zellen ($p < 0,005$).

Signifikant erhöht war der Mean der Expression von CD45RO auf CD8+- Zellen ($p < 0,05$), jedoch nicht die Population CD8+/45RO+. Eine Erhöhung von CD4+/58+ und CD4+/60+- Lymphozyten wurde in dieser Gruppe signifikant bestätigt ($p < 0,05$). Es fand sich vermehrt HLA-DR auf Lymphozyten ($p < 0,05$), doch wie in der Gesamtgruppe keine signifikanten Veränderungen bezogen auf T-Zellpopulationen.

Die beiden Gruppen mit **gutem und schlechtem Therapieerfolg** hatten vor Behandlung zwar im gegenseitigen Vergleich keine signifikant unterschiedlichen Veränderungen, jedoch erreichten beide unterschiedliche Signifikanzniveaus im Bezug auf Kontrollpersonen. In beiden Gruppen waren wiederum CD16+/56+ und NK-Zellen erniedrigt: In der Gruppe mit gutem Outcome mit $p < 0,005$ und $p < 0,001$; in der kaum klinisch gebesserten Gruppe weniger ausgeprägt mit $p < 0,05$. In der Messung CD5/19 zeigten beide Gruppen eine erniedrigte Expression von CD5+ auf CD19+- Lymphozyten, wobei die Patienten mit **gutem Ansprechen** auf Therapie ein Signifikanzniveau von $p < 0,005$ erreichten und eine deutlich niedrigere Expression zeigten als die Gesamtgruppe. Auch lag einzig bei dieser Gruppe eine signifikante Erniedrigung der stark CD5-exprimierenden Zellen vor ($p < 0,05$). Gleichzeitig hatte die „erfolgreiche“ Gruppe einen sehr hohen Anteil CD5-negativer CD19+-Zellen ($p < 0,005$). Sehr hohe Werte erreichte der Anteil von CD4+/60+- Lymphozyten mit $13,5 \pm 4,2\%$ in dieser Gruppe ($p < 0,0005$) - im Vergleich dazu hatten die Schizophrenen insgesamt $11,6 \pm 4,4\%$.

In der Gruppe der **schlecht ansprechenden Patienten** fielen vor allem Veränderungen von CD45RA, CD45RO und HLA-DR auf, die in der Gruppe mit gutem Erfolg nicht signifikant nachweisbar waren. Neben einer ausgeprägten Verringerung der Expression von CD45RA auf allen Lymphozyten - noch unter die Werte des Gesamtdurchschnitts bei Schizophrenen - ($p < 0,001$), sieht man eine signifikant reduzierte Expression auf CD4+- Zellen mit $28,5 \pm 10,2\%$ ($p < 0,005$). Umgekehrt war die CD4+/45RO+- Population stark erhöht mit $17,4 \pm 6,3\%$ ($p < 0,05$). Im Vergleich dazu hatte die Gesamtpopulation der Patienten eine Expression von CD45RA auf $32,8 \pm 13,1\%$ der CD4+-Lymphozyten und einen Anteil von $15,8 \pm 3\%$ CD4+/45RO- Zellen. Ebenfalls signifikant erhöht war die HLA-DR Expression ($p < 0,05$) und der Mean von CD25 auf CD4+ ($p < 0,05$), sowie in beiden Gruppen – den gut und schlecht Ansprechenden – der Anteil von CD4+/58+- Lymphozyten ($p < 0,05$ und $p < 0,01$).

Die Unterschiede in der Auswirkung antipsychotischer Therapie wurden deutlicher beim Vergleich der Lymphozyten-Subpopulationen beider (obwohl kleiner) Gruppen **nach neuroleptischer Therapie**. Hier konnten in der Gruppe der gut ansprechenden Patienten 7

Proben untersucht und mit 6 Proben von schlecht ansprechenden Patienten verglichen werden. Diese Ergebnisse sind unten in Tabelle 13 aufgeführt. Nach Behandlung hatten Patienten mit geringem Therapieerfolg deutlich weniger CD4+/45RA+- Zellen und eine signifikant niedrigere Expression von CD45RA auf CD4+ ($p < 0,05$), sowie umgekehrt einen über 1,5-fach höheren CD4+/45RO+- Zellanteil ($21,3 \pm 4,8\%$ vs $13,5 \pm 4,2\%$) mit signifikant höherer Expression von CD45RO auf CD4+ ($50,6 \pm 9,3$ vs $27,0 \pm 7,0$; $p < 0,01$; $p < 0,001$). Auch die Expression von CD45RO auf Lymphozyten insgesamt war mit $30,5 \pm 7,0\%$ im Unterschied zu $22,1 \pm 5,9\%$ bei Patienten mit gutem Therapieerfolg signifikant erhöht ($p < 0,05$). Gleichzeitig wurde eine erhöhte mittlere Expression von CD58 auf CD4+-Zellen und ein höherer Prozentsatz CD4+/58+- Lymphozyten gefunden ($p < 0,01$; $p < 0,05$). Die Zunahme des Mean von CD25 auf CD4+ war ebenso bei schlecht therapierbaren Patienten signifikant ($p < 0,05$). Auffallend ist der Befund einer Erniedrigung der CD8+- T-Zellpopulation auf $13,7 \pm 3,4\%$ signifikant unter das Niveau bei Patienten mit gutem Therapieerfolg ($18,4 \pm 2,1\%$, $p < 0,01$).

Zur Abschätzung des **Alter**seinflusses auf die Lymphozytensubpopulationen wurden Patienten über 35 Jahre mit jüngeren Patienten verglichen. Die älteren Patienten hatten signifikant weniger CD8+/58+- Lymphozyten als die jüngeren ($7,2 \pm 3,4\%$ vs $12,5 \pm 5,7\%$; $p < 0,05$) und mehr CD4+/25+- Lymphozyten ($4,4 \pm 3,6\%$ vs $1,8 \pm 1,0\%$; $p < 0,01$). Dabei ist zu bemerken, dass die Population der schizophrenen Patienten insgesamt etwas älter als die der Kontrollen war, nämlich $32,7 \pm 8,9$ Jahre zu 28 ± 5 Jahre. Allerdings konnten im Vergleich Schizophrene / Kontrollen keine Unterschiede bzgl. der CD8+/58+- Zellen ausgemacht werden. Es lag hingegen eine eher höhere Expression von CD58 auf Lymphozyten Schizophrener im Vergleich zu Kontrollen vor, die durch eine Erhöhung von CD4+/CD58+ deutlich wurde, so dass möglicherweise dieser Befund durch das höhere Alter der Patienten maskiert wird. Die signifikante Erhöhung von CD4+/25+ in höherem Alter entspricht den Befunden bei Schizophrenen, könnte also zum Teil altersbedingt sein. Betrachtet man allerdings die Gruppen von gut und schlecht therapierbaren Patienten, so zeigen beide Gruppen jeweils einen vergleichbaren Anteil an älteren Patienten mit 6/14 der gut und 4/12 der schlecht ansprechenden Patienten über 35 Jahre. Die erhöhte CD25- Expression, die sich dort im Vergleich bei den schlecht therapierbaren Patienten zeigt, kann also nicht durch den Alterseinfluss erklärt werden.

Bezüglich **Geschlecht**sunterschieden hatten Frauen mehr CD8+/60+- Lymphozyten als Männer ($3,3 \pm 2,1\%$ vs $1,6 \pm 0,8\%$; $p < 0,05$) und signifikant niedrigere Mean-Werte der CD45RA-Expression auf CD4+ und CD8+- Zellen, sowie weniger CD4-/45RA+- Zellen

($39,5 \pm 6,7\%$ vs $45,8 \pm 8,4\%$; $p < 0,05$). Die Gruppe der untersuchten Schizophrenen enthielt etwas mehr Frauen als Männer (1,2:1), die Kontrollgruppe verhielt sich umgekehrt mit mehr Männern im Verhältnis w:m = 1:1,4. Kein Einfluss ist dadurch auf die CD8+/60+- Zellen auszumachen, da sich diesbezüglich keine signifikanten Veränderungen bei Schizophrenen nachweisen ließen. Allenfalls könnte im Sinne einer höheren allgemeinen CD60-Expression bei Frauen die Erhöhung von CD4+/60+- Lymphozyten bei Schizophrenen durch den erhöhten Frauenanteil mitbedingt sein. Auch dass das Oberflächenmolekül CD45RA bei Frauen weniger exprimiert wird, kann teilweise das Ergebnis der erniedrigten Expression der Schizophrenen-Gruppe beeinflusst haben. Betrachtet man allerdings die Untergruppe der schlecht ansprechenden Patienten, bei denen die Expression von CD45RA am deutlichsten reduziert ist, kann man eine ausgeglichene Geschlechtsverteilung feststellen. Im Vergleich dazu hat die Gruppe der gut Ansprechenden, in der ein Frauenüberschuss (8/12 Pat.) vorliegt, trotzdem eine höhere Expression von CD45RA. Auch ist zu beachten, dass eine CD45RA-Verminderung mit einer Erhöhung von CD45RO einhergeht, die ebenfalls in der „grossen“ Population der Schizophrenen beobachtet wurde. Dies kann bei einer Geschlechtsverteilung von w:m = 1:1,6 keineswegs durch den Frauenanteil erklärt werden, sondern würde ein gegenteiliges Verhältnis erwarten lassen.

Tabelle 13: Dargestellt sind signifikant veränderte Parameter in unterschiedlichen Subgruppen schizophrener Patienten im Vergleich zur Kontrollpopulation, sowie im Vergleich die Gruppen mit gutem / schlechtem Therapieerfolg nach Behandlung. (* p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,005; **** p<0,0001)

Expression bei Patienten-Subgruppen (% Lymphozyten; Stabw)	CD16+/56+	NK-Zellen	CD5+ auf CD19+ / CD5++/19+	CD5+/19-	CD45RA+ gesamt auf CD4+	CD4+/58+	Mean CD58 auf CD4+		CD4+/60+	HLA-DR gesamt	CD4+/25+ Mean CD25 auf CD4+	
							auf NK	auf CD4+			HLA-DR gesamt	Mean CD25 auf CD4+
Neuroleptika-naive Unbehandelt:	13.8±7.1*	n.s.	25.5±6.5**	n.s.	n.s.	n.s.	6.7±2.7*	8.5±3.2*	n.s.	n.s.	2.6±1.3	4.3±1.2
Behandelt:	15.6±4.2*	n.s.	26.0±4.9*	n.s.	n.s.	n.s.	7.1±2.2	8.7±2.6	n.s.	n.s.	4.4±1.7****	4.8±1.1****
hoher PANSS-Score	11.4±4.4****	9.0±4.4****	26.7±8.4****	n.s.	n.s.	n.s.	17.3±7.4*	n.s.	11.7±5.4*	30.5±9.5*	n.s.	n.s.
Therapieerfolg gut	11.0±2.9****	8.0±3.0****	25.1±7.9****	73.0±5.4*	n.s.	n.s.	17.2±6.5*	n.s.	13.5±4.2****	n.s.	n.s.	n.s.
schlecht	14.4±6.4*	12.0±6.3*	29.4±6.7*	n.s.	n.s.	52.2±8.3****	19.2±8.4**	n.s.	n.s.	28.0±6.2*	n.s.	4.5±1.1*
Kontrollen	20.9±9.2	17.7±8.3	39±13.2	65.3±11.6	61.8±5.5	13.0±4.0	5.6±1.1	7.3±1.2	8.5±1.9	23.3±6.1	1.8±1.0	3.8±0.5
Subgruppen „Therapieerfolg +/-“ im Vergleich:	CD3+/8+	CD4+/CD45RO+	CD45RO+ auf CD4+	CD4+/CD45RA+	CD45RA+ gesamt auf CD4+	CD4+/58+	Mean CD58 auf CD4+	CD4+/60+	HLA-DR gesamt	CD4+/25+ Mean CD25 auf CD4+	n.s.	n.s.
nach Behandlung: gut	18.4±2.1**	13.5±4.2**	27.0±7.0****	20.9±6.0*	n.s.	14.2±4.1**	6.4±1.3*	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	4.3±0.7*
schlecht	13.7±3.4**	21.3±4.8**	50.6±9.3****	12.2±6.4*	n.s.	24.5±7.2**	8.3±1.6*	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	5.1±0.3*

IV. Diskussion

Seit langem wurden Veränderungen des Immunsystems bei Schizophrenen beschrieben. Es gibt neben dem klinischen Bild, das sich wie Autoimmunkrankheiten mit Krankheitsbeginn im Erwachsenenalter und einem chronisch progredienten und rezidivierenden Verlauf präsentiert, auch eine Reihe immunologischer Befunde, die stark auf die Involvierung des Immunsystems in der Pathogenese der Schizophrenie hinweisen. So liegen Berichte vor über Veränderungen im zellulären Immunsystem mit Unterschieden in Lymphozyten-Subpopulationen, Veränderungen im Zytokinsystem, die Produktion von Auto-Antikörpern und Störungen der Blut-Hirnschranke (vgl. Kapitel I: 1.1.4.). Moderne Techniken und neue Einsichten in immunologische Vorgänge erlauben es, die Rolle des Immunsystems in der Pathogenese psychiatrischer Erkrankungen differenzierter zu betrachten und zu einem Gesamtbild zusammenzufügen. In dieser Arbeit wurden mit der modernen Technik der Dreifarben-Durchflusszytometrie verschiedene Subpopulationen von Lymphozyten untersucht, die mit der Aktivierung des Immunsystems und autoimmunologischen Prozessen in Zusammenhang stehen.

Die Bestimmung der B-Zellen und der beiden T-Lymphozytenpopulationen **CD4+** und **CD8+** hat in verschiedenen Studien zu unterschiedlichen Ergebnissen geführt. Es wurde sowohl von einer Erhöhung, als auch einer Erniedrigung dieser Populationen bei Schizophrenen berichtet (Fessel und Hirata-Hibi, 1963; DeLisi et al., 1982; Coffey et al., 1983; McAllister et al., 1989a und b; Masserini et al., 1990, Hirata-Hibi und Hayashi, 1993; Ganguli et al., 1993b, Sperner-Unterweger et al., 1999). Keinerlei Veränderungen fanden Kaufmann et al. (1987) und Villemain et al. (1987 und 1989). Der Grund hierfür mag in der Anwendung anderer Techniken, wie dem Rosettenformations-Assay, der Fluoreszenzmikroskopie oder der Zweifarbenzytometrie liegen, die für die Diskriminierung distinkter Subpopulationen der Lymphozyten nicht ausreichend sind. Daneben wurden in verschiedenen Untersuchungen Patienten mit langer Krankheitsgeschichte ohne Berücksichtigung des Medikationsstatus eingeschlossen. In der hier untersuchten Population von Schizophrenen konnte eine signifikante Erhöhung von CD4-positiven T-Zellen nach Behandlung gegenüber gesunden Kontrollen festgestellt werden. Damit konnten diesbezügliche Befunde von mehreren Autoren (DeLisi et al., 1982; Ganguli et al., 1987; Masserini et al., 1990; Henneberg et al., 1990; Müller et al., 1991 und 1993b) reproduziert werden. Dieser Befund unterstützt einerseits die Autoimmunhypothese der Schizophrenie, da CD4+-Zellen auch bei Autoimmunkrankheiten

erhöht sind und für die chronische Stimulation von B-Zellen verantwortlich gemacht werden. Andererseits entspricht die Vermehrung von CD4+-Lymphozyten unter Therapie möglicherweise einer Vermehrung von Th1-Zellen, zumal verschiedene Hinweise dafür vorliegen, dass während der Neuroleptikatherapie ein Shift zur Immunantwort über Th1-Zellen stattfindet (Müller et al., 1999b). Interessanterweise bestand ein Zusammenhang mit dem Ansprechen auf antipsychotische Therapie und der CD8+-T-Zellpopulation. Patienten, die schlecht auf die Therapie ansprachen hatten signifikant weniger CD3+/8+-Zellen als die Gruppe, die sich klinisch gut besserte und teilweise vollständige Remission zeigte. In die gleiche Richtung weist der Befund von Kolyaskina et al. (1987), der bei Patienten mit einer malignen Form der Schizophrenie (nach ICD9) eine Verminderung von CD8+-Lymphozyten beschreibt. Von Müller et al. (1987) wurde von einer reduzierten Aktivität von T-Suppressorzellen berichtet. Im Vergleich dazu finden Masserini et al. (1990) eine Erhöhung von T-Suppressorzellen bei Neuroleptika-naiven Schizophrenen, die sich unter Therapie normalisiert. Auch in anderen Studien wird von einer Erhöhung der CD8+-T-Zellen berichtet (DeLisi et al., 1982; Ganguli et al., 1987). Es kann spekuliert werden, dass dies einer initialen Erhöhung der CD8+-T-Lymphozyten aufgrund von äusseren Faktoren (z. B. Virusinfektion) oder genetischen Faktoren entspricht, die dann von einer globalen Aktivierung von lymphozytären Subpopulationen abgelöst wird und letztlich in einer Aktivierung von CD4+-T-Helferzellen mündet. Dadurch ließen sich auch die z. T. widersprüchlichen früheren Berichte über diese Lymphozyten-Subpopulationen erklären. Auch kann die Wirkung von Neuroleptika auf das Immunsystem - direkt oder über Transmittermodulation - für Veränderungen bei behandelten Patienten verantwortlich gemacht werden und das immunologische Bild vor Behandlung maskieren, so beispielsweise eine CD8+-Erhöhung. Andererseits kann eine Erhöhung der CD8+-Zellzahl durchaus in Einklang mit einer insgesamt reduzierten Aktivität dieser Zellen gebracht werden.

Es muss darauf hingewiesen werden, dass sämtliche gefundenen Immunalterationen keine Aussage über ein ätiologisch zugrundeliegendes Geschehen treffen lassen, sondern durchaus sekundäre Phänomene aufgrund verschiedener Faktoren, wie Erkrankungsaktivität, Stress, Hospitalisation, Therapie, etc. darstellen können. Um feststellen zu können, welche Effekte auf die akute Erkrankung und welche auf die neuroleptische Therapie zurückzuführen sind, wurde hier insbesondere auf den Einfluss von Medikation und psychopathologischem Befund auf immunologische Veränderungen geachtet.

Innerhalb der Subpopulation der CD4+- und CD8+- Lymphozyten markieren Isoformen des CD45-Moleküles „naive“ T-Zellen und T-Gedächtniszellen. Während die hochmolekulare

Isoform CD45RA - früher auch als 2H4 bezeichnet - auf „naiven“ Lymphozyten exprimiert wird, kommt es nach Aktivierung der T-Zellen zur Expression von CD45RO und gleichzeitig zum Verlust von CD45RA. CD45RA- positive CD4+-Zellen wurden *Suppressor-Inducer* benannt, positive CD8+-Zellen *Suppressor-Effector*. Das 4B4-Antigen entspricht dem CD29-Molekül, das gemeinsam mit CD45RO (=UCHL1) die CD4+-*Helper-Inducer*-Zellen charakterisiert, die die Differenzierung von B-Zellen, damit die Produktion von Immunglobulinen, und die Antigen-spezifische Immunantwort ankurbeln. CD45RO+- T-Zellen produzieren große Mengen Interferon γ und IL-4, während CD45RA+-T-Zellen vorwiegend IL-2 produzieren (Hamann et al., 1996). Es ist bekannt, dass CD4+/CD45RA+-Lymphozyten die CD8+- Zellen induzieren, welche ihrerseits die B-zelluläre Immunglobulinproduktion unterdrücken (Morimoto et al., 1988). Die Ergebnisse vorliegender Arbeit zeigen, dass bei schizophrenen Patienten die Expression von CD45RA reduziert ist, insbesondere auf CD4+-Zellen und parallel dazu eine Zunahme des CD45RO-Moleküls zu beobachten ist. Die Zunahme ist vor allem bei behandelten Patienten zu beobachten; dort für CD4+- und CD8+- T-Zellpopulationen. Es konnte kein Zusammenhang mit dem akuten psychopathologischen Befund festgestellt werden, doch fanden sich nach Behandlung große Unterschiede zwischen Patienten mit gutem Therapieansprechen und solchen mit schlechtem Outcome im Sinne einer ausgeprägteren CD45RA-Erniedrigung und CD45RO-Erhöhung auf CD4-Lymphozyten bei letzteren. Das könnte bedeuten, dass CD4-Gedächtniszellen parallel mit antipsychotischer Therapie zunehmen, jedoch nicht bei psychopathologischer Besserung. Hohe CD4+/45RO+-Zahlen scheinen also mit schlechter Prognose assoziiert. Diese Ergebnisse entsprechen Studien, die eine signifikante Erniedrigung von Subgruppen naiver T-Zellen zeigen, nämlich den CD4+CD45RA+-*Suppressor-Inducer*- und CD8+CD45RA+-*Suppressor-Effector*- Zellen (Achiron et al., 1994). Wilke et al. (1996) konnte allerdings keine Unterschiede zwischen CD4+-Gedächtniszellen bei Schizophrenen und Kontrollen feststellen.

Charakteristisch für die CD45RO+-Gedächtniszellen ist die Expression von weiteren Aktivierungsmarkern und Adhäsionsmolekülen, wie **CD58 (=LFA-3) und CD60**. Während ICAM-1(=CD54) und VCAM-1 eine Rolle in der Stimulation naiver T-Zellen spielen, scheinen B7 und CD58 für die Erhaltung der Proliferation bereits aktivierter T-Zellen wichtig zu sein (Damle et al., 1992). Die Costimulation von CD4+- T-Gedächtniszellen über das Adhäsionsmolekül CD58 führt zur Sekretion von IL-5 und IFN γ und zur differentiellen Expression von CD60 (Semnani et al., 1994). Die Veränderungen der CD58-Expression bei Schizophrenen verlaufen parallel zur CD45RO-Expression; i. e. eine erhöhte Expression auf CD4+-Zellen nach Behandlung und bei schlechten Respondern im Vergleich zu Patienten mit

gutem Therapieerfolg. Interessant ist in diesem Zusammenhang auch, dass CD8+/45RO+-Zellen, deren Zunahme tendenziell bei behandelten Schizophrenen zu beobachten war, eine hohe transepitheliale Migrationsfähigkeit besitzen (Berman et al., 1995) und für starke zytotoxische Effekte verantwortlich sind (Renner et al., 1995). CD45RO-positive Lymphozyten mit der Expression des Adhäsionsmoleküls CD58 stellen folglich Subpopulationen dar, denen eine Migration durch die Blut-Hirnschranke möglich sein könnte. Interessant ist auch die erhöhte Expression von CD58 auf NK-Zellen Schizophrener unter Therapie.

CD60 wird auf CD45RO+-Lymphozyten exprimiert und darunter vor allem auf CD4+- T-Zellen. Es fehlt auf naiven T-Zellen. Die Expression dieses Markers nimmt nach Geburt rasch zu. CD4+/60+- Gedächtniszellen zeigen starke Proliferation auf PPD und produzieren IL-4 und IL-10. Aufgrund ihrer Fähigkeit zur Aktivierung der Immunglobulinproduktion von B-Zellen werden sie funktionell als *Memory-Effector*-Zellen bezeichnet (Wada et al., 1998). Die in der hier untersuchten Population von Schizophrenen vorliegende Erhöhung von CD60-positiven CD4+- T-Lymphozyten weist also auf eine Stimulation der T-Gedächtniszellen über das Adhäsionsmolekül CD58 hin.

Eine Stimulation von T-Zellen geschieht in erster Linie über den T-Zellrezeptor/CD3-Komplex. Die hier beobachtete signifikante Erhöhung von **CD25** (= IL-2 Rezeptor- α Kette) unter antipsychotischer Therapie auf CD4+- T-Zellen weist auf einer derartigen primären Stimulation hin und zeigt frühe Aktivierung an. Gleichmaßen wurde von Sasaki et al. (1994) über einen CD25-Anstieg bei akut Schizophrenen berichtet. Die Expression von **HLA-DR** auf T-Lymphozyten zeigt ebenfalls Zellaktivierung an. Die in vorliegender Arbeit untersuchten Schizophrenen hatten häufiger HLA-DR- positive Lymphozyten als Kontrollen; sowohl bei starker psychopathologischer Symptomatik, als auch bei schlechtem Therapieansprechen. Bereits Ganguli et al. (1987) berichten von einer erhöhten Prozentzahl von CD4+/HLA-DR +- Lymphozyten bei Schizophrenen und schließen in Zusammenhang mit weiteren Befunden auf autoimmunologische Vorgänge. In einer anderen Studie wurde bei Schizophrenen im Vergleich zu Kontrollen eine erhöhte Zahl von aktivierten „*blast-type atypical*“ Lymphozyten gefunden, die stark HLA-DR exprimieren (Kokai et al., 1998). CD45RO+ und HLA-DR+-T-Zellen sind bei verschiedenen Erkrankungen erhöht, so z. B. bei Epstein-Barr Virusinfektion, Varizellen und Autoimmunerkrankungen wie der rheumatoiden Arthritis, dem systemischen Lupus erythematoses oder dem Sjögren-Syndrom (Emery et al., 1987; Sato et al., 1987). Hier wird eine geringe Zahl von CD4+/CD45RA+-Lymphozyten (= *Suppressor-Inducer*) als Grund für die fehlende Herunterregulierung der ablaufenden

Autoimmunreaktion gesehen (Emery et al., 1987). Auch bei der Multiplen Sklerose konnte ein Verlust funktioneller Suppression beobachtet werden, die einhergeht mit einer verminderten Prozentzahl und Funktion von CD4+/45RA+-Lymphozyten (Chofflon et al., 1988).

Bei schizophrenen Patienten wird in bis zu >50% von einer Störung der Blut-Hirnschranke berichtet (Torrey, 1985 et al.; Kirch et al., 1985; Kornhuber und Bauer, 1986) und ein Zusammenhang zwischen dem Albumin- und IgG-Gehalt von Liquor und der Expression von Adhäsionsmolekülen auf peripheren CD4+-T-Zellen beobachtet (Müller et al., 1999a). Auch wurde eine Erhöhung von γ/δ +/CD8+-Zellen, die eine hohe Fähigkeit zur transendothelialen Migration haben (Galéa et al., 1994; Pietschmann et al., 1992) bei unmedizierten Schizophrenen beschrieben (Müller et al., 1998b). Dies lässt die Vermutung zu, dass bei schizophrenen Patienten zentralnervöse inflammatorische Prozesse vorliegen und eine Migration von aktivierten T-Zellen in das ZNS möglich ist. Radewicz et al. (2000) gelang der Nachweis einer erhöhten Expression von HLA-DR auf Mikroglia-Zellen des temporalen und frontalen Kortex chronisch Schizophrener, damit auf Zellen des gehirneigenen Immunsystems.

Es wird ausserdem diskutiert, dass bei Schizophrenen die Präsentation oder Erkennung von Antigenen durch T-Lymphozyten gestört ist (Müller et al., 1991). Eine erhöhte Expression von Adhäsionsmolekülen könnte zu besserer Stimulierbarkeit der Antigen-spezifischen CD45RO+-T-Zellen führen. Möglicherweise reflektiert die Erhöhung von HLA-DR-, CD58- und CD60-positiven T-Gedächtniszellen eine Verbesserung dieser Funktionen, bedingt durch neuroleptische Therapie. Es ist auch denkbar, dass der ausbleibende Therapieerfolg bei Patienten mit hohen CD4+/CD45RO+- Werten auf eine unterhaltene Immunreaktion im Sinne eines inflammatorischen ZNS-Prozesses zurückzuführen ist. Zum gleichen Schluss kommen Müller et al. (1993b) bei der Beurteilung des Zusammenhangs von hohen CD3+/4+-Zahlen und psychopathologischem Befund: Patienten mit ausgeprägten immunologischen Veränderungen und starker negativer Symptomatik zeigen ein schlechteres Ansprechen auf Neuroleptikatherapie.

Die Aktivierung des CD45RO-Pools geht einher mit erhöhten IL-2- Spiegeln im Serum, welches Wachstumsfaktor und Anti-apoptotischer Faktor für CD45RO+- Zellen ist und auch von diesen ausgeschüttet wird. Von Akbar et al. (1993) wird beschrieben, dass die Persistenz von CD45RO-Gedächtniszellen, die normalerweise nach überstandener Virusinfektion zugrundegehen, von einem IL-2 haltigen Milieu abhängig ist. Die Anwesenheit von IL-2

reduziert demnach über eine Hochregulation von bcl-2 die Apoptose dieser Zellen; ein Mechanismus, der auch bei der Schizophrenie eine Rolle spielen könnte. Auch eine Wanderung in das ZNS ist denkbar, wobei die CD45RO-positiven Zellen dort in entsprechenden Umgebungsbedingungen im Ruhezustand bleiben könnten. Die Reaktivierung könnte dann aufgrund der Expression des IL-2 Rezeptors erleichtert erfolgen. Im Liquor unmedizierter Schizophrener wurde eine IL-2 Erhöhung gefunden (Licinio et al., 1993) und als Prädiktor für Rückfälle bei Schizophrenen identifiziert (McAllister et al., 1995). Auch Smith (1991 und 1992) vertritt die Hypothese, dass aktivierende Zytokine wie IL-2 und IL-6 bei schizophrenen Psychosen eine Rolle spielen. Neben der Beteiligung an der Regulation der Immunantwort und der Interaktion des peripheren Immunsystems mit dem ZNS können sie bei intravenöser Applikation Schizophrenie-ähnliche Symptome auslösen (Denicoff et al., 1987). Während Neuroleptikabehandlung wurde ein signifikanter Anstieg von löslichem IL-2 Rezeptor (=sIL-2R) beobachtet und eine Abnahme von sIL-6R (Rapaport et al., 1989; Ganguli und Rabin, 1989). Die Funktion von sIL-2R ist die Bindung und Inaktivierung von IL-2. Folglich kann dessen Anstieg als Versuch der Herunterregulierung der aktivierenden Zytokine bzw. als immunmodulatorischer Effekt antipsychotischer Therapie interpretiert werden (Müller et al., 1997a). Eine andere Interpretation der sIL-2R-Erhöhung ist, dass IL-2 Rezeptoren von aktivierten Zellen abgeworfen werden und deshalb eine Erhöhung aktivierter IL-2-tragender T-Zellen widerspiegelt. (Maes et al., 1994; Müller et al., 1997a). Von Villemain et al. (1987) und Rabin et al. (1988) wird eine Reduzierung von IL-2 bei Schizophrenen berichtet. Entsprechende Befunde wurden bei Autoimmunerkrankungen beschrieben: Eine Reduzierung von IL-2 zusammen mit einer Erhöhung von sIL-2R (Alcocer-Varela und Alarcón-Segovia, 1982; Huang et al., 1988; Caruso et al., 1993).

Bezüglich des IL-6R konnten in vorliegender Arbeit keine Unterschiede in der Expression festgestellt werden. Gleichwohl spielt IL-6 eine interessante Rolle in der Immunaktivierung bei Schizophrenie. Interleukin-6 aktiviert vor allem das B-Zellsystem und wird von Makrophagen und Monozyten produziert, sowie von Th2-Zellen. Passend dazu finden Wilke et al. (1996) eine Monozyten-Erhöhung bei Schizophrenen. Hohe IL-6-Level sind assoziiert mit Krankheitsdauer (Ganguli et al., 1994) und Therapieresistenz (Lin et al., 1998). Ein schlechter Krankheitsverlauf scheint allgemein mit Alterationen des IL-6-Systems verbunden zu sein (Müller et al., 1997a). Unter Therapie kommt es zur funktionellen Abnahme des IL-6-Systems und verringerter Expression des IL-6 Rezeptors (Maes et al., 1995b; Müller et al., 1997a); es ist demnach ein hemmender Einfluss von Neuroleptika nachweisbar (Lin et al., 1998). Gleichmaßen ist IL-10 bei Schizophrenen im Zusammenhang mit negativer

Symptomatik und parallel zu Schwere der Erkrankung erhöht (Cazzullo et al., 1998a; Van Kammen et al., 1997). Ebenso wie IL-6 und IL-10 ist auch IL-4 ein charakteristisches Produkt von Th2-Zellen. Es ist im Liquor junger Patienten erhöht (Mittleman et al., 1997), d.h. es handelt sich bei den beobachteten Zytokinveränderungen wahrscheinlich nicht nur um Phänomene des peripheren Immunsystems, sondern es ist von einer zentralen Beteiligung auszugehen. Müller et al. (1999b) kommen daher zu dem Schluss, dass das **Th2-System** bei akuter Schizophrenie aktiviert ist, möglicherweise auch bei stark ausgeprägter Negativ-Symptomatik (Sperner-Unterweger et al., 1999). Hier fügen sich vorliegende Ergebnisse bezüglich der CD60-positiven CD4+-T-Gedächtniszellen ein, die mit einem Th2-Zytokinprofil in Zusammenhang gebracht werden (Semnani et al., 1994): Eine signifikante Erhöhung dieser Zellpopulation wurde vor allem bei unbehandelten, akut schizophrenen Patienten gefunden.

Im Gegensatz dazu produzieren Th1-Zellen IL-2 und IFN γ (Mosmann und Sad, 1996). Eine *in vitro* erniedrigte Produktion von IL-2 durch Lymphozyten Schizophrener (Villemain et al., 1989, Ganguli et al., 1995) wurde als Erschöpfung interpretiert, ist aber möglicherweise auf eine verringerte Bildungskapazität zurückzuführen, was besser zu den Befunden erniedrigter IFN γ Produktion passen würde (Wilke et al., 1996). Dies kann eine Abnahme der Aktivierung des Th-1-Systems bei Schizophrenen bedeuten (Müller et al., 1999b; Sperner-Unterweger et al., 1999). Beispielsweise ist neben anderen Hauttests auch die Tuberkulinreaktion beeinträchtigt (Müller et al., 1991), die über Th1-Zellen vermittelt wird.

Ausgehend von dem Modell von Müller et al. (1999b) kommt es unter Neuroleptikatherapie zu einer Gegenregulation, indem eine Aktivierung der Immunantwort über das **Th1-System** stattfindet. Gleichzeitig wird das B-Zellsystem aktiviert und die Produktion von Antikörpern nimmt zu, was primär nicht mit Th1 assoziiert wird. Dieser Befund ist insoweit vereinbar mit der Hypothese einer Th1-Antwort, als dies einem *Switch* der Immunglobulinproduktion von B-Zellen entsprechen könnte. Das Th2-Profil mit IL-4, -5, -6, -10 und -13 Sekretion wird typischerweise mit humoraler Immunantwort, Stimulation der Antikörperproduktion und allergischen Reaktionen in Zusammenhang gebracht. Hier findet man vor allem Immunglobuline der Klassen IgG1, IgG4 und IgE (Mosmann und Sad, 1996; Jenmalm et al., 1999; Lucey et al., 1996). Abhängig von der Antigendosis kann es zu einem Umschalten der Immunantwort auf das Th1-System kommen, wobei hohe und niedrige Antigendosen die Th2-System stimulieren und gemäßigte Antigenexposition zur Th1-Aktivierung führt. Charakteristisch für Th1 ist die Beteiligung an der zellvermittelten Immunität, an allergischen Reaktionen vom verzögerten Typ und ein Zytokinmilieu mit IFN γ , IL-2 und Lymphotoxin.

An Immunglobulin-Subklassen findet man vorwiegend IgG2a und IgG3. Es ist bekannt, dass die Differenzierung in Th1 oder Th2-Zellen durch die Gegenwart entsprechender Zytokine bestimmt wird, die vorwiegend von Antigenpräsentierenden Zellen – Makrophagen, dendritischen Zellen, B-Zellen, aber auch NK-Zellen – ausgeschüttet werden. Lin und Chen (1993) haben im Mausmodell gezeigt, dass B-Zellen bei Aktivierung durch Th1 fast ausschließlich IgG2a produziert und sich die Isotyp-Produktion bei Aktivierung von Th2 in IgG1 ändert. Dieser Vorgang ist auch umgekehrt zu beobachten.

Passend zur Aktivierung von Th1 normalisiert sich der anfangs erniedrigte Serumspiegel von IFN γ unter Neuroleptikatherapie (Wilke et al., 1996). Zudem produzieren CD4+/45RO+-Zellen, von denen auch hier ein Ansteigen unter Therapie beobachtet wurde, IFN γ und könnten zu dessen Erhöhung beitragen (Cazzullo et al., 1998b). Es wurde außerdem gezeigt, dass nicht CD4+/CD45RA+-, sondern CD4+/45RO+- Lymphozyten eine B-Zell-Differenzierung auslösen (Sleasman et al., 1990). In diesem Sinne ist die erhöhte Expression von CD45RO sehr gut mit der Theorie einer vorwiegenden Th1-Immunantwort und B-Zell-Stimulation unter Neuroleptikatherapie vereinbar.

Bei den **CD5-positiven B-Zellen** handelt es sich um eine Population von B-Zellen, die mit autoimmunologischen Prozessen in Verbindung gebracht wird und beispielsweise bei der rheumatoiden Arthritis erhöht ist, sowie Auto-Antikörper produzieren kann (Dauphineé et al., 1988; Hardy et al., 1987 und 1988). Aktivierte B-Zellen führen zu erhöhter Antikörperproduktion, und sind daher für die Autoimmunhypothese relevant (Ganguli et al., 1987). Auch gelten sie als Vorläufer von Makrophagen-ähnlichen B-Zellen, die sich durch Adhärenz und phagozytotische Aktivität auszeichnen und bei Autoimmunerkrankungen, sowie bei malignen Erkrankungen gefunden werden (Borrello und Phipps, 1996). Es ist wiederholt gezeigt worden, dass in 20-35% der Schizophrenen Hinweise auf Autoimmunprozesse vorliegen (Müller und Ackenheil, 1998a). So zum Beispiel der Nachweis von IgG-Antikörpern bei negativen Symptomen (Müller und Ackenheil, 1995), oder 60kD-*Heatshock*-Protein Antikörper als Verlust von Neuroprotektion (Kilidireas et al., 1992; Schwarz et al., 1999). Bei Schizophrenen wurde eine erhöhte Anzahl von B-Zellen und eine Erhöhung aktivierter B-Zellen unter Neuroleptikatherapie gefunden (Masserini et al., 1990; De Lisi et al., 1982). Diese Befunde sind vereinbar mit dem hier gezeigten Anstieg von aktivierten T-Zellen, die zu einer B-Zellstimulation führen.

McAllister et al. (1989a) haben morphologisch unterschiedliche B-Zellen bei schizophrenen Patienten festgestellt und vermuten, dass es sich dabei um den von Hirata-Hibi et al. (1982)

beschriebenen P-Lymphozyten handeln könnte, der bei schizophrenen Patienten vermehrt vorkommen soll. Bisher konnte keine Arbeitsgruppe prozentuale Unterschiede der CD5+-B-Zellen im Vergleich mit Kontrollen finden (Ganguli und Rabin, 1993a; McAllister et al., 1989a). Allerdings identifizierten McAllister et al. (1989a) eine Gruppe von Schizophrenen mit hoher Expression von CD5+ auf B-Zellen (Anteil von >50%) und stellten fest, dass diese stabil einen „hohen“ Phänotyp hatten, assoziiert mit erhöhter Gesamt-B-Zellzahl. Diese Gruppe umfasste 30% der Patienten und soll die Patienten mit pathogenetisch immunologischer Komponente enthalten. In Übereinstimmung damit beobachteten Printz et al. (1999), dass Schizophrene häufiger als Kontrollen eine erhöhte CD5+-Expression zeigen (27,6% vs 6,7%). Diese Befunde konnten in vorliegender Arbeit teilweise nachvollzogen werden, insofern als schizophrene Patienten mit einem Anteil von >2% stark CD5-positiven B-Zellen auch einen hohen Prozentsatz CD19+-Zellen (>20%) hatten, was bei den Kontrollen nicht regelmäßig der Fall war. Andererseits zeigte sich bei Berechnung von Mittelwerten für alle Schizophrenen im Gegenteil eine signifikante Erniedrigung der CD5-Expression auf CD19+- Zellen bei behandelten und unbehandelten Schizophrenen. Patienten mit gutem Therapieansprechen hatten zudem eine signifikant verminderten Anteil hochpositiver CD5+-Zellen im Vergleich zu Kontrollen. Nach den hier erhobenen Befunden dieser Zellpopulation des „unreifen“ Immunsystems reflektieren die Veränderungen eher die Aktivität des Krankheitsprozesses im Sinne eines erniedrigten prozentualen Anteils an der Gesamtpopulation der peripheren Lymphozyten. Parallel dazu sind Veränderungen für die NK-Zellen, ebenfalls Zellen des „unreifen“ Immunsystems, zu beobachten. Diese werden im Folgenden dargestellt.

Es liegen mehrere Studien vor, die sich mit Zahl und Aktivität von **NK-Zellen** bei Schizophrenen befassen. Dieser Zelltyp spielt eine Rolle bei der Zerstörung von Tumorzellen und der ersten Virusabwehr und ist im Rahmen von Stressexposition reduziert (McDaniel, 1992a; McDaniel et al., 1992b; Schedlowski, 1994 und 1996). Es wird von einer reduzierten Aktivität der NK-Zellen berichtet, insbesondere bei akuter Psychose, aber auch von fehlenden Veränderungen bei Neuroleptika-naiven Patienten und letztlich einem starken Einfluss neuroleptischer Medikation (DeLisi et al., 1983; Sasaki et al., 1994; Abdeljaber et al., 1994; McDaniel et al., 1992b). Sperner-Unterweger et al. (1999) fanden eine Erniedrigung dieser Zellpopulation bei allen schizophrenen Patienten, wobei sich die Veränderungen unter Behandlung normalisierten. Ähnlich ist der Befund der hier untersuchten Patienten mit einer signifikanten Reduktion von NK-Zellen bei unbehandelten Schizophrenen, die im Laufe der Behandlung zwar ansteigen, aber dennoch signifikant unter dem Normwert liegen. Die

Patienten mit erster Episode hatten keine signifikanten Veränderungen bezüglich der Häufigkeit von NK-Zellen im peripheren Blut; sie zeigten allein eine erniedrigte lymphozytäre CD16/56-Expression. Bei erfolgreich therapierten Patienten war die Verminderung von NK-Zellen signifikant, die Verminderung bei schlecht therapierbaren Patienten war nicht signifikant. Gleichsinnig dazu verhält sich die NK-Zellpopulation bei Multipler Sklerose. Auch hier ist eine Erniedrigung assoziiert mit akuter Erkrankungsaktivität. Als Ursachen kommen entweder Sequestration von NK-Zellen, ein Defekt der Vermehrung oder mangelnde Zytokinantwort bei Rückfällen in Frage (Munschauer et al., 1995). Die Veränderungen der NK-Zellen lassen also zum einen auf immunologische Vorgänge bei akuter Exazerbation (bei Rezidiven) der Schizophrenie schließen, zum anderen ist auch ein Einfluss von Neuroleptika zu erkennen, zumal Patienten mit Erstmanifestation - also Neuroleptika-Naive - auch bei akuter psychotischer Symptomatik keine NK-Zellveränderungen aufweisen (Sperner-Unterweger et al., 1999) und nach Medikation ein Trend zur Normalisierung nachweisbar ist (Sasaki et al., 1994).

Insgesamt wurden in dieser Arbeit signifikante Immunveränderungen bei unbehandelten und behandelten Schizophrenen im Vergleich zu Kontrollen gesehen. Bei behandelten Patienten fanden sich deutliche Veränderungen im Sinne einer Immunaktivierung mit erhöhter CD45RO, CD58 und CD25-Expression. Diese können Ausdruck einer direkten Wirkung der Neuroleptika auf das Immunsystem sein, wenn auch deren Bedeutung für den Therapieerfolg nicht geklärt ist. So beurteilt DeLisi (1996) immunologische Veränderungen lediglich als sekundäres Phänomen, denen eine abnormale Interaktion von Neurotransmittern mit Rezeptoren auf Immunzellen zugrunde liegt. Auch Kirch (1993) schreibt, dass unspezifische Immunalterationen vermutlich einen Faktor von vielen in der Pathogenese der Schizophrenie darstellen und gibt zu bedenken, dass in den meisten Untersuchungen Patienten mit chronifiziertem Krankheitsverlauf untersucht wurden, so dass Epiphänomene aus Chronizität, Hospitalisation, u.a. beobachtet werden. Die Überexpression von Aktivierungsmarkern bei den hier untersuchten Patienten mit schlechtem Ansprechen auf Therapie könnte daher durch sekundäre Krankheitsphänomene erklärt werden. Die unterschiedlichen Befunde verschiedener Arbeitsgruppen verdeutlichen die Komplexität des Krankheitsbildes. Die Tatsache der klinischen Heterogenität der Schizophrenie lässt auch an die Möglichkeit einer ätiologischen Heterogenität denken, worin die Rolle des Immunsystems unterschiedlich zum Tragen kommt.

V. Zusammenfassung

Bei schizophrenen Patienten sind immunologische Veränderungen nachweisbar, die auf eine Aktivierung des Immunsystems hinweisen und die seit langem diskutierte Hypothese stützen, dass das Immunsystem in der Pathogenese der Schizophrenie involviert ist. Es gibt Anhaltspunkte, die die Annahme eines inflammatorischen - sei es infektiös oder autoimmunologisch getriggerten - Prozesses im Gehirn schizophrener Patienten stützen, der zu einer erhöhten Permeabilität der Blut-Hirnschranke führt und für die psychopathologische Symptomatik verantwortlich gemacht wird.

In dieser Arbeit wurden mittels Dreifarben-Durchflusszytometrie (FACS-Analyse) Lymphozyten-Subpopulationen von 31 schizophrenen Patienten bestimmt und sowohl mit Befunden gesunder Kontrollpersonen, als auch desselben Patienten vor und nach Neuroleptikabehandlung verglichen. Gemessen wurde die Expression einer Auswahl von Oberflächenantigenen, die den Aktivierungszustand des Immunsystems anzeigen bzw. mit autoimmunologischen Prozessen in Verbindung gebracht werden. Dadurch war es möglich allgemeine immunologische Veränderungen des peripheren Immunsystems schizophrener Patienten zu erfassen und diese auch im Verlauf der Therapie mit Neuroleptika, sowie in Korrelation mit psychopathologischem Befund und Prognose zu betrachten.

Die in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse stützen die Hypothese, dass bei schizophrenen Patienten eine Aktivierung des Immunsystems vorliegt. So fand sich bei Schizophrenen nach Behandlung im Vergleich zu Kontrollen eine Erhöhung der CD4-positiven T-Zellen – ein Befund, der auch bei Autoimmunerkrankungen gesehen wird und dort für die chronische Stimulation von B-Lymphozyten verantwortlich gemacht wird. Zusätzlich wurden Patientengruppen anhand des psychopathologischen Verlaufes und des Therapieerfolgs gebildet. Ein Zusammenhang bestand zwischen dem Ansprechen auf Therapie und CD8-positiven T-Lymphozyten: Die Patientengruppe mit niedrigerem Anteil von CD8+- Zellen, also weniger Suppressorzellen, zeigte ein schlechteres Ansprechen. Ein weiteres Aktivierungszeichen des zellulären Immunsystems ist die Expression des CD45RO-Moleküls anstelle von CD45RA auf CD4-positiven Lymphozyten. Auch hier konnte bei schizophrenen Patienten ein erhöhter Anteil von CD4+/CD45RO+- (Gedächtnis-) Zellen, insbesondere nach Behandlung, beobachtet werden, wobei wiederum Patienten mit schlechterem Ansprechen auf Therapie stärkere Veränderungen zeigen. Unterstrichen wird dieser Befund durch die parallele Zunahme der Expression des Adhäsionsmoleküls CD58 und CD60 bei Schizophrenen unter

Behandlung, sowie zusätzlich bei schlechter Therapieantwort. Eine Expression dieser Moleküle weist auf die Fähigkeit zur transepithelialen Migration der Zellen, auf eine weitere Immunaktivierung und Stimulation von B-Zellen hin. Ebenfalls ähnlich wie bei Autoimmunerkrankungen wurde in der hier untersuchten Patientengruppe eine erhöhte Expression von HLA-DR gefunden. Dies, wie auch eine geringe Zahl von CD4+/45RA+-Lymphozyten, die als *Suppressor-Inducer*-Zellen bekannt sind, kann als fehlende Suppression von Autoimmunreaktionen interpretiert werden. Darüberhinaus scheint ein schlechtes Outcome der Patienten mit insgesamt erhöhter immunologischer Aktivität assoziiert zu sein. Die Ergebnisse im Bezug auf CD5+/19+- Zellen und NK-Zellen runden das Bild einer Modulation immunologischer Mechanismen im Verlauf einer schizophrenen Störung und durch neuroleptische Therapie ab.

In der Literatur beschriebene Störungen der Blut-Hirnschranke und Reaktionen des hirneigenen Immunsystems weisen auf eine Interaktion von peripherem und zentralem Immunsystem im Rahmen der Erkrankung hin. In der akuten Phase der Schizophrenie scheint dabei die Aktivierung des Th2-Systems im Vordergrund zu stehen. Im Verlauf der neuroleptischen Behandlung findet dann ein Wechsel zum Th1-System statt. Veränderungen im Zytokinsystem sind von besonderem Interesse, da diesen Botenstoffen eine Vermittlerrolle zwischen Immunsystem und Nervensystem zukommt und so ein Einfluss auf neurometabolische Vorgänge erklärbar ist. Die in dieser Arbeit beobachteten Veränderungen unter Neuroleptikatherapie sprechen für einen immunmodulatorischen Wirkmechanismus dieser Substanzen. Für die Substanz Clozapin sind beispielsweise derartige Effekte bekannt.

Bei der Schizophrenie handelt es sich um eine heterogene Krankheitsentität, für die es zahlreiche Erklärungsmodelle gibt. Die hier erhobenen Befunde stehen in Einklang mit Ergebnissen anderer Studien und können diese zum Teil bestätigen und ergänzen. Allerdings finden sich in der Literatur diskrepante und umstrittene Befunde bezüglich der zellulären und humoralen Veränderungen des Immunsystems, die die Komplexität des Krankheitsbildes deutlich machen und vielleicht als Ausdruck ätiologischer Unterschiede angesehen werden können.

VI. Literaturverzeichnis

- Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Cellular and molecular immunology. WB Saunders company, Harcourt Brace Jovanovich Inc., 2000.
- Abdeljaber MH, Nair MP, Schork MA, Schwartz SA. Depressed natural killer cell activity in schizophrenic patients. *Immunol Invest.* 23: 259-268, 1994.
- Achiron A, Noy S, Pras E, Lereya J, Hermesh H, Laor N. T-cell subsets in acute psychotic schizophrenic patients. *Biol Psychiatry.* 35: 27-31, 1994.
- Ahokas A, Koskiniemi M, Vaheri A, Rimon R. Altered white cell count, protein concentration and oligoclonal IgG bands in the cerebrospinal fluid of many patients with acute psychiatric disorders. *Neuropsychobiology.* 14: 1-4, 1985.
- Akbar A, Salmon M, Savill J, Janossy G. A possible role for bcl-2 in regulating T-cell memory - a 'balancing act' between cell death and survival. *Immunol Today.* 14: 526-532, 1993.
- Alcocer-Varela J, Alarcón-Segovia D: Decreased production of and response to interleukin-2 by cultured lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest.* 69: 1388-1392, 1982.
- Alexander RC, Cabirac G, Lowenkopf T *et al.* Search for evidence of herpes simplex virus, type 1, or varicella-zoster virus infection in postmortem brain tissue from schizophrenic patients. *Acta Psychiatr Scand.* 86: 418-420, 1992.
- Alonso R, Chaudieu I, Diorio J, Krishnamurthy A, Quirion R, Boksa P. Interleukin-2 modulates evoked release of [3H]dopamine in rat cultured mesencephalic cells. *J Neurochem.* 61: 1284-1290, 1993.
- Andreasen NC, Olsen S. Negative v positive schizophrenia: definition and validation. *Arch Gen Psychiatry.* 39: 789-794, 1982.
- Ban EM. Interleukin-1 receptors in the brain: characterization by quantitative in situ autoradiography. *Immunomethods.* 5: 31-40, 1994.
- Banks WA, Kastin AJ. Blood to brain transport of interleukin links the immune and central nervous system. *Life Sciences.* 48: 117-121, 1991.
- Berman KF, Torrey EF, Daniel DG, Weinberger DR. Regional cerebral blood flow in monozygotic twins discordant and concordant for schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry.* 49: 927-934, 1992.

- Berman J, Mahoney K, Saukkonen J, Masuyama J. Migration of distinct subsets of CD8+ blood cells through endothelial cell monolayers in vitro. *J Leukoc Biol.* 58: 317-324, 1995.
- Besedovsky HO, Del Ray A, Sorkin E, Dinarello CA. Immunoregulatory feedback between interleukin-1 and glucocorticoid hormones. *Science.* 233: 652-654, 1986.
- Blalock JE, Smith EM. Human leukocyte interferon: Structural and biological relatedness to adrenocorticotrophic hormone and endorphins. *Proc Natl Acad Sci USA.* 77: 5972-5974, 1980.
- Blalock JE, Smith EM. Human leukocyte interferon (HuIFN- α): Potent endorphin-like opioid activity. *Biochem Biophys Res Commun.* 101: 472-478, 1981.
- Blalock JE. The syntax of immune-neuroendocrine communication. *Immunol Today.* 15: 504-517, 1994.
- Bleuler E. 'Dementia praecox' oder 'Gruppe der Schizophrenien'. Leipzig: Deuticke. 1911.
- Böyum A. Isolation of leucocytes from normal blood. Further observations. *Scand J Clin Lab Invest.* 97(Suppl.): 31-50, 1968.
- Borrello MA, Phipps RP. The B/macrophage cell: an elusive link between CD5+ lymphocytes and macrophages. *Immunol Today.* 17: 471-475, 1996.
- Brown RE. An introduction to neuroendocrinology. Cambridge: Cambridge University Press, 1994.
- Bruce LC, Peebles AMS. Quantitative and qualitative leukocyte counts in various forms of mental disease. *J of Mental Science.* 50: 409-417, 1904.
- Bruetsch VL, Bahr MA, Skobba JS, Dieter VJ. The group of dementia praecox patients with an increase of the protein content of the cerebrospinal fluid. *J of Nervous and Mental disorders.* 95: 669-679, 1942.
- Calabrese JR, Kling MA, Gold PW. Alterations in immuno-competence during stress, bereavement, and depression: Focus on neuroendocrine regulation. *Am J Psychiatry.* 144: 3498-3504, 1987.
- Cannon WB. The wisdom of the body. New York (W. W. Norton), 1932.
- Canoso RT, De-Oliviera RM, Nixon RA. Neuroleptic-associated autoantibodies. A prevalence study. *Biol Psychiatry.* 27: 863-870, 1990.
- Caruso C, Candore G, Cigna D, Colucci AT, Modica MA. Biological significance of soluble Il-2 receptor. *Med Inflamm.* 2: 3-21, 1993.
- Cardno AG, Farmer AE. The case for or against heterogeneity in the etiology of schizophrenia. The genetic evidence. *Schizophr Res.* 17: 153-159, 1995.

- Casanova MF, Sanders RD, Goldberg TE *et al.* Morphometry of the corpus callosum in monozygotic twins discordant for schizophrenia: A magnetic resonance imaging study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 53: 416-421, 1990.
- Castle DJ, Sham PC, Wessely S, Murray RM. The subtyping of schizophrenia in men and women: a latent class analysis. *Psychol Med*. 24: 41-51, 1994.
- Cazzullo CL, Scarone S, Grassi B *et al.* Cytokines production in chronic schizophrenia patients with or without paranoid behavior. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 22: 947-957, 1998a.
- Cazzullo CL, Saresella M, Roda K *et al.* Increased levels of CD8+ and CD4+45RA+ lymphocytes in schizophrenic patients. *Schizophr Res*. 31: 49-55, 1998b.
- Chofflon M, Weiner HL, Morimoto C, Hafler DA. Loss of functional suppression is linked to decreases in circulating suppressor inducer (CD4+2H4+) T cells in multiple sclerosis. *Ann Neurol*. 24: 185-191, 1988.
- Chrousos GP, Gold PW. The concepts of stress and stress system disorders: overview of physical and behavioral homeostasis. *J Am Med Association*. 267: 1244-1252, 1992.
- Coffey CE, Sullivan JL, Rice JR. T-lymphocytes in schizophrenia. *Biol Psychiatry*. 18: 113-119, 1983.
- Crow TJ. Molecular pathology of schizophrenia: more than one disease process? *Br Med J*. 280: 66-68, 1980.
- Crow TJ. The two-syndrome concept: origins and current status. *Schizophr Bull*. 11: 471-486, 1985.
- Crow TJ. Prenatal Exposure to Influenza as a cause of schizophrenia. There are inconsistencies and contradictions in evidence. *Br J Psychiatry*. 164: 588-592, 1994a.
- Crow TJ. Aetiology of schizophrenia. *Curr Opin Psychiatry*. 7: 39-42, 1994b.
- Dahmen N, Hiemke C. Neuropsychiatrische Erkrankungen und Immundefunktionen. In: Schulz KH, Kugler J, Schedlowski M. Psychoneuroimmunologie: Ein interdisziplinäres Forschungsfeld. Bern, Stuttgart: Huber, 1997.
- Damle NK, Klussman K, Linsley PS, Aruffo A. Differential costimulatory effects of adhesion molecules B7, ICAM-1, LFA-3, and VCAM-1 on resting and antigenprimed CD4+ T lymphocytes. *J Immunol*. 148: 1985-1992, 1992.
- Dauphineé M, Tovar Z, Talal N. B cells expressing CD5 are increased in Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum*. 31:642-647, 1988
- De Beaurepaire R, Fattal-German M, Kramartz P *et al.* Etude des réactions immunitaires humorales et cellulaires dans diverses formes de pathologies psychiatriques chroniques. *Encéphale*. 20: 57-64, 1994.

- DeLisi LE, Goodman S, Neckers L, Wyatt RJ. An analysis of Lymphocyte subpopulations in schizophrenic patients. *Biol Psychiatry*. 17: 1003-1009, 1982.
- DeLisi LE, Ortaldo JR, Maluish AE, Wyatt RJ. Deficient natural killer cell (NK) activity and macrophage functioning in schizophrenic patients. *J Neural Transm*. 58: 99-106, 1983.
- DeLisi LE, Weber RJ, Pert CB. Are there antibodies against brain in sera from schizophrenic patients? Review and prospectus. *Biol Psychiatry*. 20: 110-115, 1985.
- DeLisi LE, Dauphinais ID, Gershon ES. Perinatal complications and reduced size of brain limbic structures in familial schizophrenia. *Schizophr Bull*. 14: 185-191, 1988
- DeLisi LE. Is there a viral or immune dysfunction etiology to schizophrenia? Re-evaluation a decade later. *Schizophr Res*. 22: 1-4, 1996.
- Denicoff KD, Rubinoff DR, Papa MZ *et al*. The neuropsychiatric effects of treatment with interleukin-2 and lymphokine-activated killer cells. *Ann Intern Med*. 107: 293-300, 1987.
- Dunn AJ. Endotoxin-induced activation of cerebral catecholamine and serotonin metabolism: comparison with interleukin-1. *J Pharmacol Exp Ther*. 261: 964-969, 1992.
- Eaton WW, Hayward C, Ram R. Schizophrenia and rheumatoid arthritis: A review. *Schizophr Res*. 6: 181-192, 1992.
- Emery P, Gentry K, Mackay I *et al*. Deficiency of the suppressor inducer subset of T lymphocytes in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 30: 849-856, 1987.
- Ermala P, Autio L. On intradermal histamine tests in schizophrenia. *Acta Psychiatr Scand*. 60(Suppl.): 136-144, 1951.
- Falconer DS. The inheritance of liability to certain diseases, estimated from the incidence among relatives. *Ann Hum Genet*. 29: 51-76, 1965.
- Farmer AE, McGuffin P, Spitznagel EL. Heterogeneity in schizophrenia: a cluster-analytic approach. *Psychiatry Res*. 8:1-12, 1983.
- Fessel W, Hirata-Hibi M. Abnormal leukocytes in schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry*. 9: 601-613, 1963.
- Frey W, Toniatti F. Der Einfluss der vegetativen Nerven auf die Milz und die Lymphocyten des Bluts. *Zeitschrift für die gesamte Experimentelle Medizin*. 44: 597-608, 1925.
- Galéa P, Brezinschek R, Lipsky PE *et al*. Phenotypic characterization of CD4- α/β TCR+ and γ/δ TCR+ T cells with a transendothelial migratory capacity. *J Immunol*. 153: 429-542, 1994.
- Galinowski A, Levy-Soussan P, Loo H. Schizophrénie et immunité. *Ann Méd Psychol (Paris)*. 150: 138-142, 1992.

- Ganguli R, Rabin BS, Kelly RH, Lyte M, Ragu U. Clinical and laboratory evidence of autoimmunity in acute schizophrenia. Neuroimmune interactions. *Ann NY Acad Sci.* 496: 676-685, 1987.
- Ganguli R, Rabin BS. Increased serum Interleukin 2 receptor levels in schizophrenic and brain damaged subjects. *Arch Gen Psychiatry.* 46: 292, 1989.
- Ganguli RJ, Brar JS, Solomon W, Chengappa KN, Rabin BS. Altered interleukin-2 production in schizophrenia: association between clinical state and autoantibody production. *Psychiatry Res.* 44: 113-123, 1992.
- Ganguli R, Rabin BS. CD5 positive B lymphocytes in schizophrenia: no alteration in numbers or percentage as compared with control subjects. *Psychiatry Res.* 48: 69-78, 1993a.
- Ganguli RJ, Brar JS, Chengappa KN, Yang ZW, Nimgaonkar VL, Rabin BS. Autoimmunity in schizophrenia: a review of recent findings. *Ann Med.* 25: 489-496, 1993b.
- Ganguli R, Yang Z, Shurin G *et al.* Serum interleukin-6 concentration in schizophrenia: elevation associated with duration of illness. *Psychiatry Res.* 51: 1-10, 1994.
- Ganguli R, Brar JS, Chengappa KR *et al.* Mitogen-stimulated interleukin 2 production in never-medicated, first episode schizophrenics – the influence of age of onset and negative symptoms. *Arch Gen Psychiatry.* 52: 878, 1995.
- Gershon ES, Rieder RO. Molekulare Grundlagen von Geistes- und Gemütskrankheiten. In: Kunkel A (Hrsg.). Gehirn und Geist. *Spektrum der Wissenschaft.* Spezial 1, 1993.
- Ghosh N, Chattopadhyay U. Enhancemant of immune response by phenothiazine administration in vivo. *In Vivo.* 7: 435-440, 1993.
- Goldin LR, DeLisi LE, Gershon ES. Genetic aspects to the biology of schizophrenia. In: Neurochemistry and Neuropharmacology of Schizophrenia, Henn FA, DeLisi LE (Hrsg.). Amsterdam, New York, Oxford: Elsevier. 467-487, 1987.
- Gottesman II, Shields J. A critical review of recent adoption, twin, and family studies of schizophrenia: behavioral genetic perspectives. *Schizophr Bull.* 2: 360-378, 1976.
- Gottesman II. Schizophrenia Genesis: The Origins of Madness. New York: W.H. Freeman. 1991.
- Hamann D, Baars PA, Hooibrink B, van Lier RW. Heterogeneity of the human CD4+ T-cell population: two distinct CD4+ T-cell subsets characterized by coexpression of CD45RA and CD45RO isoforms. *Blood.* 88: 3513-3521, 1996.
- Hardy RR, Hayakawa K, Shimizu M, Yanasaki K, Kishimoto T. Rheumatoid factor secretion from human Leu-1+ B cells. *Science.* 236: 81-83, 1987.

- Hardy RR, Kishimoto T, Shimizo M, Hayakawa K. Homologous B-cell populations: autoantibody secretion from human Leu-1 B. *Immunol Allergy Clin North Am.* 8:3-15, 1988.
- Harrington MG, Merrill CR, Torrey EF. Differences in cerebrospinal fluid proteins between patients and normal persons. *Clin Chem.* 31: 722-726, 1985.
- Hashimoto M, Ishikawa Y, Yokota S *et al.* Action side of circulating interleukin-1 on the rabbit brain. *Brain Res.* 540: 217-223, 1991.
- Heath RG, McCarron KL, O'Neil CE. Antiseptal brain antibody in IgG of schizophrenic patients. *Biol Psychiatry.* 25: 725-733, 1989.
- Heeringa M, Honkoop P, de Man RA, Feenstra J, Smits CM. Major psychiatric side effects of interferon alpha-2b. *Ned Tijdschr Geneesk.* 142: 1618-1621, 1998.
- Henneberg A, Riedl B, Dumke HO, Kornhuber HH. T-lymphocyte subpopulations in schizophrenic patients. *Eur Arch Psychiatr Neurol Sci.* 239: 283-284, 1990.
- Henning J. Psychoneuroimmunologie: Verhaltens- und Befindenseinflüsse auf das Immunsystem bei Gesundheit und Krankheit. Göttingen, Bern: Hogrefe, Verl. für Psychologie. 1998.
- Hirata-Hibi M, Higashi S, Tachibana T *et al.* Stimulated lymphocytes in schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry.* 39: 82-87, 1982.
- Hirata-Hibi M, Hayashi K. The anatomy of the P lymphocyte. *Schizophr Res.* 8: 257-262, 1993.
- Hoechtlen-Vollmar W, Müller N. Autochthone Masernantikörper im Liquor schizophrener Patienten. *Nervenheilkunde.* 11: 339-343, 1992.
- Hollister JM, Laing P, Mednick SA. Rhesus incompatibility as a risk factor for schizophrenia in male adults. *Arch Gen Psychiatry.* 53: 19-24, 1996.
- Huang YP, Perrin L, Miescher PA, Zubler RH. Correlation of T and B cell activities in vitro and serum IL-2 levels in systemic lupus erythematosus. *J Immunol.* 141: 827-833, 1988.
- Hyde TM, Weinberger DR. The brain in schizophrenia. *Semin Neurol.* 10: 276-286, 1990.
- Ingvar DH, Franzen G. Distribution of cerebral activity in chronic schizophrenia. *Lancet.* 2: 1484-1486, 1974.
- Janeway CA, Travers P. Immunologie. Heidelberg; Berlin; Oxford: Spektrum, Akademischer Verlag, 1995.
- Jenmalm MC, Bjorksten B, Macaubas C, Holt BJ, Smallacombe TB, Holt PG. Allergen-induced cytokine secretion in relation to atopic symptoms and immunoglobulin E and

- immunoglobulin G subclass antibody responses. *Pediatr Allergy Immunol.* 10: 168-177, 1999.
- Jones GH, Kelly CL, Davies JA. HIV and onset of schizophrenia. *Lancet.* 1: 982, 1987.
- Kaufmann CA, Weinberger DR, Yolken RH, Torrey EF, Potkin SG. Viruses and schizophrenia. *Lancet.* 2: 1136-1137, 1983.
- Kaufmann CA, DeLisi LE, Torrey FE, Folstein SE, Smith WJ. T-Lymphocyte subsets and schizophrenia. In: Kursak E et al. (Hrsg.). *Virus, Immunity and Mental disorders.* New York: Plenum Press. 307-320, 1987.
- Kay S, Oppler L, Fiszbein A. Positive and negative syndrome scale (PANSS) manual. New York: Multi-Health Systems, North Tonawanda. 1986.
- Kety SS, Rosenthal d, Wender PH, Schulsinger F. The types and prevalence of mental illness in the biological and adoptive families of adopted schizophrenics. *J Psychiatr Res.* 1: 345-362, 1968.
- Kilidireas K, Latov N, Strauss DH *et al.* Antibodies to the human 60 kDa heat-shock protein in patients with schizophrenia. *Lancet.* 340: 569-572, 1992.
- Kirch DG, Kaufmann CA, Papadopoulous NM, Martin B, Weinberger DR. Abnormal cerebrospinal fluid indices in schizophrenia. *Biol Psychiatry.* 20: 1039-1046, 1985.
- Kirch DG, Alexander RC, Suddath NM *et al.* Blood-CSF barrier permeability and central nervous system immunoglobulin G in schizophrenia. *J Neural Transm.* 89: 219-232, 1992.
- Kirch DG. Infection and autoimmunity as etiologic factors in schizophrenia: a review and reappraisal. *Schizophr Bull.* 19: 355-370, 1993.
- Knight JG. Dopamine-receptor-stimulating autoantibodies, a possible cause of schizophrenia. *Lancet.* 1: 1073-1076, 1982.
- Kokai M, Hirata I, Adachi M, Hatotani N, Hakomori S, Tachibana T. Elevated Le^y antigen expression on T-lymphocytes in schizophrenic patients. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci.* 243: 82-86, 1993.
- Kokai M, Morita Y, Fukuda H, Hatotani N. Immunophenotypic studies on atypical lymphocytes in psychiatric patients. *Psychiatry Res.* 77: 105-112, 1998.
- Kolyaskina GI, Sekirina TP, Zozulya AA, Kushner SG, Zuzulkovskaya MYa, Abramova LI. Some aspects of immunologic studies in schizohrenia. In: Kursak E et al. (Hrsg.). *Virus, Immunity and Mental Disorders.* New York: Plenum Press. 285-294, 1987.
- Kornhuber J, Bauer K. Störung der Blut-Liquor-Schranke bei Schizophrenie. *Dtsch Med Wochenschr.* 26: 1041, 1986.
- Kraepelin E. *Psychiatrie. Ein Lehrbuch.* 5. Auflage. Leipzig: Barth, 1896.

- Krüger KW. Lupus erythematoses und Zentralnervensystem. *Nervenarzt*. 55: 165-172, 1984.
- Kurtz G, Müller N. The antiphospholipid syndrome and psychosis. *Am J Psychiatry*. 151: 1841-1842, 1994.
- Legros S, Mendlewicz J, Wybran J. Immunoglobulins, autoantibodies and other serum protein fractions in psychiatric disorders. *Eur Arch Psychiatry Neurol Sci*. 235: 9-11, 1985.
- Levine S, Ursin H. What is stress? In: Brown MR, Rivier C, Koob G (Hrsg.). *Neurobiology and neuroendocrinology of stress*. New York: Marcel Decker. 3-21, 1991.
- Libikova H, Breir S, Kosikova M, Pagady J, Stunzer D, Ujhazyova D. Assay of interferon and viral antibodies in the cerebrospinal fluid in clinical neurology and psychiatry. *Acta Biol Med Germ*. 38: 879-893, 1979.
- Licinio J, Seibyl JP, Altemus M, Charney DS, Krystal JH. Elevated CSF levels of interleukin-2 in neuroleptic-free schizophrenic patients. *Am J Psychiatry*. 150: 1408-1410, 1993.
- Lieb K, Brunnhuber S. *Psychiatrie, Ein Kurzlehrbuch nach dem neuen Gegenstandskatalog für den zweiten Abschnitt der Aertzlichen Prüfung*. München: Mediscript-Verlag, 1993.
- Lin MS, Chen YW. B cell differentiation. II. Isotype potential of a single B cell. *Cell Immunol*. 150: 343-352, 1993.
- Lin A, Kenis G, Bignotti S *et al*. The inflammatory response system in treatment-resistant schizophrenia: increased serum interleukin-6. *Schizophr Res*. 32: 9-15, 1998.
- Lucey DR, Clerici M, Shearer GM. Type 1 and type 2 cytokine dysregulation in human infectious, neoplastic, and inflammatory diseases. *Clin Microbiol Rev*. 9: 532-562, 1996.
- Lyons MJ, Kremen WS, Tsuang MT, Faraone SV. Investigating putative genetic and environmental forms of schizophrenia: Methods and findings. *Int Rev Psychiatry*. 1: 259-276, 1989.
- Maes M, Meltzer HY, Bosmans E. Immune-inflammatory markers in schizophrenia: comparison to normal controls and effects of clozapine. *Acta Psychiatr Scand*. 89: 346-351, 1994.
- Maes M, Meltzer KY, Buckley P, Bosmans E. Plasma-soluble interleukin-2 and transferrin receptor in schizophrenia and major depression. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*. 244: 325-329, 1995a.
- Maes M, Bosmans E, Calabrese J, Smith R, Meltzer HY. Interleukin-2 and Interleukin-6 in schizophrenia and mania: effects of neuroleptics and mood-stabilizers. *J Psychiatr Res*. 29: 141-152, 1995b.

- Masserini C, Vita A, Basile R *et al.* Lymphocyte subsets in schizophrenic disorders. Relationship with clinical, neuromorphological and treatment variables. *Schizophr Res.* 3: 269-275, 1990.
- McAllister CG, Rapaport MH, Pickar D, Paul SM. Effects of short-term administration of antipsychotic drugs on lymphocyte subsets in schizophrenic patients. *Arch Gen Psychiatry.* 46: 957-958, 1989a.
- McAllister CG, Rapaport MH, Pickar D *et al.* Increased numbers of CD5+ B lymphocytes in schizophrenic patients. *Arch Gen Psychiatry.* 46: 890-894, 1989b.
- McAllister CG, van Kammen DP, Rehn TJ *et al.* Increases in CSF levels of interleukin-2 in schizophrenia: effects of recurrence of psychosis and medication status. *Am J Psychiatry.* 152: 1291-1297, 1995.
- McDaniel JS. Psychoimmunology: implications for future research. *Southern Medical Journal.* 85: 388-396, 1992a.
- McDaniel JS, Jewart RD, Eccard MB *et al.* Natural killer cell activity in schizophrenia and schizoaffective disorder: a pilot study. *Schizophr Res.* 8: 125-128, 1992b.
- McGuffin P, Farmer A, Gottesmann II. Is there really a split in schizophrenia? The genetic evidence. *Br J Psychiatry.* 150: 581-592, 1987.
- McGuffin P, Asherson P, Owen M, Farmer A. The strength of the genetic effect: Is there room for an environmental influence in the aetiology of schizophrenia? *Br J Psychiatry.* 164: 593-599, 1994.
- McKusick VA. Schizophrenia, SCZD. OMIM #181500, 1986. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Omim/dispmim?181500>)
- Mednick SA, Machon RA, Huttunen MO, Bonett D. Adult schizophrenia following prenatal exposure to an influenza epidemic. *Arch Gen Psychiatry.* 45: 189-192, 1988.
- Menninger K. Influenza and schizophrenia. *Am J Psychiatry.* 82: 469-529, 1926.
- Merill JE. Tumor necrosis factor alpha, interleukin 1 and related cytokines in brain development: normal and pathological. *Dev Neurosci.* 14: 1-10, 1992.
- Mittleman BB, Castellanos FX, Jacobson LK, Rapaport JL, Swedo SE, Shearer GM. Cerebrospinal fluid cytokines in pediatric neuropsychiatric disease. *J Immunol.* 159: 2994-2999, 1997.
- Moldin SO. Sponsoring initiatives in the molecular genetics of mental disorders. In: Genetics and Mental disorders: Report of the NIMH Genetics Workgroup. Bethesda, Md.: NIH 98-4268, 1998.
- Morgan PB, Gasque P. Expression of complement in the brain: role in health and disease. *Immunol Today.* 17: 461-466, 1996.

- Morimoto C, Matsuyama T, Rudd CE, Forsgren A, Letvin NL, Schlossman SF. Role of the 2H4 molecule in the activation of suppressor inducer function. *Eur J Immunol.* 18: 731-737, 1988.
- Mosmann TR, Sad S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol Today.* 17: 138-146, 1996.
- Müller N, Ackenheil M, Eckstein R, Hofschuster E, Mempel W. Reduced suppressor cell function in psychiatric patients. *Ann NY Acad Sci.* 496: 686-690, 1987.
- Müller N, Ackenheil M, Hofschuster E, Mempel W, Eckstein R. Cellular immunity in schizophrenic patients before and during neuroleptic treatment. *Psychiatry Res.* 37: 147-160, 1991.
- Müller N, Ackenheil M, Hofschuster E, Mempel W, Eckstein R. Cellular immunity, HLA-class I antigens, and family history of psychiatric disorder in endogenous psychoses. *Psychiatry Res.* 48: 201-217, 1993a.
- Müller N, Hofschuster E, Ackenheil M, Eckstein R. T-cells and psychopathology in schizophrenia: relationship to the outcome of neuroleptic therapy. *Acta Psychiatr Scand.* 87: 66-71, 1993b.
- Müller N, Ackenheil M. Immunoglobulin and albumin contents of cerebrospinal fluid in schizophrenic patients: The relationship to negative symptomatology. *Schizophr Res.* 54: 223-228, 1995.
- Müller N, Empl M, Riedel M, Schwarz M, Ackenheil M. Neuroleptic treatment increases soluble IL-2 receptors and decreases soluble IL-6 receptors in schizophrenia. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci.* 247: 308-313, 1997a.
- Müller N. Die Rolle des Zytokinnetzwerks im ZNS und psychische Störungen. *Nervenarzt.* 68: 11-20, 1997b.
- Müller N, Ackenheil M. Psychoneuroimmunology and the cytokine action in the CNS: implications for psychiatric disorders. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 22, 1-33, 1998a.
- Müller N, Schlesinger BC, Hadjamu M *et al.* Increased frequency of CD8 positive gamma/delta T-lymphocytes (CD8+ γ/δ +) in unmedicated schizophrenic patients: relation to impairment of the blood-brain barrier and HLA-DPA*02011. *Schizophr Res.* 32: 69-71, 1998b.
- Müller N, Riedel M, Hadjamu M, Schwarz M, Ackenheil M, Gruber R. Increase in expression of adhesion molecule receptors on T helper cells during antipsychotic treatment and relationship to blood-brain barrier permeability in schizophrenia. *Am J Psychiatry.* 156 (4): 634-636, 1999a.

- Müller N, Riedel M, Ackenheil M, Schwarz MJ. The role of immune function in schizophrenia: an overview. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci.* 249(Suppl. 4): 62-68, 1999b.
- Mukherjee S, Mahadik, SP. A new paradigm for schizophrenia? *Schizophr Res.* 13: 191-194, 1994.
- Munschauer FE, Hartrich LA, Stewart CC, Jacobs L. Circulating natural killer cells but not cytotoxic T lymphocytes are reduced in patients with active relapsing multiple sclerosis and little clinical disability as compared to controls. *J Neuroimmunol.* 62: 177-181, 1995.
- Murray RM, Lewis SW, Reveley AM. Towards an aetiological classification of schizophrenia. *Lancet.* I: 1023-1026, 1985.
- Murray RM, O'Callaghan E, Castle DJ, Lewis SW. A neurodevelopmental approach to the classification of schizophrenia. *Schizophr Bull.* 18:319-332,1992.
- Norris JG, Benveniste EN. Interleukin-6 production by astrocytes: induction by the neurotransmitter norepinephrine. *J Neuroimmunol.* 45: 137-146, 1993.
- Nyland H, Naess A, Lunde H. Lymphocyte subpopulations in peripheral blood from schizophrenic patients. *Acta Psychiatr Scand.* 61: 313-318, 1980.
- O'Callaghan E, Sham P, Takei N *et al.* Schizophrenia after prenatal exposure to 1957 A2 influenza epidemic. *Lancet.* 337, 1248-1250, 1991.
- O'Callaghan E, Gibson T, Colohan HA *et al.* Risk of schizophrenia in adults born after obstetric complications and their association with early onset of illness: a controlled study. *Br Med J.* 305: 1256-1259, 1992.
- O'Donnell MC, Catts SV, Ward PB *et al.* Increased production of interleukin-2 (IL-2) but not soluble interleukin-2 receptors (sIL-2R) in unmedicated patients with schizophrenia and schizophreniform disorder. *Psychiatry Res.* 65: 171-178, 1996.
- Oldstone M. Viral alteration of cell function: viruses can cause disease in the absence of morphological evidence of cell injury: implication for uncovering new diseases in the future. *Sci Am.* 261: 42-48, 1989.
- Overall JE, Gorham DR, The brief Psychiatric Rating Scale. *Psychol Rep.* 10: 799-810, 1962.
- Pert CB, Knight JC, Laing P, Markwell MAK. Scenarios for a viral etiology of schizophrenia. *Schizophr Bull.* 14: 243-247, 1988.
- Pietschmann P, Cush J, Lipsky E *et al.* Identification of subsets of human T cells capable of enhanced transendothelial migration. *J Immunol.* 149: 1170-1178, 1992.
- Preble OT, Torrey EF. Serum interferon in patients with psychosis. *Am J Psychiatry.* 142: 1184-1186, 1985.

- Printz DJ, Strauss DH, Goetz R *et al.* Elevation of CD5+ B lymphocytes in schizophrenia. *Biol Psychiatry*. 46: 110-118, 1999.
- Rabin BS, Ganguli R, Cunnick JE, Lysle DT. The central nervous system – immune system relationship. *Clin Lab Med*. 8: 253-268, 1988.
- Radewicz K, Garey LJ, Gentleman SM, Reynolds R. Increase in HLA-DR immunoreactive microglia in frontal and temporal cortex of chronic schizophrenics. *J Neuropathol Exp Neurol*. 59: 137-150, 2000.
- Rapaport MH, McAllister CG, Pickar D, Nelson DL, Paul SM. Elevated levels of soluble interleukin-2 receptors in schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry*. 46: 291-292, 1989.
- Rapaport MH, Torrey EF, McAllister CG, Nelson DL, Pickar D, Paul SM. Increased serum soluble interleukin-2 receptors in schizophrenic monozygotic twins. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*. 243: 7-10, 1993.
- Raps A, Abramovich Y Assael M *et al.* Relation between schizophrenic-like psychosis and Sjögren-syndrome (SS). *Isr J Psychiatry Relat Sci*. 23: 321-324, 1986.
- Raskin D, Frank S. Herpes encephalitis with catatonic stupor. *Arch Gen Psychiatry*. 31: 544-546, 1974.
- Reich T, James JW, Morris CA. The use of multiple thresholds in determining the mode of transmission of semi-continuous traits. *Ann Hum Genet*. 36: 163-184, 1972.
- Renner C, Jung W, Sahin U *et al.* The role of lymphocyte subsets and adhesion molecules in T cell-dependent cytotoxicity mediated by CD3 and CD28 bispecific monoclonal antibodies. *Eur J Immunol*. 25: 2027-2023, 1995.
- Reveley AM, Reveley MA, Clifford RM. Cerebral ventricular size in twins discordant for schizophrenia. *Lancet*. i: 540-541, 1982.
- Roederer M, Gregson Dubs J, Anderson MT, Raju PA, Herzenberg LA, Herzenberg LA. CD8 naive T cell counts decrease progressively in HIV-infected adults. *J Clin Invest*. 95: 2061-2066, 1995.
- Sasaki T, Nanko S, Fukuda R, Kawate T, Kunugi H, Kazamatsuri H. Changes of immunological functions after acute exacerbation in schizophrenia. *Biol Psychiatry*. 35: 173-178, 1994.
- Sato K, Miyasaka N, Yamaoka K, Okuda M, Yata J, Nishioka K. Quantitative defect of CD4+2H4+ cells in systemic lupus erythematosus and Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum*. 30: 1407-1411, 1987.

- Schäfer M, Messer T, Wegner U, Schmid-Wendtner MH, Vokenandt M. Psychiatric side effects during adjuvant therapy with interferon-alpha in patients with malignant melanoma. Clinical evaluation as well as diagnostic and therapeutic possibilities. *Hautarzt*. 50: 654-658, 1999.
- Schedlowski M. Stress, Hormone und zelluläre Immunfunktionen: ein Beitrag zur Psychoneuroimmunologie. Heidelberg; Berlin; Oxford: Spektrum, Akad. Verl., 1994.
- Schedlowski M. Psychoneuroimmunologie. Heidelberg; Berlin; Oxford: Spektrum, Akad. Verl., 1996.
- Schmauss C, Emrich HM. Dopamine and the actions of opiates: A reevaluation of the dopamine hypothesis of schizophrenia with special consideration of the role of endogenous opioids in the pathogenesis of schizophrenia. *Biol Psychiatry*. 20: 1211-1231, 1985.
- Schmitz G, Rothe G. Durchflusszytometrie in der klinischen Zelldiagnostik. Stuttgart; New York: Schattauer, 1994.
- Schwarz MJ, Riedel M, Gruber R, Müller N, Ackenheil M. Autoantibodies against 60-kDa heat shock protein in schizophrenia. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*. 248: 282-288, 1998a.
- Schwarz MJ, Ackenheil M, Riedel M, Müller N. Blood-cerebrospinal fluid barrier impairment as indicator for an immune process in schizophrenia. *Neurosci Lett*. 253: 201-203, 1998b.
- Schwarz MJ, Riedel M, Gruber R, Ackenheil M, Müller N. Antibodies to heat shock proteins in schizophrenic patients: implications for the mechanism of the disease. *Am J Psychiatry*. 156: 1103-1104, 1999.
- Schwartz JP, Stevens JR. Transmissible agent in schizophrenic CSF. *Neurology*. 38(Suppl.): 119, 1988.
- Selye H. The stress of life. New York: McGraw-Hill, 1956.
- Semnani RT, Nutman TB, Hochman P, Shaw S, van Seventer GA. Costimulation by purified intercellular adhesion molecule 1 and lymphocyte function-associated antigen 3 induces distinct proliferation, cytokine and cell surface antigen profiles in human "naive" and "memory" CD4+ T cells. *J Exp Med*. 180: 2125-2135, 1994.
- Sham P, O'Callaghan E, Takei N *et al*. Schizophrenia following pre-natal exposure to influenza epidemics between 1939 and 1960. *Br J Psychiatry*. 160: 461-466, 1992.
- Shintani F, Kanba S, Maruo N *et al*. Serum Interleukin-6 in schizophrenic patients. *Life Sciences*. 49: 661-664, 1991.

- 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.* 13: 3574-3581, 1993.
- Shrikant P, Benveniste EN. The central nervous system as an immunocompetent organ. *J Immunol.* 157: 1819-1822, 1996.
- Sierra-Honigmann AM, Carbone KM, Yolken RH. Polymerase Chain Reaction (PCR) search for viral nucleic acid sequences in schizophrenia. *Br J Psychiatry.* 166: 55-60, 1995.
- Sleasman JW, Morimoto C, Schlossman SF, Tedder TF. The role of functionally distinct helper T lymphocyte subpopulations in the induction of human B cell differentiation. *Eur J Immunol.* 20: 1357-1366, 1990.
- Smith RS. Is schizophrenia caused by excessive production of interleukin-2 and interleukin-2 receptors by gastrointestinal lymphocytes? *Med Hypotheses.* 34: 225-229, 1991.
- Smith RS. A comprehensive macrophage-T-lymphocyte theory of schizophrenia. *Med Hypotheses.* 39: 248-257, 1992.
- Spangelo BL, Judd AM, Isakson PC, MacLeod RM. Interleukin-6 stimulates anterior pituitary hormone release in-vitro. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 125: 575-577, 1989.
- Sperner-Unterweger B, Barnas C, Fleischhacker WW. Is schizophrenia linked to alteration in cellular immunity? *Schizophr Res.* 2: 417-421, 1989.
- Sperner-Unterweger B, Barnas C, Fuchs C *et al.* Neopterin production in acute schizophrenic patients: An indicator of alterations of cell-mediated immunity. *Psychiatry Res.* 42: 121-128, 1992.
- Sperner-Unterweger B, Whitworth A, Kemmler G *et al.* T-cell subsets in schizophrenia: a comparison between drug-naive first episode patients and chronic schizophrenic patients. *Schizophr Res.* 38: 61-70, 1999.
- Spitzer RL, Williams JBW, Gibbon M, First MB. Structured Clinical Interview for DSM-III-R, Version 1.0 (SCID). Washington, DC: American Psychiatric Press. 1990
- Stevens JR. Schizophrenia and multiple sclerosis. *Schizophr Bull.* 14: 231-241, 1988.
- Stöber G, Kocher I, Franzek E, Beckmann H. First-trimester maternal gestational infection and cycloid psychosis. *Acta Psychiatr Scand.* 96: 319-24, 1997.
- Streit WJ, Kincaid-Colton CA. Das Immunsystem des Gehirns. *Spektrum der Wissenschaft.* Januar 1996.
- Susser S, Neugebauer R, Hoek HW *et al.* Schizophrenia after prenatal famine: further evidence. *Arch Gen Psychiatry.* 53: 25-31, 1996.

- Taller AM, Asher DM, Pomeroy KL *et al.* Search for viral nucleic acid sequences in brain tissues of patients with schizophrenia using nested polymerase chain reaction. *Arch Gen Psychiatry.* 53: 32-40, 1996.
- Torrey EF, Yolken, RH, Winfrey CJ. Cytomegalievirus antibody in cerebrospinal fluid of schizophrenic patients detected by enzyme immunoassay. *Science.* 216:892-893, 1982.
- Torrey EF, Albrecht P, Behr DE. Permeability of the blood-brain barrier in psychiatric patients. *Am J Psychiatry.* 142: 657-658, 1985.
- Torrey EF, Kaufmann CA. Schizophrenia and Neuroviruses. In: the Neurology of schizophrenia, ed. Nasrallah HA, Weinberger DR. Amsterdam, New York , Oxford: Elsevier Science Publishers B.V., 361-376, 1986.
- Torrey EF, Miller J, Rawlings R, Yolken RH. Seasonality of births in schizophrenia and bipolar disorder: a review of the literature. *Schizophr Res* 28: 1-38, 1997.
- Trowbridge I, Thomas ML. CD45: an emerging role as a protein tyrosine phosphatase required for lymphocyte activation and development. *Ann Rev Immunol.* 12: 85-116, 1994.
- Tsuang MT, Faraone SV. The case for heterogeneity in the etiology of schizophrenia. *Schizophr Res.* 17: 161-175, 1995.
- Tyndall A. News in autoimmune disease. *Schweiz Med Wochenschr.* 130: 113-118, 2000.
- Van Kammen DP, Mann L, Scheinin M, Van Kammen WB, Linnoila M. Spinal fluid monoamine metabolites and anti-cytomegalovirus antibodies and brain scan evaluation in schizophrenia. *Psychopharmacol Bull.* 20: 519-522, 1984.
- Van Kammen DP, McAllister-Sistilli CG, Kelley ME. Relationship between immune and behavioral measures in schizophrenia. In: Wieselmann (Hrsg.). Current Update in Psychoimmunology. Wien, NY: Springer Verlag. 51-55, 1997.
- VaughanWT, Sullivan JC, Elmadjian F. Immunity and schizophrenia. *Psychosom Med.* 2: 327-333, 1949.
- Villemain F, Chatenoud L, Guillbert E, Pelicier Y, Bach JF. Decreased production of interleukin-2 in schizophrenia. *Ann NY Acad Sci.* 496: 669-675, 1987.
- Villemain F, Chatenoud L, Galinowski A *et al.* Aberrant T cell-mediated immunity in untreated schizophrenic patients: deficient interleukin-2 production. *Am J Psychiatry.* 146: 609-616, 1989.
- Vita A, Dieci M, Giobbio GM *et al.* A reconsideration of the relationship between cerebral structural abnormalities and family history of schizophrenia. *Psychiatry Res.* 53: 41-55, 1994.

- Waltrip RW 2d, Carrigan DR, Carpenter WT Jr. Immunopathology and viral reactivation. A general theory of schizophrenia. *J Nerv Ment Dis.* 178: 729-738, 1990.
- Wada T, Seki H, Konno A *et al.* Developmental changes and functional properties of human memory T cell subpopulations defined by CD60 expression. *Cell Immunol.* 187: 117-123, 1998.
- 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.* 246: 279-284, 1996.
- Wong ML, Licinio J. Localization of interleukin 1 type I receptor mRNA in rat brain. *Neuroimmunomodulation.* 1: 110-115, 1994.
- Wright J, Gill M, Murray RM. Schizophrenia: genetics and the maternal immune response to viral infection. *Am J Med Genet Neuropsychiat Genet.* 48: 40-46, 1993.
- Wright P, Donaldson PT, Underhill JA, Choudhuri K, Doherty DG, Murray RM. Genetic association of the HLA DRB1 gene locus on chromosome 6p21.3 with schizophrenia. *Am J Psychiatry.* 153: 1530-1533, 1996.
- Wyatt RJ. Neurodevelopmental abnormalities and schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry.* 53: 11-15, 1996.
- Xu HM, Wei J, Hemmings GP. Changes of plasma concentrations of interleukin-1 α and interleukin-6 with neuroleptic treatment for schizophrenia. *Br J Psychiatry.* 164: 251-253, 1994.
- YolkenRH, Torrey EF. Viruses, schizophrenia, and bipolar disorder. *Clin Microbiol Rev.* 8: 131-145, 1995.
- Zalcman S, Green-Johnson JM, Murray J, Nance DM, Dyck D, Anisman H, Greenberg AH. Cytokine-specific central monoamine alterations induced by interleukin-1, -2 and -6. *Brain Res.* 643: 40-49, 1994.
- Zhao Z, Granucci F, Yeh L *et al.* Molecular mimicry by herpes simplex virus-type 1: autoimmune disease after viral infection. *Science.* 279: 1344-1347, 1998.

VII. PANSS-Manual: Bewertungsbogen

Positive and Negative Syndrome Scale (PANSS)

BEWERTUNGSBOGEN

Stanley R. Kay, Ph.D.
Lewis A. Opler, M.D., Ph. D.
Abraham Fiszbein, M.D.

Patient: _____ Untersucher: _____

Beobachtungszeitraum: _____ Datum: _____

Bei der Durchführung des klinischen Interviews zutreffende Punktzahl für jede Dimension einkreisen. Dabei die im Bewertungsleitfaden angegebenen Definitionen der Items, Beschreibungen der Bewertungsgrundlagen und Hinweise für die Punktevergabe beachten.

	nicht vorh.	min.	leicht	mittel	mittel - stark	stark	extr.
PLUS-SKALA							
P1. Wahnvorstellungen	1	2	3	4	5	6	7
P2. Formale Denkstörungen	1	2	3	4	5	6	7
P3. Halluzinationen	1	2	3	4	5	6	7
P4. Erregung	1	2	3	4	5	6	7
P5. Größenwahn	1	2	3	4	5	6	7
P6. Argwohn/Verfolgungs- wahn	1	2	3	4	5	6	7
P7. Feindseligkeit	1	2	3	4	5	6	7
MINUS-SKALA							
N1. Affektverarmung	1	2	3	4	5	6	7
N2. Emotionale Isolation	1	2	3	4	5	6	7
N3. Kontaktmangel	1	2	3	4	5	6	7
N4. Passiv-apathische Isolation	1	2	3	4	5	6	7

	nicht vorh.	min.	leicht	mittel -			extr.
				mittel	stark	stark	
N5. Vermindertes abstraktes Denkvermögen	1	2	3	4	5	6	7
N6. Mangelnde Spontaneität und Gesprächsfähigkeit	1	2	3	4	5	6	7
N7. Stereotypes Denken	1	2	3	4	5	6	7
PSYCHOPATHOLOGISCHE GLOBALSKALA							
G1. Leibliche Befindlichkeitsstörungen	1	2	3	4	5	6	7
G2. Angst	1	2	3	4	5	6	7
G3. Schuldgefühle	1	2	3	4	5	6	7
G4. Gespanntheit	1	2	3	4	5	6	7
G5. Manieriertheit/Posieren	1	2	3	4	5	6	7
G6. Depression	1	2	3	4	5	6	7
G7. Verlangsamte Motorik	1	2	3	4	5	6	7
G8. Unkooperativität	1	2	3	4	5	6	7
G9. Ungewöhnliche Denkinhalte	1	2	3	4	5	6	7
G10. Desorientierung	1	2	3	4	5	6	7
G11. Aufmerksamkeitsschwäche	1	2	3	4	5	6	7
G12. Verminderte Urteils- und Einsichtsfähigkeit	1	2	3	4	5	6	7
G13. Gestörte Willensbildung	1	2	3	4	5	6	7
G14. Mangelnde Impulskontrolle	1	2	3	4	5	6	7
G15. Selbstbezogenheit	1	2	3	4	5	6	7
G16. Aktive soziale Meidung	1	2	3	4	5	6	7

Skala	Gesamt	Perzentil	Spannweite
Plus-Symptomatik	_____	_____	_____
Minus-Symptomatik	_____	_____	_____
Gesamt	_____	_____	_____
Globalpsychopathol.	_____	_____	_____
Anzahl der Bewertungszahlen > 3 auf der Plus-Skala			_____
Anzahl der Bewertungszahlen > 3 auf der Minus-Skala			_____
Vorliegender Syndrom-Typ	_____		

*Provisorische Normwerte der PANSS
(ermittelt für eine Stichprobe von 138 Schizophrenen)*

Umrechnungstabelle Rohwerte in Perzentil-Rangzahlen

Perzentil- Rangzahl	Rohwerte auf den PANSS-Bewertungsskalen			
	Plus-Skala	Minus-Skala	Gesamtskala	psychopathol. Globalskala
99,9	37	40	22	69
99	33	36	17	62
98	31	34	15	59
95	28	31	11	55
90	26	29	8	51
85	25	28	6	49
80	24	27	4	47
75	23	26	3	45
70	22	25	2	43
65	21	24	1	42
60	20	23	0	41
55	—	22	- 1	39
50	19	21	- 2	38
45	18	20	- 4	37
40	17	19	- 5	36
35	16	18	- 6	34
30	15	17	- 7	33
25	14	16	- 8	31
20	13	15	- 9	29
15	12	14	-11	27
10	11	13	-13	25
5	9	11	-15	21
2	7	8	-19	17
1	—	7	-21	—
0,1	—	—	-26	—

VIII. Danksagung

Für die Ermöglichung dieser Arbeit und die freundliche Überlassung des Themas möchte ich mich ganz herzlich bei Herrn Prof. Dr. med. Dipl.-Psych. Norbert Müller bedanken. Er hat das Fortschreiten dieser Arbeit stets wohlwollend begleitet.

Besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. med. Rudolf Gruber, der mich während des gesamten experimentellen Teils im Labor betreut und unterstützt hat und auch für Diskussionen nach Abschluss des praktischen Teils immer ein offenes Ohr hatte. Bei ihm bedanke ich mich auch sehr für das Korrekturlesen dieser Arbeit und die konstruktiven Anregungen.

Bei Herrn Professor Dr. med. Gerth Riethmüller als Direktor des Immunologischen Instituts möchte ich mich herzlich für die Möglichkeit bedanken, als Gast in seinem Institut arbeiten zu dürfen.

Allen Mitarbeitern der verschiedenen Labors in der Neurochemischen Abteilung der Psychiatrischen Klinik und des Immunologischen Instituts der LMU München möchte ich Dank sagen für die nette Zusammenarbeit, ihre freundliche Aufnahme in den jeweiligen Laboren und ihre Hilfsbereitschaft.

Für die Einführung in die Technik der Durchflusszytometrie danke ich insbesondere meiner Mit-Doktorandin Miriam Hadjamu, auch für manch wertvolle Hinweise und aufmunternde Gespräche und dafür, dass sie mir Messdaten ihrer Patienten zur Verfügung gestellt hat.

Vielen Dank schließlich an Herrn Dr. med. Michael Riedel für die Sammlung der Patientenproben, die klinische Evaluation der Patienten und Verwaltung der Daten und für die Tipps zur statistischen Auswertung.

Nicht zuletzt bin ich meinen lieben Eltern sehr dankbar für die Unterstützung meines Medizinstudiums, sowie meinem Mann Emanuel, meinem Bruder Markus und allen Freunden, deren Zeit und Geduld ich in Anspruch nehmen durfte.

IX. Curriculum

PERSÖNLICHE DATEN:

SABINE KROIB BENNINGER

Geboren am 20.07.1971 in D-84494 Neumarkt- St. Veit,
seit 26.02.2000 verheiratet mit Emanuel D. L. Benninger

SCHULBILDUNG:

1978-1982 Grundschule Neumarkt-St. Veit
1982-1991 Staatliches Gymnasium Vilsbiburg
7/91 Abitur

STUDIUM:

10/91-5/98 Studium der Humanmedizin an der
Ludwig-Maximilians-Universität München
5/98 Abschluss mit dem 3. Staatsexamen
6/96 und 3/98 Amerikanisches Staatsexamen Step 1 und 2

PRAKTISCHES JAHR:

4-8/97 Innere Medizin, Klinik B des Kantonsspitals St. Gallen / Schweiz
8-11/97 Pädiatrie, Klinik für Kinder- und Jugendmedizin, ZK Augsburg
12/97-3/98 Chirurgie, Zentralklinikum Augsburg

ZUSÄTZLICHE TÄTIGKEITEN:

SS 95 Laborpraktikum in der Abteilung für Retrovirologie im Max-von-
Pettenkofer-Institut München
WS 95/96 Co-Assistentin im Kursus der Makroskopischen Anatomie der
LMU-München

DISSERTATION:

1996-98 experimentelle Arbeit in der Abteilung für Neurochemie der
Psychiatrischen Universitätsklinik und am Institut für Immunologie der
LMU München bei Herrn Prof. N. Müller und PD Dr. R. Gruber

BERUF:

6/98-11/99 Ärztin im Praktikum: Wissenschaftliche Tätigkeit im Bereich der
Molekulargenetik / Nephrologie an der Univ.-Kinderklinik der Albert-
Ludwigs-Universität Freiburg bei Herrn PD Dr. A. Fuchshuber / Prof.
F. Hildebrandt

12/99-4/00 wissenschaftliche Assistentin an der Univ.-Kinderklinik Freiburg

5/00-12/00 Assistenzärztin an der Universitäts-Kinderklinik Freiburg,
Abteilung Hämatologie / Onkologie

Seit 1/01 Assistenzärztin Pädiatrie am Kinderspital des Kantonsspitals Luzern /
Schweiz