

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

Direktor: Prof. Dr. Peter. G. Falkai

Toll-like Rezeptor Signalkaskade bei Schizophrenie

Dissertation

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

vorgelegt von

Stephanie Maria Ursula Erhardt

aus Roding

2019

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München**

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

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Martin Keck
PD Dr. Arthur Liesz

Mitbetreuung durch die
promovierte Mitarbeiterin: Dr. med. Elif Weidinger

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 15.04.2019

Eidesstattliche Versicherung

Erhardt, Stephanie

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema „Toll-like Rezeptor Signalkaskade bei Schizophrenie“ selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Regensburg, 08.05.2019

Ort, Datum

Stephanie Erhardt

Unterschrift Doktorandin/Doktorand

1 Einleitung	9
1.1 Immunologie	9
1.1.1 Angeborene Immunität	9
1.1.1.1 Zellen des angeborenen Immunsystems	10
1.1.1.2 Humorale Elemente	11
1.1.1.3 Toll-like Rezeptoren	11
1.1.2 Erworbene Immunität	12
1.1.2.1 Antikörper	13
1.1.2.2 Antikörperantwort	14
1.1.2.3 Antigenerkennung durch T-Zellen	15
1.1.3 Autoimmunerkrankungen	15
1.2 Schizophrenie	16
1.2.1 Epidemiologie	17
1.2.2 Symptomatik und Diagnose	17
1.2.3 Ätiologie	20
1.2.4 Therapie	21
1.3 Neurobiologische Schizophreniekonzepte	22
1.4 Zielsetzung	24
2 Material und Methoden	26
2.1 Studienkollektiv	26
2.2 Skalen	27
2.2.1 Clinical Global Impression Scale	27
2.2.2 Positive and Negative Syndrome Scale	28
2.2.3 Cohen's Perceived Stress Scale	29
2.3 Blutproben	30
2.3.1 Isolierung humaner mononukleärer Zellen (PBMC)	30
2.3.2 Stimulation	30
2.3.3 Zellaufschluss und Proteinisolierung	31
2.3.4 Bradford-Test	31
2.4 Proteinkonzentrationsbestimmung	32
2.4.1 ELISA	32
2.4.1.1 Materialien und Geräte	33
2.4.1.2 Versuchsdurchführung	34

2.4.2	Versuchsansätze	35
2.5	mRNA-Expressionsbestimmung	35
2.5.1	mRNA-Isolierung	35
2.5.2	Bestimmung der RNA-Quantität und der RNA-Qualität	36
2.5.3	Quantitative Echtzeit-PCR	36
2.5.3.1	Reverse Transkription	37
2.5.3.2	Polymerase-Kettenreaktion	37
2.5.3.3	TaqMan® -Sonde	38
2.5.3.4	Materialien und Geräte	39
2.5.3.5	Versuchsdurchführung	40
2.5.4	Relative Quantifizierung	40
2.5.5	Versuchsansätze	41
2.6	Statistik	42
3	Ergebnisse	43
<hr/>		
3.1	Anamnese	43
3.2	CGI Scale	46
3.3	PANNS	47
3.4	PSS	47
3.5	Gruppenvergleich ohne Stimulation	48
3.5.1	Proteinkonzentration	48
3.5.2	mRNA-Expression	49
3.6	Gruppenvergleich nach Stimulation	51
3.6.1	Bakterielles Lipopolysaccharid: Proteinkonzentration	51
3.6.2	Bakterielles Lipopolysaccharid: mRNA-Expression	52
3.6.3	Virales poly(I:C): Proteinkonzentration	54
3.6.4	Virales poly(I:C): mRNA-Expression	56
3.7	Stimulationseffekt	57
3.7.1	Gruppenvergleich	57
3.7.1.1	Bakterielles Lipopolysaccharid: Proteinkonzentration	57
3.7.1.2	Bakterielles Lipopolysaccharid: mRNA-Expression	60
3.7.1.3	Virales poly(I:C): Proteinkonzentration	63
3.7.1.4	Virales poly(I:C): mRNA-Expression	66
3.8	Medikationseffekt	69

3.9 Korrelationsanalyse	70
4 Diskussion	73
4.1 Diskussion der Methodik	73
4.1.1 Studienkollektiv	73
4.1.2 Blutproben und Messmethoden	74
4.1.3 Statistik	75
4.2 Diskussion der Ergebnisse	76
4.2.1 Anamnestische Daten	76
4.2.2 Proteinkonzentration und mRNA-Expression ohne Stimulation	77
4.2.3 Proteinkonzentration und mRNA-Expression nach Stimulation	80
4.2.4 Medikationseffekt	83
4.2.5 Korrelationsanalyse	84
4.3 Zusammenfassende Interpretation und Ausblick	85
5 Zusammenfassung	87
6 Literaturverzeichnis	89
7 Anhang	97
8 Danksagung	109

1 Einleitung

1.1 Immunologie

Der menschliche Körper ist täglich von Krankheitserregern, Toxinen und anderen schädlichen Substanzen umgeben. Um sich diesen Bedrohungen entgegenzustellen, ist im Laufe der Evolution das Immunsystem entstanden. Dieses hat vier Hauptaufgaben. Zum einem gehört hierzu die immunologische Erkennung, damit Infektionen und ihre Versursacher identifiziert werden können. Anschließend ist das Immunsystem für deren Bekämpfung verantwortlich. Dazu stehen ihm unterschiedliche Möglichkeiten zur Verfügung, wie zum Beispiel das Komplementsystem der Blutproteine, Antikörper, natürliche Killerzellen und andere weiße Blutzellen. Um zu verhindern, dass der Körper vom eigenen Immunsystem geschädigt wird, muss die Immunantwort dementsprechend reguliert werden. Des Weiteren ist es unserem Abwehrsystem möglich, ein immunologisches Gedächtnis auszubilden (Murphy, Travers, & Walport, 2009).

Das menschliche Abwehrsystem besitzt eine angeborene und eine erworbene (adaptive) Immunität, welche unterschiedliche Immunmechanismen auslösen. Durch gegenseitige Unterstützung lässt sich die bestmögliche Abwehr gegen bestimmte Krankheitserreger erreichen (Suerbaum, Burchard, & Kaufmann, 2016).

1.1.1 Angeborene Immunität

Die angeborene Immunantwort reagiert unmittelbar nach dem Erkennen von Pathogenen mit ihren Abwehrmechanismen. Somit wird bereits ein Großteil der Angreifer innerhalb weniger Stunden beseitigt. Für die Abwehr und Bekämpfung der Eindringlinge stehen dem angeborenen Immunsystem mehrere Methoden und körpereigene Zellen zur Verfügung. Sowohl die äußere Haut als auch die Schleimhäute von Atemwege und Verdauungstrakt bilden einen mechanischen und physiologischen Abwehrwall (Schütt & Bröker, 2011). Krankheitserreger, die diesen durchdringen können, werden von Zellen und Molekülen erwartet, die eine angeborene Immunantwort einleiten (Murphy et al., 2009). Wie die konkrete Abwehrreaktion abläuft, wird unter anderem von der Art der Pathogene und vom Eintrittsort bestimmt (Schütt & Bröker, 2011).

1.1.1.1 Zellen des angeborenen Immunsystems

Granulozyten und Monozyten gehören zu den wichtigsten Zellen der angeborenen Immunabwehr. Sie entwickeln sich beim Erwachsenen im Knochenmark aus omnipotenten Stammzellen. Über die myeloide Entwicklungslinie der Hämatopoese differenzieren sie sich zu Leukozyten (weiße Blutkörperchen) (Suerbaum et al., 2016). Die Granulozyten bilden den Hauptanteil der Leukozyten (50 – 70 %) und lassen sich aufgrund ihrer unterschiedlichen Anfärbbarkeit mit bestimmten Farbstoffen in neutrophile, basophile und eosinophile Granulozyten aufteilen (Martin & Resch, 2009). Die kurzlebigen neutrophilen Granulozyten (90 % Hauptanteil der Granulozyten) können verschiedene Arten von Mikroorganismen phagozytieren und abtöten (Suerbaum et al., 2016). Die durch das Blut zirkulierenden Monozyten wandern ins Gewebe ein und werden über Zytokine und pathogene Substanzen veranlasst, sich zu Makrophagen zu differenzieren (Abbas, Murphy, & Sher, 2005). Wie Granulozyten erkennen Makrophagen Krankheitserreger über bestimmte Rezeptoren. Wurde ein Erreger erkannt, können Makrophagen diesen durch Phagozytose aufnehmen und ihn unschädlich machen. Dieser Mechanismus kann ausreichen, eine Infektion abzuwehren. Des Weiteren setzen Makrophagen Entzündungsmediatoren wie Prostaglandine, Leukotriene und plättchenaktivierende Faktoren frei. Durch pathogene Stimulation bilden die einkernigen Phagozyten (Makrophagen) auch Zytokine und Chemokine, die weitere Immunreaktionen veranlassen (Murphy et al., 2009).

Außerdem sind Makrophagen auch für die Präsentation von Proteinantigenen zuständig. Die aus den myeloiden Vorläuferzellen stammenden dendritischen Zellen sind die effektivsten antigenpräsentierenden Zellen des angeborenen Immunsystems und spielen eine wichtige Rolle bei der Kommunikation mit dem adaptiven Immunsystem (Suerbaum et al., 2016). Anders als die bereits beschriebenen Abwehrzellen entstammen die natürlichen Killerzellen (kurz NK-Zellen) der Lymphopoese und gehören somit den Lymphozyten, eine Untergruppe der Leukozyten, an (Suerbaum et al., 2016). Über bestimmte Rezeptoren erkennen NK-Zellen MHC-Klasse-I-Moleküle (*major histocompatibility complex*, kurz MHC) auf den Oberflächen von Körperzellen. Wird dadurch eine gesunde Körperzelle identifiziert, werden die Zerstörungsmechanismen der NK-Zellen inaktiviert. Trifft eine natürliche Killerzelle jedoch auf eine Zelle, die keine MHC-Klasse-I-Moleküle

exprimiert, weil dies zum Beispiel ein Virusinfektion verhindert, wird diese abgetötet (Ljunggren & Kärre, 1990).

1.1.1.2 Humorale Elemente

Das aus humoralen Effektormolekülen bestehende Komplementensystem ist für die Oponisierung von Zellen, Bakteriolyse, Virusneutralisation und die Anlockung und Aktivierung von Abwehrzellen verantwortlich. Die Serumproteine liegen in ihrer inaktiven Form vor. Durch ihre Aktivierung wird eine Reaktionskaskade ausgelöst (Janeway, 2005). Zu den humoralen Bestandteilen gehören sowohl Zytokine als auch Interleukine, die als Botenstoffen wirken, und Akute-Phase-Proteine wie das C-reaktive Protein (kurz CRP). CRP wird in der Leber gebildet und dient als unspezifischer Entzündungsmarker in der Diagnostik (Martin & Resch, 2009). Es kann sowohl Bakterien opsonisieren als auch die Komplementenkaskade auslösen (Murphy et al., 2009).

1.1.1.3 Toll-like Rezeptoren

Krankheitserreger besitzen auf ihren Oberflächen in der Regel molekulare Strukturen, die sich stetig wiederholen. Diese werden auch pathogen-assoziierte molekulare Muster (*pathogen-associated patterns*, kurz PAMP) genannt und können von Mustererkennungsrezeptoren (kurz PRR) erkannt werden (Goutagny & Fitzgerald, 2006). Solche Rezeptoren liegen sowohl als freie Proteine im Blutplasma vor, wie etwa das Mannose-bindende Lektin (kurz MBL), als auch zellgebunden an Leukozyten (Turner, 2003). Hierzu gehört der Makrophagen-Mannose-Rezeptor. Er kann spezifische Zuckermoleküle von vielen Bakterien und Viren erkennen. Gleichzeitig handelt es sich hierbei um einen phagozytotischen Rezeptor, der nach der Bindung eines Pathogens dieses sogleich phagozytieren kann (Napper, Dyson, & Taylor, 2001). Schließlich gibt es noch weitere Rezeptoren, die andere molekulare Strukturen erkennen und zusätzliche Aufgaben erfüllen (Murphy et al., 2009). Makrophagen und dendritische Zellen können durch andere Rezeptoren veranlasst werden, auf ihren Oberflächen Moleküle zu präsentieren, die auf T-Lymphozyten stimulierend wirken. Somit übernehmen jene die Funktion antigenpräsentierender Zellen und verknüpfen das angeborene Immunsystem mit einer adaptiven Immunantwort. Die Familie der Toll-ähnlichen Rezeptoren (auch Toll-like Rezeptoren, kurz TLR) können Aktivierungswege dieser Art auslösen (Heine & Lien, 2003). Der Entdeckung der Toll-like Rezeptoren geht die Forschung um die Taufliede

(*Drosophila melanogaster*) und deren embryonalen Entwicklung voraus. Hierbei wurden Mutationen des Proteins „Toll“ und die Auswirkungen auf dessen Signalwege untersucht. Schließlich beobachtete man, dass der Toll-Signalweg (*nuclear factor κ -light-chain-enhancer of activated B-cells*-Signalweg, kurz NF- κ B-Signalweg) bei erwachsenen Exemplaren und Larven der Drosophilae eine Immunantwort auf bakterielle Infektionen einleitet (Anderson, 2000). Kurz nach dieser Entdeckung fand man bei Wirbeltieren 10 Rezeptoren, die homolog zu den Toll-Rezeptoren waren. Aus diesem Grund nannte man sie „Toll-like“ (deutsch „Toll-ähnlich“) (Gay & Gangloff, 2007). Diese Rezeptoren erkennen spezifische molekulare Strukturen von Bakterien und Viren (Heine & Lien, 2003). Toll-like Rezeptoren sind je nach Art entweder auf den Zelloberflächen von Makrophagen und dendritischen Zellen vertreten, oder in den endosomalen Membranen der genannten Zellen (Anderson, 2000). Der Signalweg des Toll-like Rezeptors TLR-4, der auf der Zelloberfläche von Makrophagen lokalisiert ist, ist, für diese Rezeptorfamilie, der genaueste beschriebene. TLR-4 ist für die Erkennung von bakteriellen Lipopolysacchariden (kurz LPS) zuständig. Zuerst muss der Makrophagenrezeptor CD14 LPS, das zuvor von einem LPS-bindenden Protein (kurz LBP) adaptiert wurde, binden (Takeuchi et al., 1999). Dieser Komplex kann schließlich von TLR-4 mittels MD-2 (*myeloid differentiation factor-2*) Assoziation gebunden werden (Anderson, 2000). Der transmembrane TLR-Rezeptor besitzt intrazellulär eine TIR-Domäne (Toll-IL-1-Rezeptor-Domäne), die durch Stimulation eine Konformationsänderung im Zellinneren durchläuft. Daraufhin bindet die TIR-Domäne das TIR-Adaptermolekül MyD88. Über eine weiterlaufende Aktivierungskaskade kommt es zur Transkription von NF- κ B (Beutler, 2004). Der Transkriptionsfaktor NF- κ B stimuliert wiederum die Expression von Zytokinen wie zum Beispiel des Tumornekrosefaktors- α (kurz TNF- α) (Flint, 2009). Zusätzlich werden costimulierende Moleküle auf den Zelloberflächen exprimiert (Murphy et al., 2009).

1.1.2 Erworbene Immunität

Das adaptive Immunsystem (auch erworbenes Immunsystem genannt) ermöglicht eine spezifisch gerichtete Immunantwort auf einen bestimmten Krankheitserreger. Hierfür stehen der adaptiven Immunität die antigenspezifischen Lymphozyten zur Verfügung. Die Vorläuferzellen entwickeln sich aus omnipotenten Stammzellen über den lymphoiden Entwicklungsweg im Knochenmark (Murphy et al., 2009). Die

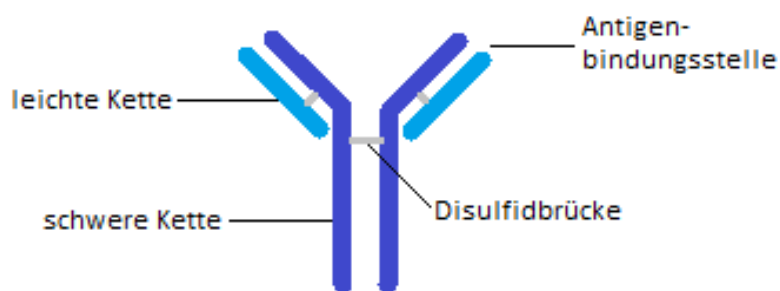
antigenunabhängige Differenzierung und Reifung zu T-Lymphozyten erfolgt dabei im Thymus, einem primären lymphatischen Organ (Suerbaum et al., 2016). B-Lymphozyten reifen im Knochenmark heran. Nach ihrer vollständigen Entwicklung zirkulieren beide Arten als reife, naive Lymphozyten im Blut und in der Lymphflüssigkeit zu den sekundären lymphatischen Organen wie Lymphknoten, Milz und mukosalen lymphatischen Geweben des Darms und anderen Schleimhäuten. Voraussetzung für die breite Antigenrezeptorspezifität der Lymphozyten ist ein Mechanismus während der Zellreifung, der Millionen von verschiedenen Varianten der Gene entstehen lässt, welche die Rezeptormoleküle codieren (Waldmann, 1987). Nachdem ein Antigen durch einen Lymphozyten, der den entsprechenden Rezeptor hat, erkannt wurde, wird die Zelle zur Teilung stimuliert und produziert somit Klone mit identischen Rezeptoren. Dieser Vorgang ist als klonale Expansion bekannt. Die Erkennung von Antigenen und die darauffolgenden Reaktionen unterscheiden sich aber grundlegend zwischen den zwei Arten von Lymphozyten (Murphy et al., 2009).

1.1.2.1 Antikörper

Die Antigenerkennung bei B-Lymphozyten erfolgt über hoch variable Moleküle, den Immunglobulinen (kurz Ig), die als membrangebundene B-Zell-Rezeptoren auf der Zelloberfläche lokalisiert sind. Nach deren Stimulation differenzieren sich B-Lymphozyten zu Plasmazellen und können jene Antigenerkennungsmoleküle auch als Antikörper sezernieren (Flint, 2009). Diese werden in fünf Antikörperklassen unterschieden: IgG, IgM, IgA, IgD und IgE. Das Grundmodell eines jeden Immunglobulins lässt sich als Ypsilon beschreiben und besteht aus zwei leichten und zwei schweren Ketten, die über Disulfidbrücken zusammengehalten werden (siehe hierzu Abbildung 1). Die Antigenbindungsstellen eines Antiköpers werden als variable Region bezeichnet. Der Teil eines Krankheitserregers, der von einem Antiköper erkannt wird, wird auch Epitop genannt (Edelman, 1991). Das Immunglobulin G ist der häufigste Antikörper und ist plazentagängig. Er spielt als Antikörper bei der sekundären Immunantwort eine wichtige Rolle. IgM wird bei der primären Immunantwort vermehrt gebildet und kann somit als Hinweis auf eine Erstinfektion dienen. Die Antikörper der IgA-Klasse werden auf Schleimhäuten der Atemwege, Augen und des Magen-Darm-Trakts sezerniert. Außerdem befinden sie sich in der Muttermilch und können einen ersten Infektionsschutz auf Säuglinge übertragen. Die Hauptaufgabe der IgD-Moleküle ist die Antigenerkennung auf B-Lymphozyten, die

sich dadurch zu Plasmazellen differenzieren. Die meisten Ig-E-Antikörper sind an Basophile und Eosinophile Granulozyten zellgebunden und übernehmen so die Funktion von Antigenrezeptoren. Durch ihre Stimulation werden anaphylaktische Reaktionen ausgelöst und ist auch für Allergien des Soforttyps verantwortlich (Ward & Ghetie, 1995).

Abbildung 1: Schematischer Aufbau eines Antikörpers.



1.1.2.2 Antikörperantwort

Bindet nun ein Antikörper an ein Antigen, entsteht ein Antigen-Antikörper-Komplex der über nichtkovalente Bindungen gekoppelt ist. Dadurch können zum Beispiel Antigene von Toxinen und Viren neutralisiert werden. Bei bestimmten Antigenen führt diese Komplexbildung zur Verklumpung, auch Agglutination genannt. Außerdem dienen Antikörper zur Opsonisierung von Krankheitserregern, die daraufhin von Makrophagen und neutrophilen Granulozyten phagozytiert werden können. Oftmals kommt es durch die Komplexbildung auch zur Aktivierung des Komplementsystems (siehe 1.1.3). Der Verlauf der Antikörperantwort ist in Primärantwort und Sekundärantwort aufgeteilt. Da das adaptive Immunsystem, im Gegensatz zu der angeborenen Immunantwort verzögert reagiert, ist etwa erst nach acht Tagen ein Plateau in der Messkurve der Antikörperkonzentration im Blut zu registrieren. Bei dem Großteil der gemessenen Antikörper handelt es sich um IgM-Moleküle, die spezifisch gegen das eingedrungene Antigen gerichtet sind. Kommt es nach einer gewissen Zeit zu einer erneuten Infektion mit Erregern dieses Antigens, ist die Reaktionszeit der Sekundärantwort deutlich kürzer und die Reaktion selbst fällt stärker aus. Hierbei befinden sich in der gemessenen Antikörperkonzentration hauptsächlich Antikörper der IgG-Klasse. Diese schnelle Sekundärantwort ist den sogenannten Gedächtniszellen zu verdanken, die sich nach einer Primärantwort auf

ein bestimmtes Antigen bilden. Auf diesem Prinzip beruht das Impfverfahren gegen Krankheitserregern (Murphy et al., 2009).

1.1.2.3 Antigenerkennung durch T-Zellen

Obwohl die B-Zell-Rezeptoren und die T-Zell-Rezeptoren evolutionär gesehen verwandt sind, unterscheiden sie sich grundlegend in ihrer Funktion. T-Zellen sind nicht in der Lage Antigene direkt zu erkennen. Die fremden Peptide werden von den T-Zell-Rezeptoren nur erkannt, wenn sie auf der Zelloberfläche von anderen Zellen präsentiert werden. Dabei müssen sie an ein ganz bestimmtes Zelloberflächenprotein gebunden sein, dem MHC-Molekül. Zusätzlich zum Antigenstimulus brauchen Lymphozyten costimulierende Moleküle, die zu einer Aktivierung führen. Diese können für T-Zellen von dendritischen Zellen, Makrophagen und B-Lymphozyten exprimiert werden (Schlienger, Craighead, Lee, Levine, & June, 2000). Anschließend kommt es zu einer klonalen Expansion der stimulierten T-Zelle, deren Klone sich zu T-Effektorzellen differenzieren (Murphy et al., 2009). Im Gegensatz zu den B-Lymphozyten können T-Lymphozyten pathogene Peptide erkennen, die sich im Inneren der körpereigenen Zellen befinden. Dies ist durch die bereits genannten MHC-Moleküle möglich. Diese lassen sich in MHC-Klasse-I-Moleküle und MHC-Klasse-II-Moleküle unterteilen. Dabei transportieren MHC-Moleküle der Klasse I körperfremde Peptide aus dem Zytosol an die Zelloberfläche und stimulieren dadurch CD8-T-Zellen. MHC-Klasse-II-Moleküle binden Proteinstrukturen, die z.B. durch Endozytose in Vesikeln aufgenommen und abgebaut wurden. Anschließend werden auf der Zelloberfläche CD4-T-Zellen stimuliert (Germain, 1994). T-Lymphozyten sezernieren als Immunantwort keine Antikörper. Stimulierte CD8-T-Zellen differenzieren sich zu zytotoxischen CD8-T-Effektorzellen und töten die präsentierende Zelle ab (Murphy et al., 2009). CD4-T-Zellen differenzieren sich je nach Stimulus in mehrere Subpopulationen von T-Helferzellen und in regulatorische T-Zellen. Sie haben zwar keine zytotoxische Aufgabe, stimulieren jedoch wiederum durch verschiedene Zytokine Makrophagen und B-Lymphozyten (Abbas et al., 2005).

1.1.3 Autoimmunerkrankungen

Eine grundlegende Aufgabe des Immunsystems ist es, körpereigene Strukturen wie etwa Proteine und Peptide von körperfremden zu unterscheiden. Hierbei spricht man

von der Selbst-Toleranz. Um zu gewährleisten, dass Lymphozyten durch körpereigene Antigene nicht stimuliert werden, hat unser Abwehrsystem mehrere Mechanismen entwickelt. Bereits in der Reifephase im Knochenmark und im Thymus werden autoreaktive Lymphozyten durch die sogenannte zentrale Toleranz inaktiviert. Zusätzlich kann über die periphere Toleranz eine Autoimmunreaktion unterbunden werden. Bindet ein körpereigenes Antigen an einen Lymphozyten, so braucht es stets ein costimulierendes Signal, um eine Immunantwort auszulösen. Ohne diese costimulierenden Moleküle bleiben weitere Reaktionen aus (Steinman, 1995). Das Immunsystem besitzt durchaus noch weitere Möglichkeiten eine Autoimmunantwort zu verhindern bzw. einzudämmen. Ist jedoch einer dieser Mechanismen fehlerhaft, kann eine Abwehrreaktion gegen körpereigene Zellen herbeigeführt werden. Die Ursache für die fehlende Selbst-Toleranz geht bisher aus mehreren Faktoren hervor. So liegen oft genetische Defekte vor, aber auch Umweltfaktoren wie Toxine, Medikamente, Drogen und Infektionen haben einen Einfluss (Murphy et al., 2009). Gewisse pathogene Erreger besitzen molekulare Strukturen, die körpereigenen ähneln. Kommt es nach einer Infektion zu einer Antikörperbildung, ist es möglich, dass jene Antikörper mit den körpereigenen Proteinen kreuzreagieren. Man spricht hier von einer molekularen Mimikry (Davies, 1997).

1.2 Schizophrenie

In der historischen Beschreibung war das Krankheitsbild der Schizophrenie seit langem bekannt. Jedoch erst Emil Kraepelin klassifizierte die unterschiedlichen Symptome anhand ihrer Konstellation und des Verlaufs als eine Krankheitsentität und formulierte im 19. Jahrhundert das Konzept der *Dementia praecox* (vorzeitige Verblödung). Nachdem Eugen Bleuler diese Bezeichnung kritisierte und dessen Definition für zu ungenau betrachtete, prägte dieser 1911 den Begriff Schizophrenie. Er definierte die Krankheit über die vier zueinander verschiedenartigen Grundsymptome Affektstörung, Assoziationsstörung, Ambivalenz und Autismus und erschuf aufgrund dieser gegensätzlichen Anzeichen aus den zwei altgriechischen Wörtern $\sigma\chi\acute{\iota}\zeta\epsilon\iota\nu$ / *s'chizein* = spalten und $\phi\rho\acute{\eta}\nu$ / *phrēn* = Geist den Begriff Schizophrenie (Kyziridis, 2005).

1.2.1 Epidemiologie

Das Lebenszeitrisko an einer Schizophrenie zu erkranken liegt über Länder- und Kulturgrenzen hinweg bei etwa 0,6 - 1 % (Hafner 1993). Für Männer ist der Gipfel des Manifestationsalters zwischen 15 und 24 Jahren anzusetzen, wobei sie in der Regel fünf Jahre früher als Frauen erkranken (mit 15 – 29 Jahren). Bei 90 % der Männer tritt die Ersterkrankung vor dem 30. Lebensjahr auf, bei Frauen jedoch nur bei zwei Drittel der Betroffenen. Hier lässt sich zwischen 45 und 49 Jahren in der Menopause ein zweiter, niedrigerer Erstmanifestationsgipfel feststellen (Hafner, 2015).

1.2.2 Symptomatik und Diagnose

Schizophrene Patienten weisen eine Vielzahl von heterogenen Symptomen auf. Um diese einordnen zu können, hat man im Laufe der Zeit unterschiedliche Konzepte entwickelt (H.-J. Möller, 2011). Wie bereits erwähnt, unterteilte E. Bleuler vier „Grundsymptome“ und stellte diesen die akzessorischen Symptome gegenüber. Des Weiteren entwickelte er gleichzeitig eine Einteilung in primäre und sekundäre Symptomatik (Maatz, Hoff, & Angst, 2015). Kurt Schneider entwickelte eine Unterteilung für Symptome ersten und zweiten Ranges. Den Symptomen ersten Ranges, wie zum Beispiel Gedankenlautwerden oder Hören von dialogischen oder kommentierenden Stimmen, kommen hier bei der Diagnosestellung eine höhere Bedeutung zu (Schneider, 1946). Die folgende Tabelle 1 verschafft einen Überblick der Unterteilung nach E. Bleuler.

Tabelle 1: Unterteilung schizophrener Symptomatik nach E. Bleuler (Möller 2011).

Symptome	Äußerungen
Grundsymptome	Denkzerfahrenheit (Assoziationsstörung) Parathymie (Affektstörung) Ambivalenz Störung des subjektiven Erlebens des eigenen Ichs (Depersonalisation)
Akzessorische Symptome	Halluzinationen Wahn Katatone Symptomatik Störungen der Schrift und der Sprache
Primäre Symptome	Lockerung der Assoziationen Disposition zu Halluzinationen Katatone Anfälle Tremor
Sekundäre Symptome	Verschiebung Verdichtung Affektstörung Störungen des Gedächtnisses Unberechenbarkeit Wahnideen Halluzinationen Stereotypien, Negativismus

Für die heutige Unterscheidung der Symptome von schizophrenen Psychosen hat sich die Differenzierung in Positivsymptomatik und Negativsymptomatik als bedeutsam erwiesen (H.-J. Möller, 2011). Positivsymptome (Plussymptome) beschreiben eine Übersteigerung, Negativsymptome (Minussymptome) eine Einschränkung in der Wahrnehmung von erlebten Situationen (Andreasen et al., 1994). Eine ausführlich Beschreibung und Unterteilung der Symptome gibt Tabelle 2.

Tabelle 2: Positiv- und Negativsymptomatik (Möller 2011).

Positivsymptomatik	Negativsymptomatik
Halluzinationen	Alogie (Sprachverarmung)
Wahnphänomene	Affektverarmung
(positive) formale Denkstörungen	Apathie
bizarres oder desorganisiertes Verhalten	Anhedonie
	Aufmerksamkeitsstörungen

Die oben aufgeführten Positivsymptome bilden das Auftreten von üblicherweise nicht vorhandenen psychischen Phänomenen ab, wie zum Beispiel Halluzinationen. Negativsymptome hingegen definieren sich darüber, dass gewöhnliche psychische Fähigkeiten, wie etwa Empathie, reduziert sind (H.-J. Möller, Laux, & Deister, 2015). Zur Klassifikation dieser unterschiedlichen Symptome stehen zwei Klassifikationssysteme zur Verfügung, ICD-10 (*International Classification of Diseases*, 10. Auflage der Weltgesundheitsorganisation) und DSM-IV (*Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*, 4. Auflage der American Psychiatric Association). Im deutschen Sprachraum wird die Klassifikation nach ICD-10 angewandt, die sich wie folgt aufteilt (Tabelle 3).

Tabelle 3: ICD-10 Klassifikation für Schizophrenie (Dilling, 2005).

Schizophrenie (F20)
<ul style="list-style-type: none">• Paranoide Schizophrenie (F20.0)• Hebephrene Schizophrenie (F20.1)• Katatone Schizophrenie (F20.2)• Undifferenzierte Schizophrenie (F20.3)• Postschizophrene Depression (F20.4)• Schizophrenes Residuum (F20.5)• Schizophrenia simplex (F20.6)• Sonstige Schizophrenie (F20.8)

Voraussetzung für die Diagnose nach diesem System ist das Vorliegen von mindestens einem der nachfolgenden Symptome

- Gedankenlautwerden, -eingung oder Gedankenentzug, -ausbreitung
- Kontroll-, Beeinflussungswahn, Gefühl des Gemachten, Wahnwahrnehmung
- Kommentierende oder dialogisierende Stimmen oder andere Stimmen, die aus bestimmten Körperteilen kommen
- Anhaltender kulturell unangemessener Wahn

beziehungsweise von mindesten zwei Symptomen aus folgender Aufzählung

- Anhaltende Halluzinationen jeder Sinnesmodalität, begleitet von flüchtigen Wahngedanken oder von lang anhaltenden überwertigen Ideen
- Gedankenabreißen oder Einschreibungen in den Gedankenfluss, was zu Zerfahrenheit, Neologismen oder Danebenreden führt
- Katatone Symptome wie Erregung, Haltungstereotypien oder wächserne Biagsamkeit, Negativismus, Mutismus und Stupor
- Negative Symptome wie auffällige Apathie, Sprachverarmung, verflachte oder inadäquate Affekte.

Die Symptome müssen innerhalb mindestens eines Monates überwiegend auftreten (Dilling, 2005). Andere wahnhafte Störungen sind unter den ICD-10-Codes F22 – F25 kategorisiert und werden somit unterschieden. Des Weiteren müssen affektive Psychosen wie Depressionen oder bipolare Störungen differentialdiagnostisch ausgeschlossen werden. Organische Psychosen, neurologische Erkrankungen, Autismus, Persönlichkeitsstörungen und pharmakologisch ausgelöste Psychosen müssen bei einer Diagnosestellung ebenso in Betracht gezogen werden (H.-J. Möller, 2011).

1.2.3 Ätiologie

Heutzutage geht man von einer multifaktoriellen Ursache aus, die die Krankheit Schizophrenie begründet. Es sind sowohl genetische als auch nichtgenetische Faktoren beteiligt. Der genetische Zusammenhang spielt dabei eine bedeutende Rolle wie aus zahlreichen Familien-, Adoptions- und Zwillingsstudien hervorgeht

(Sullivan, Kendler, & Neale, 2003). Das Erkrankungsrisiko für Schizophrenie innerhalb Familien mit psychiatrischen Vorerkrankungen liegt höher als für Familien ohne Vorbelastung (Agerbo et al., 2015). Inzwischen konnten 108 Genloci identifiziert werden, die das Risiko einer schizophrenen Erkrankung erhöhen (Schizophrenia Working Group of the Psychiatric Genomics, 2014). Des Weiteren geht man davon aus, dass gewisse Umweltfaktoren einen Einfluss auf das Erkrankungsrisiko nehmen können. Hierzu gibt es Studien bezüglich Geburten in Wintermonaten, Geburtskomplikationen, neonatale Vitamin D Level, Cannabiskonsum und pränatale Infektionen (Influenza, Toxoplasmose, Herpes simplex Virus) (van Os, Kenis, & Rutten, 2010). Weitere Hypothesen für die Ätiologie der Schizophrenie sind in Abschnitt 1.3 unter Psychoneuroimmunologie zusammengefasst.

1.2.4 Therapie

Die medikamentöse Therapie bei Schizophrenie besteht aus Neuroleptika, auch Antipsychotika genannt. Nach der Entdeckung des ersten dieser Art namens Chlorpromazin im Jahr 1952, war es möglich zusammen mit psychosozialen Therapiemaßnahmen deutliche Erfolge zu erzielen (H.-J. Möller, 2011). Der Hauptwirkmechanismus dieser Medikamente beruht auf der Blockade von postsynaptischen Dopamin- D_2 -Rezeptoren (siehe hierfür 1.3). Die Neuroleptika beeinflussen in erster Linie die Positivsymptomatik. Zusätzlich werden weitere Neurotransmitterrezeptoren in unterschiedlicher Intensität blockiert, wie die noradrenergen α_1 - und α_2 -Rezeptoren, serotonergen $5-HT_2$ -Rezeptoren, Histamin- H_1 -Rezeptoren und die muskarinischen Azetylcholinrezeptoren (Pape, Klinker, & Brenner, 2014). Antipsychotika werden in typische Neuroleptika (1. Generation, *first generation antipsychotics*, kurz FGAs) und atypische Neuroleptika (2. Generation, *second generation antipsychotics*, kurz SGAs) unterteilt (H.-J. Möller, 2011). Die neueren atypischen Neuroleptika können zusätzlich eine Verbesserung hinsichtlich der Negativsymptomatik erzielen (Leucht et al., 2009; H. J. Möller, 2003). Als weiterer Therapieansatz in Bezug auf die Negativsymptomatik bei schizophrenen Patienten werden auch Antidepressiva (v.a. bei Depressionen) (H.-J. Möller, 2011) und Glutamatrezeptoragonisten verabreicht (Tuominen, Tiihonen, & Wahlbeck, 2005). Für Patienten, die auf die medikamentöse Therapie nicht ansprechen, kann die Elektrokrampftherapie in Erwägung gezogen werden (Stein et al., 2004). Im

nachfolgendem Abschnitt 1.3 werden Therapieansätze mit Medikamenten, die das Immunsystem beeinflussen, erläutert.

1.3 Neurobiologische Schizophreniekonzepte

Unter neurobiologischen Schizophreniekonzepten versteht man Theorien, die auf biologischen Befunden beruhen, zum Beispiel aus den Forschungsgebieten Genetik, Neurochemie, Neuroimmunologie und Morphologie. Hier hat der Neurotransmitter Dopamin einen hohen Stellenwert. Die Dopaminhypothese geht davon aus, dass es einen funktionellen Zusammenhang zwischen dem Neurotransmitter Dopamin und akuten schizophrenen Psychosen gibt. Dopamin dient als Botenstoff in Synapsen von Nervenzellen. Der Neurotransmitter Dopamin wird von der präsynaptischen Zelle ausgeschüttet und auf der anderen Seite des synaptischen Spalts von den Membranrezeptoren der postsynaptischen Zelle gebunden. Dieser Vorgang wird als dopaminerge Neurotransmission bezeichnet (Pape et al., 2014). Unter der Annahme, dass eine dopaminerge Hyperaktivität im mesolimbischen System Positivsymptome einer Schizophrenie und eine dopaminerge Hypoaktivität im dorsolateralen präfrontalen Kortex Negativsymptome hervorrufen kann (Davis, Kahn, Ko, & Davidson, 1991), wurden weiterführende Studien durchgeführt. So konnten Versuche durch moderne Techniken, wie die *Single-Photon-Emissions-Computertomografie* (kurz SPECT) und die Positronen-Emissions-Tomographie (kurz PET) neue Erkenntnisse liefern und die These unterstützen (Abi-Dargham, 2004). Die Tatsache, dass die pharmakologische Wirkung von Antipsychotika auf der Blockade von postsynaptischen Dopamin- D_2 -Rezeptoren beruht, unterstützt die Dopaminhypothese zusätzlich (H.-J. Möller et al., 2015).

Neben der Dopaminhypothese sind Teilgebiete des Immunsystems ebenfalls wichtige Forschungsbereiche der Psychoneuroimmunologie. Untersuchungen berichteten über erhöhte Immunglobulinkonzentrationen von IgG, IgM und IgA (Rothermundt, Arolt, & Bayer, 2001) und erhöhte Expressionen monozytärer Zytokine, wie Interleukin-1 (kurz IL-1), Interleukin-6 (kurz IL-6) und TNF- α (Drexhage, van der Heul-Nieuwenhuijsen, et al., 2010). In einer vorangegangenen Studie wurden mittels Durchflusszytometrie Toll-like Rezeptoren auf Monozyten von 31 unbehandelten schizophrenen Patienten und 31 gesunden Kontrollpersonen verglichen. Hierbei hatten schizophrene Patienten höhere TLR-3- und TLR-4-

Expressionen, jedoch eine geringere Hochregulation der TLR-Expression nach Stimulation mit bakteriellem Lipopolysaccharid (Muller et al., 2012). Dies lässt eine Dysfunktion der TLR-Signalkaskade bei schizophrenen Patienten vermuten. Eine erhöhte Ausschüttung von Zytokinen wie Interferon- γ (kurz IFN- γ), TNF- α , IL-1 und IL-6 über den TLR-Signalweg steigert die Aktivität des Enzyms Indolamin-2,3-Dioxygenase (kurz IDO). Dieses Enzym baut die Aminosäure Tryptophan zu Kynurenin ab (Schrocksadel, Wirleitner, Winkler, & Fuchs, 2006). Tryptophan dient als Ausgangsprodukt für die Serotonin-Synthese. Eine erhöhte IDO-Aktivität führt schließlich zu einer geringeren Umwandlung von Tryptophan zu Serotonin. Ein Serotoninmangel ruft nachweislich depressive Symptome hervor (Merens, Booij, Haffmans, & van der Does, 2008). Außerdem führt die verstärkte Bildung von Kynureninen unter anderem zu einem Anstieg von Kynureninsäure. Diese ist der einzig bekannte endogene Antagonist des N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptors (kurz NMDA-Rezeptor) (Muller & Schwarz, 2008), was wiederum eine Inhibition der Glutamat- und Dopaminfreisetzung im synaptischen Spalt zur Folge hat und führt in der Regel zu neuropsychiatrischen Symptomen (Capuron & Miller, 2011). Zusätzlich wirkt Kynureninsäure als α -7 nikotischer Acetylcholinrezeptor-Antagonist (kurz α 7nACh-Rezeptor-Antagonist). Dadurch lassen sich kognitive Defizite bei schizophrenen Patienten erklären (Young & Geyer, 2013). Auf dieser Grundlage wurden bereits Therapiekonzepte entwickelt. Als möglicher Therapieansatz wird eine Behandlung mit spezifischen Cyclooxygenase-2-Inhibitoren gesehen, die die Produktion von Kynureninsäure verringern sollen (Muller, Myint, & Schwarz, 2011). So konnte in einer randomisierten, placebokontrollierten Doppelblindstudie mit 49 schizophrenen Patienten ein signifikant besseres Ergebnis für die Gruppe erzielt werden, die zur herkömmlichen Amisulpridbehandlung (atypisches Neuroleptikum) zusätzlich mit dem Cyclooxygenase-2-Hemmer Celecoxib behandelt wurden. Die andere Gruppe wurde ausschließlich mit Amisulprid therapiert (Muller et al., 2010). Eine weitere randomisierte, placebokontrollierte Doppelblindstudie mit 60 chronisch schizophrenen Patienten, berichtet ebenfalls über eine signifikant höhere Besserung in der Positivsymptomatik und in der Allgemeinpsychopathologie für die Gruppe, die zur üblichen Behandlung mit Risperidon (atypisches Neuroleptikum) adjuvant Celecoxib verabreicht bekommen hat (Akhondzadeh et al., 2007). Eine Auswertung mehrerer Studien aus dem Bereich der Psychoneuroimmunologie von Tourjman et al., 2013 zeigt einen signifikanten Abfall der Zytokine Interleukin-1 β

und Interferon- γ und einen Anstieg löslicher Interleukin-2-Rezeptoren nach Behandlung mit Neuroleptika bei schizophrenen Patienten. Diese Auswertung bekräftigt die Annahme eines immunmodulatorischen Einflusses auf die Ätiologie der Schizophrenie.

1.4 Zielsetzung

Ziel dieser explorativen Studie ist es, den Einfluss inflammatorischer Parameter auf die Symptomatik und Therapieresponse der Schizophrenie zu untersuchen. Eine vorangegangene Studie, die bei schizophrenen Patienten höhere TLR-3- und TLR-4-Expressionen, aber eine geringere Hochregulation nach Stimulation durch LPS ergab, lässt eine Dysfunktion des TLR-Systems vermuten. Die für die Toll-like Rezeptor Signalkaskade relevanten Proteine MyD88 (*myeloid differentiation primary response 88*), IRAK4 (*interleukin-1 receptor-associated kinase 4*), cFOS, TOLLIP (*toll interacting protein*) und TICAM1 (*toll like receptor adaptor molecule 1*) wurden daher in dieser Studie in den Mittelpunkt gestellt.

An der Studie nahmen neun schizophrene Patienten und neun gesunde Kontrollpersonen teil. Eine zuvor durchgeführte Untersuchung mittels Genchip für 84 Gene der TLR-Signalkaskade ergab signifikante Unterschiede im Gruppenvergleich zwischen schizophrenen Patienten und gesunden Kontrollpersonen für die Expression der bereits genannten Parameter. Den Teilnehmer der Patientengruppe wurde vor Medikationsbeginn und nach Therapieresponse Blut abgenommen. Um eine Auswirkung einer medikamentösen Therapie bei Schizophrenie in Bezug auf die TLR-Signalkaskade untersuchen zu können, durften die Patienten vor der ersten Blutentnahme für mindestens sechs Wochen keine psychotropen oder entzündungshemmenden Medikamente eingenommen haben. Die Proteinkonzentrationen für MyD88, IRAK4, cFOS, TOLLIP und TICAM1 wurden für beide Gruppen mittels ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) bestimmt, die mRNA-Expression für TOLLIP und IRAK4 mittels quantitativer Echtzeit-PCR (*polymerase chain reaction*). Anschließend wurde ein Teil der Blutproben mit Lipopolysaccharide stimuliert, der andere mit poly(I:C), was eine bakterielle bzw. virale Infektion in vitro nachahmt. Die Proben wurden jeweils erneut über das ELISA-Verfahren und Echtzeit-PCR auf die visierten Proteine hin getestet. Der Gruppenvergleich für die jeweilige Stimulierbarkeit soll Unterschiede in der

hypothetischen Dysfunktion der Regulation der TLR-Signalkaskade bei Stimulation untersuchen. Zur Beurteilung der medikamentösen Auswirkung auf die TLR-Signalkaskade nach Stimulation wurden die Proben der Patientengruppe auf Unterschiede in der Stimulierbarkeit zum Zeitpunkt „Baseline“ (unmediziert) und Zeitpunkt Follow-up (Medikation durch Neuroleptika) hin untersucht. Der Vergleich schizophrener Patienten mit einer geschlechts- und altersangepassten gesunden Kontrollgruppe soll eine möglichst realistische Einschätzung der untersuchten Parameter erlauben. Die Betrachtung mehrere Proteine, die die TLR-Signalkaskade betreffen, soll einen Überblick über mögliche immunologische Defizite bei Schizophrenie ergeben.

2 Material und Methoden

2.1 Studienkollektiv und Studiendesign

An der Studie nahmen neun schizophrene Patienten und neun gesunde Kontrollpersonen teil, die in einem Zeitraum von Juni 2014 bis November 2015 untersucht wurden. Alle schizophrenen Patienten wurden in der Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie der Ludwig-Maximilians-Universität München rekrutiert und dort stationär behandelt. Die gesunden Probanden hingegen wurden aus dem Familien- und Bekanntenkreis der Autorin ausgewählt. Die Studie wurde von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät am 28.05.2014 unter der Studiennummer 509-13 genehmigt. Vor Studienteilnahme wurden Patienten und Kontrollpersonen über die Studie und den Verlauf aufgeklärt und eine Einverständniserklärung der Teilnehmenden wurde eingeholt.

Die Einschlusskriterien für die Patientengruppe umfassten eine Diagnose nach ICD-10 für Schizophrenie und eine maximale Erkrankungsdauer von zwei Jahren. Zudem musste es sich bei den Patienten um Frauen und Männer im Alter zwischen 18 und 65 Jahren handeln. Weiterhin wurde vorausgesetzt, dass die Patienten seit mindestens sechs Wochen nicht gegen die Schizophrenie behandelt werden durften (keine Einnahme von Neuroleptika oder anderer Psychopharmaka). Als Ausschlusskriterium galt das Vorliegen einer neurologischen Erkrankung oder einer schweren, somatischen Erkrankung. Teilnehmer der Studie durften keine Medikamente einnehmen, die das Immunsystem beeinflussen könnten (Immunsuppressiva, Cortison, nichtsteroidale Antirheumatika). Die Kontrollgruppe wurde analog zur Geschlechts- und Altersverteilung (+/- 12 Monate) der Patientengruppe ausgewählt. Die Studienteilnehmer aus der Kontrollgruppe durften keine psychiatrischen, neurologischen oder somatischen Erkrankungen in der Anamnese aufweisen. Des Weiteren durfte keiner der Probanden innerhalb des letzten Monats vor Studienteilnahme an einem Infekt erkrankt sein. Bezüglich der Einnahme von Medikamenten galten für die Kontrollpersonen die gleichen Kriterien wie für die Patientengruppe.

Die Anamnese für beide Teilnehmergruppen wurde anhand eines Anamnesebogens durchgeführt (Anamnesebogen siehe Anhang). Die Fragen bezogen sich auf Symptome, Verlauf und Medikation von aktuellen und früheren Erkrankungen,

Allergien, Autoimmunerkrankungen sowie Suchtverhalten (Nikotin, Alkohol, Drogen) und soziale Strukturen.

Der Zeitpunkt der Follow-up-Untersuchung, die eine zweite Blutabnahme einschloss, wurde für jeden Patienten individuell bestimmt. Während des stationären Aufenthalts bestimmte man wöchentlich den Schweregrad der Schizophrenie über die *Positive and Negative Syndrome Scale* (kurz PANSS). Sobald eine Reduktion von mindestens 30% des Gesamtpunktwerts der PANSS erreicht wurde, nahm man den schizophrenen Patienten ein zweites Mal Blut ab (Follow-up-Untersuchung). Stellte sich während des stationären Aufenthalts keine 30%ige Reduktion der PANSS ein, wurde bei Entlassung die zweite Blutabnahme durchgeführt. Für die Kontrollpersonen wurde der Abstand zur zweiten Blutabnahme analog zum jeweiligen Patienten eingehalten.

2.2 Skalen

2.2.1 Clinical Global Impression Scale

Die *Clinical Global Impression Scale* (kurz CGI Scale) dient zur Einschätzung des klinischen Gesamteindrucks der seelischen Erkrankung eines Patienten. Die Bewertung wurde durch eine fachärztliche Konsensdiagnose im Rahmen des stationären Aufenthalts von Ärzten der Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie der Ludwig-Maximilians-Universität München durchgeführt und dient zur Beurteilung des Schweregrades der Erkrankung. Für die Studie wurde die CGI Scale zur Beurteilung des Schweregrades der Erkrankung zum Zeitpunkt der stationären Aufnahme und zur Entlassung durchgeführt. Die Bewertungsskala gliedert sich in acht Nummerncodes auf. Siehe dazu Tabelle 4.

Tabelle 4: Bewertungsskala CGI.

Code	Definition
0	Nicht beurteilbar
1	Patient ist überhaupt nicht krank
2	Patient ist Grenzfall psychiatrischer Erkrankung
3	Patient ist nur leicht krank
4	Patient ist nur mäßig krank
5	Patient ist deutlich krank
6	Patient ist schwer krank
7	Patient gehört zu den extrem schwer Kranken

2.2.2 Positive and Negative Syndrome Scale

Die *Positive and Negative Syndrome Scale* (kurz PANSS) erfasst den Schweregrad der schizophrenen Erkrankung von Erwachsenen. Zur Skalierung ist ein Interview mit den Patienten erforderlich. Die Skalierungen wurden von der Referentin, die zuvor ein Rater-Training absolviert hatte, durchgeführt. Dabei werden 30 Items anhand einer siebenstufigen Skala bewertet. Es sollen hierbei die Symptome der letzten Woche beurteilt werden, fremdanamnestische Informationen des Krankenhauspersonals oder von Familienmitgliedern können auch zur Gewichtung beitragen.

Die 30 Items sind wiederum in drei Subgruppen unterteilt. Die erste besteht aus sieben Items und umfasst produktive Symptome wie Größenwahn und Halluzinationen (Positivskala). Die darauffolgenden sieben Items befassen sich mit defizitären Symptomen wie Affektverflachung und passiv-soziale Isolation (Negativskala). Der dritte Teil beschäftigt sich mit der Allgemeinpsychopathologie und umfasst insgesamt 16 Items. Hier werden Symptome wie zum Beispiel Aufmerksamkeitsschwäche und Desorientiertheit betrachtet. Die Ausprägung eines jedes Symptoms kann von 1= nicht vorhanden bis 7 = extrem bewertet werden. Es können somit mindestens 30 Punkte und maximal 210 Punkte vergeben werden. Die Positiv- und Negativskala zählen jeweils mindestens 7 bis maximal 49 Punkte, die Skala für Allgemeinpsychopathologie 16 bis 112 Punkte. Ab einem

Gesamtpunktwerte von 60 handelt es sich um eine deutliche Symptomatik. Ein PANSS-Testbogen befindet sich als Beispiel im Anhang.

2.2.3 Cohen's Perceived Stress Scale

Die *Cohen's Perceived Stress Scale* (kurz PSS) dient zur Beurteilung des eigens wahrgenommenen Stressempfinden und hat keine diagnostische Gewichtung. Die PSS umfasst 14 Fragen, welche sich auf den vorangegangenen Monat beziehen. Der Teilnehmer schätzt sich dabei selbst ein, indem er aus fünf Antwortmöglichkeiten für jede Frage eine auswählt:

1. Nie
2. Fast nie
3. Manchmal
4. Häufig
5. Sehr häufig

Die Items behandeln Fragen zu Lebens- und Stresssituationen wie „im letzten Monat, wie häufig konnten Sie alltägliche Probleme und Ärgernisse erfolgreich bewältigen?“.

Bei der Auswertung der PSS bekommt jede Antwortmöglichkeit eine Bepunktung. Für die Items 1, 2, 3, 8, 11, 12 und 14 gilt:

Nie = 0

Fast nie = 1

Manchmal = 2

Häufig = 3

Sehr häufig = 4

Für die Items 4, 5, 6, 7, 9, 10 und 13 ist die Bewertung umgekehrt:

Nie = 4

Fast nie = 3

Manchmal = 2

Häufig = 1

Sehr häufig = 0

Die Summe aller Punkte beträgt mindesten 0 und maximal 56. Sowohl die Patientengruppe als auch die Kontrollgruppe führten die PSS für die Baseline-Untersuchung und für die Follow-up-Untersuchung durch. Ein PSS-Fragebogen ist als Beispiel im Anhang beigefügt.

2.3 Blutproben

Den schizophrenen Patienten und den gesunden Probanden wurde für die Baseline-Testreihe in der Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie der Ludwig-Maximilians-Universität München Blut abgenommen. Für die PBMC-Isolierung (*Peripheral Blood Mononuclear Cells*) wurden fünf EDTA-Röhrchen (7,5 ml), für die DNA ein EDTA-Röhrchen (2,7 ml) abgenommen. Für die Follow-up-Testreihe wurde von beiden Gruppen nochmals die gleiche Menge Blut abgenommen. Die Blutabnahmen erfolgten stets vormittags. Die Laboruntersuchungen zur Proteinkonzentration und mRNA-Expression wurden im Neurochemischen Forschungslabor der Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie der LMU München vorgenommen.

2.3.1 Isolierung humaner mononukleärer Zellen (PBMC)

Die Blutabnahme erfolgte mit EDTA vorgefüllten Röhrchen, wobei EDTA als Antikoagulans dient. Im Neurochemischen Forschungslabor wurden die Blutproben mit dem Zellkulturmedium RPMI-1640 1:2 verdünnt. Anschließend schichtete man das verdünnte Blut in 50 ml Falcons auf je 15 ml Ficoll-Paque. Das Ficoll-Paque enthält synthetische Polymere aus Saccharose und dient als Trennlösung bei der Dichtegradientenzentrifugation, ein physikalisches Trennverfahren. Durch 20-minütige Zentrifugation bei 800xg und Raumtemperatur bildeten sich zwei Phasen. Die untere enthielt Erythrozyten, Granulozyten und Ficoll und die obere Phase das Plasma. In der Interphase befinden sich die mononukleären Zellen. Diese konnten nun isoliert, mit RPMI-1640 auf 40 ml aufgefüllt und einmal bei 250xg gewaschen werden. Anschließend wurde die Zellzahl auf $5 \cdot 10^6$ Zellen/ml eingestellt und je 2ml in 6 Well-Mikrotiterplatten gegeben.

2.3.2 Stimulation

Ein Ziel dieser Studie war es, Auswirkungen von inflammatorischen Parametern bei schizophrenen Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden zu untersuchen. Daher wurde ein Teil der isolierten Lymphozyten gezielt stimuliert. Durch die Zugabe von Lipopolysaccharid (1µg/ml Endkonzentration) wurde eine bakterielle Infektion in vitro nachgeahmt, durch das Antigen poly(I:C) (5µg/ml) eine virale. Um eine Infektion unter physiologischen Bedingungen zu imitieren, wurden die Proben 24 Stunden bei 37°Celsius in einem Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde die Zellsuspension

für zwei Minuten bei 1000xg abzentrifugiert und der Überstand aliquotiert bei -80°Celsius gelagert. Das Zellpellet wurde einmal mit 1 ml phosphatgepufferter Salzlösung (kurz PBS) gewaschen und ebenfalls bis zur Weiterverarbeitung (RNA-Isolierung und Proteinextraktion) bei -80°Celsius aufbewahrt.

2.3.3 Zellaufschluss und Proteinisolierung

Um Proteine aus ihren Zellen zu isolieren, muss man einen Zellaufschluss, auch Homogenisierung genannt, vornehmen. Hierfür gibt es verschiedene Methoden, wie zum Beispiel ein osmotisches oder ein enzymatisches Lyseverfahren, aber auch ein mechanisches Aufschlussverfahren. Da die osmotischen und enzymatischen Verfahren nachfolgende Versuche ungewollt beeinflussen können, wurde eine mechanische Homogenisierung durchgeführt. Zunächst musste man dazu die Zellpellets mit 600µl phosphatgepufferten Salzlösung lösen. Nachdem die Lösung über Nacht bei -80°Celsius gelagert worden war, wurden die Proben für 10 Sekunden in einem Ultra-Turrax zerkleinert und im Anschluss zusätzlich mittels Ultraschall (Ultraschalltauchsonde) zehn Sekunden bearbeitet. Der mechanische Zellaufschluss musste zügig unter Kühlung in einem Eisbad vorgenommen werden, um der entstehenden Wärmeentwicklung entgegenzuwirken. Der Zellaufschluss wurde ohne Proteaseninhibitoren und ohne Einsatz von Reduktionsmittel durchgeführt, da diese den im Anschluss geplanten ELISA-Versuch verfälschen können.

Das Zelllysate wurde nun für fünf Minuten bei 5000xg zentrifugiert. Dabei werden Zellbestandteile voneinander getrennt. Zellorganellen wie Zellkerne, Zellmembrane und Mitochondrien sedimentieren, im Überstand verbleiben zytosolische Proteine. Der sich dabei gebildete Überstand (*total protein extract*) wurde bei -80°Celsius gelagert.

2.3.4 Bradford-Test

Um Referenzwerte für die weiteren Versuche zu erhalten, wurde der Bradford-Test durchgeführt. Dieser dient zur Quantifizierung der Gesamtproteinmenge in einer Lösung. Der Farbstoff Coomassie-Brillantblau G250 (Acid Blue 90) bildet in saurer Lösung mit den kationischen und den unpolaren Seitenketten der Proteine blaue Farbkomplexe. Diese Komplexe haben ein Absorptionsmaximum bei 595 nm, welches deutlich höher liegt als das des ungebundenen Farbstoffes. Somit kann mit hoher Empfindlichkeit die Proteinkonzentration in einer Lösung photometrisch

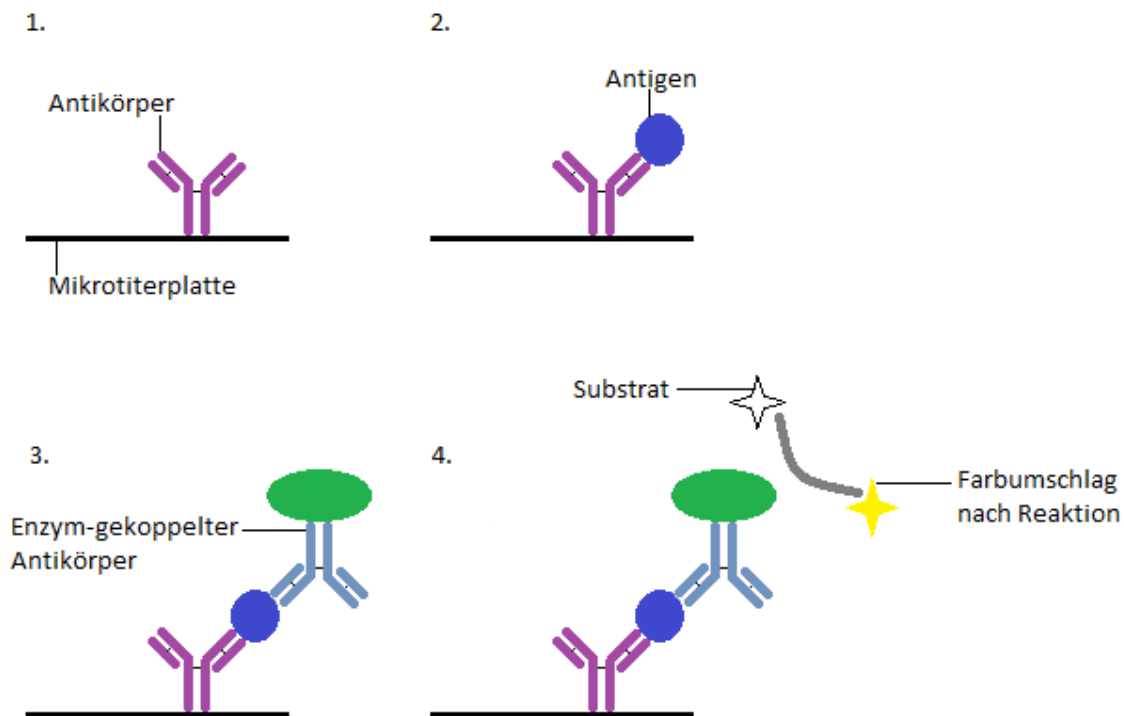
bestimmt werden. Im Labor wurden 5 µl total protein extract mit 250 µl Bradford-Reagenz gemischt und anschließende photometrisch gemessen (Bradford, 1976).

2.4 Proteinkonzentrationsbestimmung

2.4.1 ELISA

Zur Bestimmung der Proteinkonzentrationen der zu untersuchenden Parameter wurde das ELISA-Verfahren angewandt. Die Abkürzung steht für *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*. Dieses antikörperbasiertes Nachweisverfahren beruht auf einer enzymatischen Farbreaktion. Für die Untersuchung gibt es verschiedene ELISA-Verfahren, wie den Sandwich, den kompetitiven und den indirekten ELISA. In dieser Studie wurde das Sandwich-ELISA-Verfahren durchgeführt. Das nachzuweisende Protein nimmt hier die Rolle des Antigens ein. Die für dieses Protein spezifischen Antikörper befinden sich beschichtet auf einer festen Phase (Mikrotiterplatte). Nach Zugabe der Proben (Lösung mit den zuvor isolierten Proteinen) auf die Mikrotiterplatte bindet der spezifische Antikörper das zu untersuchende Protein. Nach einer gewissen Inkubationszeit wird die Platte gewaschen, um nicht gebundene Proteine zu entfernen. Anschließend wird ein zweiter spezifischer Antikörper, der mit einem Enzym gekoppelt ist, hinzugefügt. Dieser zweite Antikörper bindet an ein anderes Epitop des Antigens. So entsteht ein Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex. Nach einem weiteren Waschvorgang gibt man eine Farbentwicklungslösung (Chromogen) hinzu, welche durch das gekoppelte Enzym mittels Spaltung aktiviert werden kann. Die Enzymaktivität kann nun photometrisch bestimmt werden. Da diese proportional zur Menge der gebundenen Proteine ist, kann somit die Proteinkonzentration bestimmt werden.

Abbildung 2: Schematische Darstellung des ELISA-Sandwich-Verfahrens.



Die Abbildung 2 zeigt die einzelnen Vorgänge des ELISA-Versuchs:

1. Das erste Bild stellt einen spezifischen Antikörper dar, der fest an eine Mikrotiterplatte gebunden ist.
2. Das Antigen bindet an den Antikörper
3. Der Enzym-gekoppelten Antikörper bindet an ein anderes Epitop des Antigens
4. Nach Zugabe eines Substrats reagiert das Enzym mit diesem und die Lösung verfärbt sich.

2.4.1.1 Materialien und Geräte

Für jedes zu untersuchende Protein wurde ein spezifisches Kit verwendet. Man verbrauchte vier Kits der Firma CUSABIO and CusAb, Baltimore, USA.

1 x Human c-fos ELISA Kit

1 x Human interleukin-1 receptor-associated kinase 4 (IRAK-4) ELISA Kit

1 x Human myeloid differentiation factor 88 (MyD88) ELISA Kit

1 x Human Toll Interacting Protein (TOLLIP) ELISA Kit

Für das Nachweisverfahren von TICAM1 wurde 1 x ein ELISA Kit For Toll Like Receptor Adaptor Molecule 1 (TICAM1) der Firma Cloude-Clone Corpe, Houston,

USA verwendet. Der Inhalt der jeweiligen Kits ist in den Kit-Anwendungsprotokollen, welche im Anhang beigefügt sind, aufgelistet.

Der *ELISA-Reader POLARstar® Omega* und die dazugehörige Software *MARS Data Analysis Software V 2.0* stammen von der Firma BMG Labtech, Ortenberg, Deutschland

2.4.1.2 Versuchsdurchführung

Zunächst wurden die isolierten Proteine (*total protein extract*, hergestellt wie in 2.3.1 beschrieben) aufgetaut und auf Raumtemperatur gebracht. Alle Reagenzien und Standards wurden im Anschluss nach Herstellerangaben vorbereitet. In die Vertiefungen der Mikrotiterplatte wurden nun je 100 µl Probe (für jedes Protein in einer, im Vorfeld getesteten, assayspezifischen Verdünnung)

TICAM1 = 1:100

IRAK4 = 1:10

cFOS = 1: 2,5

TOLLIP = 1:5

MyD88 = 1:5

gegeben und für zwei Stunden bei 37°Celsius inkubiert. Daraufhin entfernte man die überstehende Flüssigkeit und fügte je 100 µl *Detection Reagent A* hinzu. Nach einer einstündigen Inkubationszeit bei 37° Celsius wurden die Mikrotiterplatten dreimal mit 200 µl *Wash Buffer* je Vertiefung gewaschen. Es folgte eine Zugabe von 100 µl *Detection Reagent B* mit anschließender Inkubation von einer Stunde bei 37°Celsius. Der zuvor beschriebene Waschvorgang wurde daraufhin sechsmal wiederholt. Im Anschluss gab man 90 µl *TMB Substrate* (Chromogen) in eine jede Vertiefung. Die Inkubationszeit betrug 15-30 Minuten. Der Vorgang musste vor Lichteinfall geschützt werden. Mit der Zugabe von 50 µl Stop Solution wurde die Reaktion beendet. Unmittelbar im Anschluss wurde mit einem Mikroplatten-Photometer die optische Dichte bei 450 nm Voreinstellung gemessen. Anhand der Standardkurve wurden die Werte in der Einheit pg/ml ermittelt. Für TICAM1 wählte man die Einheit ng/ml.

2.4.2 Versuchsansätze

Für den ELISA-Versuch gab es mehrere verschiedene Ansätze, die gemessen wurden. Bei den schizophrenen Patienten und gesunden Kontrollpersonen teilten sich die Versuchsansätze wie in Tabelle 5 auf:

Tabelle 5: Versuchsansätze der ELISA-Messungen.

Versuchsansatz Patienten (N=9)		Versuchsansatz Kontrollpersonen (N=9)	
Baseline, unbehandelt, unstimuliert	9x	Baseline, unbehandelt, unstimuliert	9x
Baseline, unbehandelt, LPS-Stimulation	9x	Baseline, unbehandelt, LPS-Stimulation	9x
Baseline, unbehandelt, PolyI:C-Stimulation	9x	Baseline, unbehandelt, PolyI:C-Stimulation	9x
Follow-up, behandelt, unstimuliert	9x	Follow-up, unbehandelt, unstimuliert	9x
Follow-up, behandelt, LPS-Stimulation	9x	Follow-up, unbehandelt, LPS-Stimulation	9x
Follow-up, behandelt, PolyI:C-Stimulation	9x	Follow-up, unbehandelt, PolyI:C-Stimulation	9x

Jeder Ansatz wurde auf 5 unterschiedliche Parameter getestet: cFos, MyD88, IRAK4, TOLLIP und TICAM1.

2.5 mRNA-Expressionsbestimmung

Die mRNA wird im Zellkern menschlicher Zellen von der RNA-Polymerase II transkribiert und ist im Zytoplasma für die Proteinbiosynthese (Translation) zuständig (Pape et al., 2014). In dieser Studie sollten nicht nur die Proteinkonzentrationen der zu untersuchenden Parametern gemessen werden, sondern auch die Expression deren mRNA. Somit kann die Expressionsanalyse die relativen Mengen an mRNA untersuchen, welche unter drei unterschiedlichen (unstimuliert, LPS-stimuliert, poly(I:C)-stimuliert) Bedingungen exprimiert werden. Veränderte Pegel einer spezifischen mRNA-Sequenz deuten auf eine Änderung im Bedarf des Proteins an, für welches diese mRNA codiert.

2.5.1 mRNA-Isolierung

Vor der Expressionsbestimmung muss die mRNA isoliert werden. Dazu wurde das RNeasy Mini Kit von Qiagen, Hilden, Deutschland verwendet. Hierbei werden die humanen mononukleären Zellen (PBMC, hergestellt wie in 2.3.1 beschrieben) durch einen Puffer, der das Salz Guanidinisothiocyanat enthält, lysiert, Proteine denaturiert und RNasen deaktiviert. Daraufhin gibt man die Lösung auf ein Säulensystem

(*RNeasy Mini Spin Columns*) mit einer Silica-Membran, an die Nukleinsäure bindet. Durch das Hinzufügen von Desoxyribonuklease wird die gebundene DNA hydrolytisch gespalten. Die ebenfalls gebundene RNA wird nach mehreren Waschvorgängen mit RNase-freiem Wasser eluiert. Im Labor wurde RLT-puffer zu den PBMC pipettiert. Im Anschluss wurde das Lysat mit 600 µl 70%igem Ethanol gemischt, auf die *RNeasy Mini Spin Columns* aufgetragen und 15 Sekunden bei $\geq 12000xg$ zentrifugiert. Das Eluat wurde verworfen und ein Waschschrift mit 350 µl RW1 Puffer vorgenommen. Die DNA wurde durch das Auftragen von 80 µl DNase-I-Lösung nach einer Inkubation von 15 Minuten verdaut. Die Probe musste anschließend einmal mit RW1 Puffer und zweimal mit RPE-Puffer gewaschen werden. Am Ende wurde die RNA mit 50 µl RNase-freiem Wasser eluiert.

2.5.2 Bestimmung der RNA-Quantität und der RNA-Qualität

Die Konzentrationsbestimmung der RNA wurde mittels photometrischer Messung durchgeführt. Die verdünnte RNA-Probe wurde in *UVetten*® gefüllt und ihre Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. Nach der Formel $\text{Konzentration } [\mu\text{g/ml}] = A_{260} \cdot 40 \cdot \text{Verdünnungsfaktor}$ lässt sich die Konzentration für RNA berechnen. Um die Reinheit (Qualität) der Probe zu bestimmen, wurde zusätzlich die Absorption bei einer Wellenlänge von 280 nm bestimmt. In diesem UV-Bereich haben Proteine und Phenole ihr Absorptionsmaximum und können somit detektiert werden. Aus dem Verhältnis der Absorption bei den Wellenlängen 260 nm zu 280 nm können klare Aussagen über die Qualität einer RNA-Probe gemacht werden. Eine RNA-Probe gilt bei einem Wert $A_{260}/A_{280} = 1,8-2,0$ als rein.

2.5.3 Quantitative Echtzeit-PCR

Das Akronym PCR steht für *Polymerase Chain Reaction* und ist ein Verfahren, um bestimmte Gen-Sequenzen zu vervielfältigen. Dies wird in vitro durch das Enzym DNA-Polymerase durchgeführt. Bei dem Real-Time PCR-Verfahren wird zusätzlich ein Fluoreszenzfarbstoff hinzugefügt, der bei der DNA-Amplifikation aktiviert wird. So kann in Echtzeit die Fluoreszenz gemessen werden, welche proportional mit der vervielfältigten Gen-Sequenz zunimmt. Die Quantifizierung erfolgt hierbei in der exponentiellen Phase der PCR.

2.5.3.1 Reverse Transkription

Für die Polymerase-Kettenreaktion muss zunächst die isolierte RNA in komplementäre DNA (kurz cDNA) umgeschrieben werden. Dies bewirkt man durch ein Enzym, genannt reverse Transkriptase, welche ein RNA-abhängige DNA-Polymerase ist. Der Vorgang wurde im Labor mit dem *High Capacity cDNA reverse transcription Kit* von Life Technologies, Carlsbad, USA durchgeführt. Zuerst musste der *RT Master Mix* unter Kühlung auf Eis vorbereitet werden. Dazu vermischte man 2 µl *RT Buffer*, 0,8 µl *dNTP Mix*, 2 µl *RT Random Primers*, 1 µl *MultiScribe™ Reverse Transcriptase*, 1 µl RNase Inhibitor und 3,2 µl Nuklease-freies Wasser. Anschließend wurden 10 µl dieser Lösung zu 10 µl RNA-Probe pipettiert und nach Vermischung auf Eis gelagert. Daraufhin wurde das Gemisch in einem Thermocycler in vier Zyklen inkubiert (siehe Tabelle 6).

Tabelle 6: Temperaturzyklen Reverse Transkription.

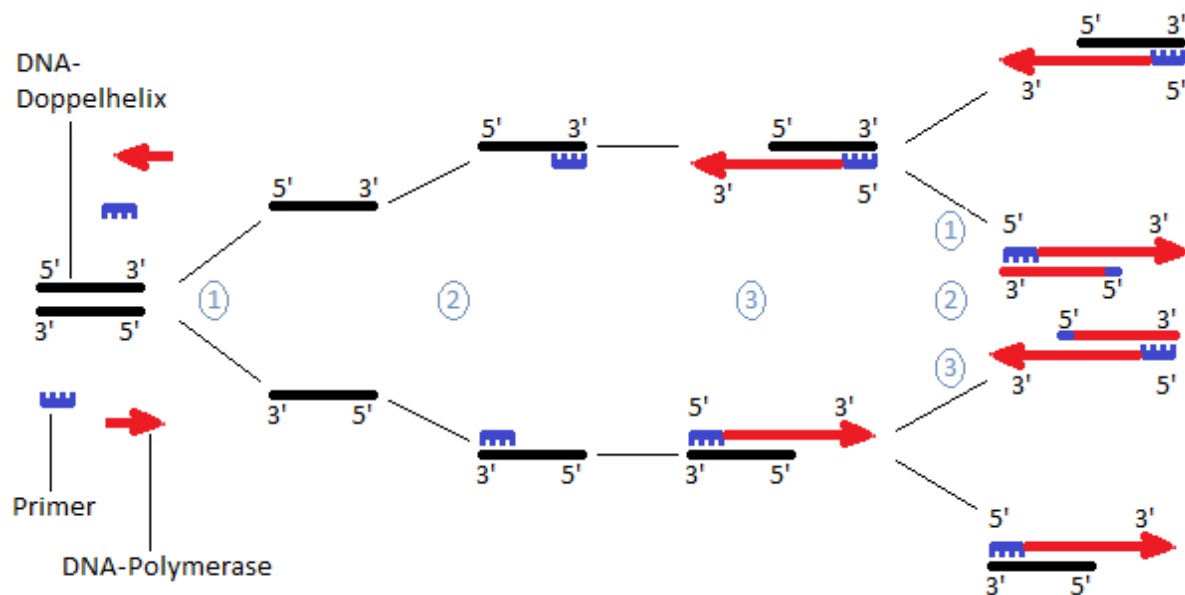
	Zyklus 1	Zyklus 2	Zyklus 3	Zyklus 4
Temperatur (°C)	25	37	85	4
Zeit	10 Minuten	120 Minuten	5 Minuten	∞

Die umgeschriebene cDNA wurde mit destilliertem Wasser auf 100 µl verdünnt.

2.5.3.2 Polymerase-Kettenreaktion

Das klassische PCR-Verfahren wird in einem Thermocycler durchgeführt. Ein PCR-Zyklus besteht aus drei Schritten. Als erster Schritt wird die vorliegende DNA bei 95°Celsius denaturiert. Hierbei werden die Wasserstoffbrücken der doppelsträngigen DNA gespalten. Im nächsten Schritt lagern sich bei 55 bis 65°Celsius sequenzspezifische Primer an die nun einzelsträngig vorliegende Nukleinsäure an. Die Primer binden jeweils an das 3'-Ende des DNA-Strangs. Dieser Vorgang wird Primerhybridisierung genannt. Daraufhin folgt die Elongation, bei der Polymerasen, von den Primern aus beginnend, den jeweils komplementären DNA-Strang synthetisieren. Der Primer verbleibt und bildet somit den 3'-Anfang des neu synthetisierten DNA-Strangs. Dieser letzte Schritt wird bei einer Temperatur von 68-72°Celsius durchgeführt. Der ganze Zyklus wird mehrmals wiederholt, bis die gewünschte Menge an amplifizierter DNA erreicht ist. Abbildung 3 veranschaulicht den beschriebenen PCR-Zyklus.

Abbildung 3: Schematische Darstellung der Polymerasenkettenreaktion.



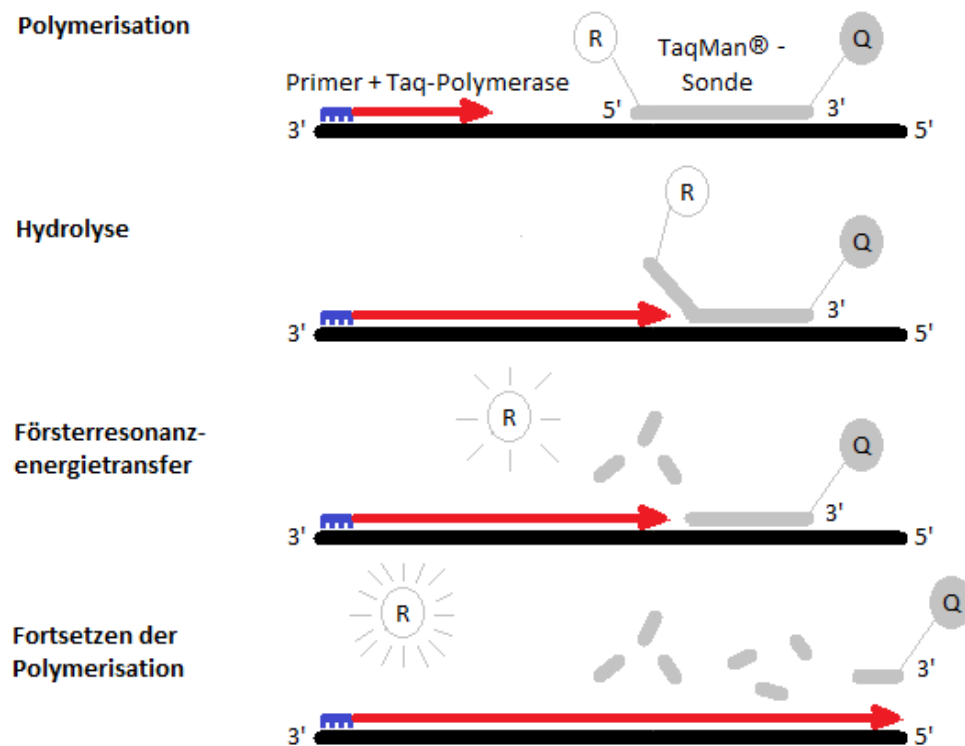
- ① Denaturierung
- ② Primerhybridisierung
- ③ Elongation

2.5.3.3 TaqMan®-Sonde

Um spezifische Gensequenzen quantifizieren zu können, wird die *Real Time Quantitative PCR* in einem *Real Time Cycler* mittels *TaqMan®-Assay* durchgeführt. Dieses Verfahren beruht auf einer Gensonde, bestehend aus einem Oligonukleotid, das an seinem 5'-Ende mit einem Reporter-Fluoreszenzfarbstoff und an seinem 3'-Ende mit einem Quencher-Farbstoff markiert ist. Zudem ist dieses Oligonukleotid für eine Ziel-DNA Sequenz-spezifisch und wird als *TaqMan®-Sonde* bezeichnet. Der Reporter-Fluoreszenzfarbstoff wird durch eine Lichtquelle angeregt und überträgt als Donor seine Energie auf einen Akzeptor, den Quencher-Farbstoff. Wird der Abstand zwischen Donor und Akzeptor vergrößert, verringert sich die Energieübertragung und das Fluoreszenzsignal des Akzeptors nimmt ab, das des Donors hingegen nimmt zu. Dieser Effekt ist als Försterresonanzenergietransfer (kurz FRET) bekannt. Die *TaqMan®-Sonde* bindet spezifisch an die Ziel-Gensequenz. Während der Elongation wird die an den Genstrang hybridisierte Sonde von der Taq-Polymerase, die zusätzlich eine 5'-Exonuklease-Aktivität besitzt, am 5'-Ende abgebaut (Hydrolyse). Der abgespaltene Reporter-Farbstoff entfernt sich somit von seinem Akzeptor

(Quenscher-Farbstoff) und das zuvor unterdrückte Fluoreszenzsignal verstärkt sich. Die Taq-Polymerase entfernt schließlich die ganze Sonde und fährt mit der Synthese des komplementären DNA-Strangs fort. Der *Real Time Cycler* misst die ansteigende Fluoreszenz und stellt sie graphisch dar. Die gemessene Fluoreszenz ist dabei proportional zur Menge der DNA-Sequenz. Die einzelnen Vorgänge sind in der folgenden Abbildung 4 dargestellt.

Abbildung 4: Schematische Darstellung der quantitativen Echtzeit-PCR mit TaqMan®-Sonde.



2.5.3.4 Materialien und Geräte

Bei dem verwendeten *Real Time Cycler* handelte es sich um das Gerät TM der Firma Roche, Basel, Schweiz mit der Software *StepOnePlus™ v2.3* der Firma Life Technologies, Carlsbad, USA.

Die Gensonden stammten aus dem *TaqMan® Gene Expression Assay Panel* der Firma Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA. Für menschliches IRAK4 lautete die Assay-Kennung Hs00211610_m1, für menschliches TOLLIP Hs01553188_m1. Als endogene Kontrolle diente das 18S rRNA Gen mit der Kennung Hs99999901_s1.

2.5.3.5 Versuchsdurchführung

Zunächst wurden die PCR *Reaction Plates* vorbereitet. Daraufhin wurden je Gen (*single Tube*) 7,5 µl 2x *TaqMan® Gene Expression Master Mix*, 0,75 µl 20x *TaqMan® Genexpression Assay*, 5 µl cDNA-Probe (1:5 verdünnt, siehe 2.6.3.1) und 1,75 µl RNase-freies Wasser pipettiert. Nach dem Vermischen der Reagenzien gab man pro Vertiefung der PCR *Reaction Plates* jene 15 µl Reaktionslösung und startete den *Real Time Cycler* mit den Temperaturzyklen aus Tabelle 7.

Tabelle 7: Temperaturzyklen quantitative Real-Time PCR.

	Zyklus 1	Zyklus 2	Zyklus 3	Zyklus 4
Temperatur (°C)	50	95	95	60
Zeit	2 Minuten	10 Minuten	15 Sekunden	1 Minute
Phase	Hold	Hold	PCR-Zyklus (40 Zyklen)	

Es wurden somit pro Versuch 40 Polymerase-Kettenreaktion-Zyklen durchgeführt.

2.5.4 Relative Quantifizierung

Durch die Normalisierung der Expression gegen ein nicht reguliertes, konstant exprimiertes *Housekeeping* Gen (Referenzgen = endogene Kontrolle) können Fehler bei der RNA-Isolierung, bei der Reversen Transkription und Störfaktoren, wie z.B. Gewebe- und Matrixeffekte, ausgeglichen werden, da sich diese sowohl auf das Zielgen als auch auf das Referenzgen beziehen (Rasmussen, 2001). Somit wird bei der relativen Quantifizierung für jede Probe der C_t -Wert (engl. *cycle threshold*) des Referenzgens vom C_t -Wert des zu untersuchenden Gens subtrahiert:

$$\Delta C_t = C_{t\text{Zielgen}} - C_{t\text{Referenzgen}}.$$

Zusätzlich wird die relative Expression des zu untersuchenden Gens jeder Probe auf ein Kontrollprobenmaterial (=Kalibrator) bezogen (entspricht in dieser Studie dem Versuchsansatz TLRK 1-1 unstimuliert). Dafür wird vom ΔC_t -Wert der untersuchten Probe der ΔC_t -Wert der Kontrollprobe abgezogen:

$$\Delta\Delta C_t = C_{t\text{Probe}} - C_{t\text{Kalibrator}}$$

Dabei spricht man von dem Delta-Delta- C_t -Wert. Um den Expressionsunterschied zwischen den beiden Gruppen zu berechnen, verwendet man die arithmetische Formel:

$$2^{-\Delta\Delta C_t}$$

Zusammengefasst handelt es sich hierbei um die Delta-Delta- C_t -Methode zur relativen Quantifizierung (Livak & Schmittgen, 2001). Abbildung 5 stellt die Formel nochmals dar.

Abbildung 5: Delta-Delta- C_t -Methode.

$\Delta C_t = C_{t\text{Zielgen}} - C_{t\text{Referenzgen}}$ $\Delta\Delta C_t = C_{t\text{Probe}} - C_{t\text{Kalibrator}}$ $\text{Ratio} = 2^{-\Delta\Delta C_t}$

Der C_t -Wert beschreibt dabei den Teil der Kurve, in dem die Fluoreszenz erstmals exponentiell über den Hintergrundwert ansteigt.

2.5.5 Versuchsansätze

Für den *Real Time* PCR-Versuch gab es verschiedene Versuchsansätze, die gemessen wurden. Bei den schizophrenen Patienten und den gesunden Kontrollpersonen ergaben sich die Versuchsansätze wie in Tabelle 8 aufgelistet.

Tabelle 8: Versuchsansätze der Real-Time PCR.

Versuchsansatz Patienten (N=9)		Versuchsansatz Kontrollpersonen (N=9)	
Baseline, unbehandelt, unstimuliert	9x	Baseline, unbehandelt, unstimuliert	9x
Baseline, unbehandelt, LPS-Stimulation	9x	Baseline, unbehandelt, LPS-Stimulation	9x
Baseline, unbehandelt, PolyI:C-Stimulation	9x	Baseline, unbehandelt, PolyI:C-Stimulation	9x
Follow-up, behandelt, unstimuliert	9x	Follow-up, unbehandelt, unstimuliert	9x
Follow-up, behandelt, LPS-Stimulation	9x	Follow-up, unbehandelt, LPS-Stimulation	9x
Follow-up, behandelt, PolyI:C-Stimulation	9x	Follow-up, unbehandelt, PolyI:C-Stimulation	9x

Jeder Ansatz wurde für das Protein IRAK4, das Protein TOLLIP und die endogene Kontrolle 18S getestet.

2.6 Statistik

Für die Auswertung der Daten wurde das Statistikprogramm SPSS 24.0 für Windows verwendet. Sowohl die serologischen Daten aus dem ELISA-Test als auch die Ergebnisse der mRNA-Expressionsbestimmung wurden anfangs deskriptiv betrachtet. Weiterführend wurden die Daten im Gruppenvergleich (Gruppe 1 = schizophrene Patienten, Gruppe 2 = gesunde Kontrollpersonen) auf signifikante Unterschiede untersucht. Als signifikant galt $p \leq 0,05$. Bei der deskriptiven Statistik metrischer Größen pro Gruppe wurden Minimalwert, Maximalwert, Mittelwert und Standardabweichung der betrachteten Variable ermittelt. Um die Variablen auf Normalverteilung zu testen, wurde der Kolmogorov-Smirnov-Test durchgeführt. Waren die Variablen normalverteilt, wurde ein t-Test für unabhängige Stichproben zum Gruppenvergleich der Mittelwerte durchgeführt. Bei dem Verfahren geht man von einer Nullhypothese aus. Hierbei nimmt man an, dass es keine Unterschiede zwischen den zu vergleichenden Gruppen gibt. Waren die Variablen nicht normalverteilt wurde der Kruskal-Wallis-Test durchgeführt. Hier wurde als weiterführender Test der Mann-Whitney-U-Test angewandt. Beide Tests gehören zu den nicht-parametrischen Verfahren. Der Mann-Whitney-U-Test vergleicht die den Werten zugeordneten Rangplätze. Da es sich um eine explorativ angelegte Studie handelte, wurde auf Korrekturen für multiples Testen verzichtet. Die Häufigkeitsverteilung des Nikotin-, Alkohol- und Drogenkonsums wurde über eine Kreuztabelle und den exakten Test nach Fisher ermittelt. Dieser wird bei einer geringen Fallzahl alternativ zum Chi-Quadrat-Test nach Pearson bzw. zum Likelihood-Quotienten verwendet. Für die Stimulationseffekte und Medikationseffekte wurden einfache lineare Regressionsanalysen durchgeführt. Sinn der einfachen Regression ist es, die Abhängigkeit einer Variablen von einer zweiten zu untersuchen. Das Modell setzt intervallskalierte, normalverteilte Variablen voraus.

3 Ergebnisse

3.1 Anamnese

Die Studie umfasste neun schizophrene Patienten, welche sowohl die Diagnosekriterien nach ICD-10 für Schizophrenie erfüllten als auch alle weiteren für diese Studie festgesetzten Einschlusskriterien. Die Gruppe der gesunden Kontrollpersonen zählte neun Teilnehmer, welche in Alter (+/- 12 Monate) und Geschlecht mit den jeweiligen Patienten übereinstimmten. Die Patientengruppe umfasste sechs männliche und drei weibliche Studienteilnehmer. Das Durchschnittsalter der Patienten lag bei 29 Jahren (19-49 Jahre, Standardabweichung 10,7). Die Gruppe der Kontrollpersonen umfasste auch sechs männliche und drei weibliche Probanden. Das Durchschnittsalter dieser Gruppe lag bei 29,7 Jahren (20-50 Jahre, Standardabweichung 10,9).

Tabelle 9: Durchschnittsalter von Patienten und Kontrollpersonen.

		Patienten (N=9)	Kontrollpersonen (N=9)
Geschlecht	Männlich	6	6
	Weiblich	3	3
Alter (Jahre)	Minimum	19	20
	Maximum	49	50
	Mittelwert	29	29,7
	Standardabweichung	10,7	10,9

Erkrankungsbeginn

Über den Anamnesebogen wurde auch der Beginn der ersten psychotischen Symptome der schizophrenen Patienten vor Initialbehandlung erfasst. Bei drei Patienten konnte der genaue Zeitpunkt nicht bestimmt werden. Die Zeitspanne bei den restlichen sechs Patienten lag zwischen zwei und zwölf Wochen. Der Mittelwert betrug dabei sechs Wochen (Standardabweichung 3,58, siehe Tabelle 10).

Tabelle 10: Statistik über Zeitspanne der Erstsymptomatik vor Initialbehandlung, N=6.

	Minimum	Maximum	Mittelwert	Standardabweichung
Zeitraum (Wochen)	2	12	6	3,58

Medikation

Zum Zeitpunkt der ersten Blutabnahme für die Baseline Untersuchung nahm keiner der Patienten psychiatrische Medikamente ein. Ein Patient nahm zum Zeitpunkt der Blutabnahmen Marcumar und Pantoprazol ein. Aus der Kontrollgruppe nahm niemand Medikamente während der Studienteilnahme ein. Alle neun Patienten wurden anschließend nach der Baseline-Untersuchung mit Medikamenten therapiert. Die folgende Tabelle 11 zeigt eine Auflistung der Medikation.

Tabelle 11: Häufigkeit der eingenommenen Medikation bei schizophrenen Patienten zur Follow-up-Untersuchung.

Medikation	Patienten [%] (N=9)
Neuroleptika	100
Benzodiazepine	66,7
Antidepressiva	22,2
Anticholinergika	11,1
Nicht psychiatrische Medikamente	55,6

Eine ausführliche Liste mit allen eingenommenen Medikamenten befindet sich im Anhang.

Infektanamnese

Unter den Teilnehmern der Studie gab es niemanden, der an einer systemischen infektiösen oder inflammatorischen Erkrankung innerhalb vier Wochen vor Studienteilnahme bzw. währenddessen litt.

Somatische Erkrankungen

Ein schizophrener Patient wurde wegen einer Herzoperation (Herzklappenersatz) dauerhaft mit Marcumar behandelt, eine Kontrolle berichtete über Herzrhythmusstörungen. Des Weiteren litt eine Person aus der Kontrollgruppe an Schilddrüsenunterfunktion. Ein Proband aus der Patientengruppe war an der

Autoimmunerkrankung Hashimoto-Thyreoiditis erkrankt, eine Kontrolle litt in der Jugend an Asthma bronchiale.

22% der schizophrenen Patienten und 33% der gesunden Probanden gaben an, an einer Atopie zu leiden.

Nikotin, Alkohol, Drogen

Alle Teilnehmer der Studie sind bezüglich ihres Nikotin-, Alkohol- und Drogenkonsums befragt worden. Hierfür mussten sowohl Patienten als auch Kontrollpersonen Angaben über bestehenden oder früheren Konsum und dessen Häufigkeit machen. Die einzelnen Antworten der Patientengruppe wurden mit denen der Kontrollgruppe durch den exakten Test nach Fisher (exakter Chi-Quadrat-Test) auf signifikante Abweichungen hin untersucht. Hierbei ergab sich beim Nikotinkonsum kein signifikanter Unterschied ($p=0,052$). Der Anteil der Kontrollgruppe, der noch nie geraucht hatte ist deutlich höher. Unter den Patienten gibt es mehr aktuelle und frühere Nikotinkonsumenten. Der Cannabiskonsum war ebenfalls in der Patientengruppe erhöht ($p=0,054$). Tabelle 12 gibt Aufschluss über das befragte Konsumverhalten von Nikotin, Alkohol und Drogen.

Tabelle 12: Exakter Test nach Fisher vergleicht die Häufigkeit des Nikotin-, Alkohol- und Drogenkonsums bei schizophrenen Patienten zu gesunden Probanden.

		Patienten [%] N=9	Kontrollen [%] N=9	p-Werte
Nikotin	Nie	22,2	77,8	,052
	Nein, früher	33,3	11,1	
	Aktuell	44,4	11,1	
Alkohol	Nie	11,1	11,1	,631
	Selten	44,4	22,2	
	Manchmal	33,3	33,3	
	Regelmäßig	11,1	33,3	
	Abusus	0	0	
Drogen	Nie	66,7	88,9	,054
	Nein, früher	33,3	11,1	
	Cannabis aktuell	0	0	

Familienanamnese

Unter den schizophrenen Patienten war die Familienanamnese für psychiatrische Erkrankungen bei 11% positiv. Bei den angegebenen Erkrankungen handelte es sich um Depressionen. Für autoimmune Erkrankungen in der Familie lag die Häufigkeit bei 22% (neurale Muskelatrophie, Neurodermitis). In der Kontrollgruppe fiel die Familienanamnese für psychiatrische und autoimmune Erkrankungen zu 100% negativ aus.

Tabelle 13: Häufigkeiten für psychiatrische und autoimmune Erkrankungen in der Familie von Patienten und Kontrollen im Vergleich.

		Patienten [%] N=9	Kontrollen [%] N=9
Familienanamnese Für psychiatrische Erkrankungen	Positiv	11	0
	Negativ	89	100
Familienanamnese für autoimmune Erkrankungen	Positiv	22	0
	Negativ	78	100

3.2 CGI Scale

Alle schizophrenen Patienten wurden hinsichtlich des Schweregrades ihrer Erkrankung mit Hilfe der *Clinical Global Impression Scale* durch fachärztliche Konsensdiagnose von Ärzten der Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie der Ludwig-Maximilians-Universität München bei stationärer Aufnahme und Entlassung eingeschätzt. Zur Baseline-Untersuchung lag die durchschnittliche Beurteilung bei 5,11, zur Follow-up-Untersuchung bei 3,44 (Bewertungsskala siehe 2.2.1).

Tabelle 14: Statistik des Schweregrads der Erkrankung in der Patientengruppe mit Hilfe der CGI Scale.

	Minimum	Maximum	Mittelwert	Standardabweichung
Baseline	4	6	5,11	,78
Follow-up	2	5	3,44	1,13

3.3 PANSS

Zur Einschätzung des Schweregrades und Verlauf der Erkrankung wurde bei allen schizophrenen Patienten die *Positive and Negative Syndrome Scale* von der Referentin durchgeführt. Da die Follow-up-Untersuchung von einer Verbesserung von mindestens 30% des Punktwerts der PANSS abhängig war, wurde diese mehrmals bei den einzelnen Patienten durchgeführt. In der Baseline-Untersuchung ergab sich ein Mittelwert von 85,89 Punkten (60-119 Punkte, Standardabweichung 17,38). Der Mittelwert der Gesamtskala der PANSS der Follow-up-Untersuchung erreichte 58,33 Punkte (48-76 Punkte, Standardabweichung 8,53). Die Positivsymptomatik (23,67) bei der Baseline-Untersuchung war im Durchschnitt höher als die Negativsymptomatik (19,11). Zur Follow-up-Untersuchung waren die Punktwerte für Positiv- (14,78) und Negativsymptomatik (14,22) nahezu gleich.

Tabelle 15: Statistik der PANSS der Patientengruppe zum Zeitpunkt der Baseline-Untersuchung und zur Follow-up-Untersuchung.

Baseline	Minimum	Maximum	Mittelwert	Standardabweichung
PANSS gesamt	60	119	85,89	17,38
Positivsymptomatik	17	36	23,67	5,61
Negativsymptomatik	11	28	19,11	5,40
Allgemeinpsychopathologie	32	59	43,11	10,08
Follow-up	Minimum	Maximum	Mittelwert	Standardabweichung
PANSS gesamt	48	76	58,33	8,53
Positivsymptomatik	12	18	14,78	2,05
Negativsymptomatik	9	21	14,22	4,21
Allgemeinpsychopathologie	25	38	29,44	4,45

Nach Therapiebeginn und bis zum Zeitpunkt der Follow-up-Untersuchung lag die durchschnittliche Verbesserungsrate bei 48,11%.

3.4 PSS

Die erreichten Punktwerte der *Perceived Stress Scale* zeigten im Gruppenvergleich, dass sowohl zur Baseline-Untersuchung als auch zur Follow-up-Untersuchung ein deutlicher signifikanter Unterschied vorlag (Baseline $p=0,000$, Follow-up= $0,000$). Der Mittelwert der schizophrenen Patienten sank um 16,65% von 27,33 auf 22,78 Punkte

nach Therapiebeginn. Bei den gesunden Probanden blieb der Mittelwert der *Perceived Stress Scale* annähernd gleich (Baseline 9,33, Follow-up 9,22).

Tabelle 16: Statistik der PSS zwischen Patienten und Kontrollen zum Zeitpunkt Baseline und Follow-up.

<u>PSS</u>							
	Gruppe	N	MW	SD	Min.	Max.	p-Werte
Baseline	Patientengruppe	9	27,33	5,41	23	39	,000*
	Kontrollgruppe	9	9,33	3,94	4	16	
Follow-up	Patientengruppe	9	22,78	6,61	12	32	,000*
	Kontrollgruppe	9	9,22	3,19	5	15	

N=Anzahl der Probanden, **MW**=Mittelwert, **SD**=Standardabweichung, **Min.**=Minimum, **Max.**=Maximum
p-Werte: T-Test ohne Korrektur für multiples Teste
 * = p<0,05

3.5 Gruppenvergleich ohne Stimulation

3.5.1 Proteinkonzentration

Die statistischen Auswertungen mittels t-Tests der Proteinkonzentrationen zwischen schizophrenen Patienten und gesunden Kontrollpersonen ergaben in der Baseline-Untersuchung der nicht stimulierten Proben keine signifikanten Unterschiede. In der folgenden Tabelle 17 sind Mittelwerte und Statistik zusammengefasst.

Tabelle 17: Statistik der Proteinkonzentrationen im Gruppenvergleich zwischen Patienten und Kontrollpersonen zum Zeitpunkt Baseline, unstimuliert.

<u>Baseline</u>							
	Gruppe	N	MW	SD	Min.	Max.	p-Werte
MyD88	Patientengruppe	9	3,52	2,50	,40	6,88	,627
	Kontrollgruppe	9	4,96	8,35	,70	26,97	
IRAK4	Patientengruppe	9	2531,80	2115,77	648,65	5818,46	,912
	Kontrollgruppe	9	2668,29	2974,62	412,45	10322,58	
TOLLIP	Patientengruppe	9	40,45	58,13	,00	151,63	,979
	Kontrollgruppe	9	39,80	45,25	,00	136,08	
TICAM1	Patientengruppe	9	119,60	100,63	22,63	285,36	,511
	Kontrollgruppe	9	88,05	98,35	1,10	331,50	
cFOS	Patientengruppe	9	144,29	101,01	,00	334,51	,516
	Kontrollgruppe	9	184,99	153,47	,00	449,24	

N = Anzahl der Probanden, **MW** = Mittelwert, **SD** = Standardabweichung, **Min.** = Minimum, **Max.** = Maximum
p-Werte: T-Test ohne Korrektur für multiples Testen

Die Follow-up-Untersuchung im unstimulierten Zustand ergab bei den getesteten Proteinkonzentrationen ebenfalls keine auffälligen Unterschiede zwischen der Patientengruppe und der Kontrollgruppe (siehe Tabelle 18). Da die Werte des Proteins MyD88 hier nicht normalverteilt waren, wurde der Gruppenvergleich mit dem Mann-Whitney-U-Test durchgeführt.

Tabelle 18: Statistik der Proteinkonzentrationen im Gruppenvergleich zwischen Patienten und Kontrollpersonen zum Zeitpunkt Follow-up, unstimuliert.

<u>Follow-up</u>	Gruppe	N	MW	SD	Min.	Max.	p-Werte
MyD88	Patientengruppe	9	10,51	20,92	1,40	66,11	,122 ¹
	Kontrollgruppe	9	8,10	18,23	,04	56,60	
IRAK4	Patientengruppe	9	1115,18	300,73	739,66	1697,01	,118
	Kontrollgruppe	9	1592,48	811,54	633,92	3524,80	
TOLLIP	Patientengruppe	9	38,25	52,95	,00	142,76	,118
	Kontrollgruppe	9	113,85	126,67	,00	318,19	
TICAM1	Patientengruppe	9	122,09	119,27	18,45	370,49	,396
	Kontrollgruppe	9	83,77	56,40	8,22	148,23	
cFOS	Patientengruppe	9	122,81	96,21	11,24	247,12	,197
	Kontrollgruppe	9	207,90	163,35	37,21	505,57	

N = Anzahl der Probanden, **MW** = Mittelwert, **SD** = Standardabweichung, **Min.** = Minimum, **Max.** = Maximum

p-Werte: T-Test ohne Korrektur für multiples Testen

¹ = Mann-Whitney-U-Test ohne Korrektur für multiples Testen

3.5.2 mRNA-Expression

Im Gruppenvergleich zwischen Patienten und Kontrollpersonen war zur Baseline-Untersuchung kein Unterschied in der mRNA-Expression zu erkennen, weder für IRAK4, noch für TOLLIP (siehe Tabelle 19).

Tabelle 19: Statistik der mRNA-Expression im Gruppenvergleich zwischen Patienten und Kontrollpersonen zum Zeitpunkt Baseline, unstimuliert.

<u>Baseline</u>	Gruppe	N	MW	SD	Min.	Max.	p-Werte
IRAK4	Patientengruppe	9	1,43	,77	,34	2,64	,930
	Kontrollgruppe	9	1,46	,64	,38	2,30	
TOLLIP	Patientengruppe	9	2,19	1,39	,30	4,00	,936
	Kontrollgruppe	9	2,13	1,56	,40	5,43	

N = Anzahl der Probanden, **MW** = Mittelwert, **SD** = Standardabweichung, **Min.** = Minimum, **Max.** = Maximum

p-Werte: T-Test ohne Korrektur für multiples Testen

In der Follow-up-Untersuchung zeigte sich, dass die mRNA-Expression beider Proteine der Patientengruppe niedriger war, als die der gesunden Probanden. Bei IRAK4 war die mRNA-Expression bei den schizophrenen Patienten signifikant niedriger. Einen Überblick der Statistik gibt nachfolgende Tabelle 20.

Tabelle 20: Statistik der mRNA-Expression im Gruppenvergleich zwischen Patienten und Kontrollpersonen zum Zeitpunkt Follow-up, unstimuliert.

Follow-up	Gruppe	N	MW	SD	Min.	Max.	p-Werte
IRAK4	Patientengruppe	9	1,16	,77	,57	2,19	,018*
	Kontrollgruppe	9	1,67	,64	1,13	1,82	
TOLLIP	Patientengruppe	9	1,54	,83	,463	2,79	,128
	Kontrollgruppe	9	2,12	,70	1,09	3,37	

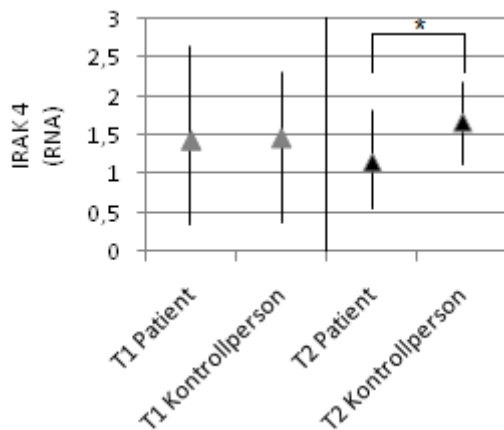
N = Anzahl der Probanden, **MW** = Mittelwert, **SD** = Standardabweichung, **Min.** = Minimum, **Max.** = Maximum

p-Werte: T-Test ohne Korrektur für multiples Testen

* = $p \leq 0,05$, signifikant

Abbildung 6 beschreibt die Werte der mRNA-Expression für IRAK4. Für den Zeitpunkt Follow-up ist der Mittelwert für die Kontrollpersonengruppe signifikant höher ($p=0,018$).

Abbildung 6: Graphische Darstellung der exprimierten mRNA von IRAK4, Gegenüberstellung der Mittelwerte (Dreiecke) aus der Patientengruppe und der Kontrollpersonengruppe zum Zeitpunkt Baseline und Follow-up.



T1 = Baseline, T2 = Follow-up, Darstellung von Mittelwerten (Dreiecke) und erreichten Minimal- und Maximalwerten pro Gruppe und Zeitpunkt.

* = $p \leq 0,05$

3.6 Gruppenvergleich nach Stimulation

3.6.1 Bakteriell Lipopolysaccharid: Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentrationen von MyD88, IRAK4, TOLLIP und cFOS lagen nach in-vitro-Stimulation durch Lipopolysaccharide bei der Patientengruppe im Durchschnitt unter denen der Kontrollgruppe. Es gab jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den Werten. Der Kolomogorov-Smirnov-Test ergab, dass die Messwerte bei IRAK4 nicht normalverteilt waren. Aus diesem Grund wurde zur Signifikanzprüfung der Mann-Whitney-U-Test durchgeführt.

Tabelle 21: Statistik der Proteinkonzentrationen im Gruppenvergleich zwischen Patienten und Kontrollpersonen zum Zeitpunkt Baseline mit LPS-Stimulation.

<u>Baseline</u>	Gruppe	N	MW	SD	Min.	Max.	p-Werte
MyD88	Patientengruppe	9	1,48	,78	,09	3,03	,280
	Kontrollgruppe	9	5,00	9,43	,68	28,57	
IRAK4	Patientengruppe	9	2294,54	1480,13	1010,18	5501,45	,233 ¹
	Kontrollgruppe	9	2497,03	3779,31	602,32	12510,17	
TOLLIP	Patientengruppe	9	38,15	91,18	,00	275,26	,141
	Kontrollgruppe	9	379,70	654,94	24,74	2083,46	
TICAM1	Patientengruppe	9	151,10	167,16	17,53	518,89	,827
	Kontrollgruppe	9	131,99	196,86	,00	640,15	
cFOS	Patientengruppe	9	121,55	100,53	,00	244,79	,406
	Kontrollgruppe	9	214,52	311,09	,00	992,42	

N = Anzahl der Probanden, **MW** = Mittelwert, **SD** = Standardabweichung, **Min.** = Minimum, **Max.** = Maximum
p-Werte: T-Test ohne Korrektur für multiples Testen

¹ = Mann-Whitney-U-Test ohne Korrektur für multiples Testen

Der Gruppenvergleich der Follow-up-Untersuchung bei LPS-Stimulierung zeigte keine merklichen Differenzen zwischen Patientengruppe und Kontrollgruppe. Die Werte können aus der nachstehenden Tabelle 22 entnommen werden.

Tabelle 22: Statistik der Proteinkonzentrationen im Gruppenvergleich zwischen Patienten und Kontrollpersonen zum Zeitpunkt Follow-up mit LPS-Stimulation.

<u>Follow-up</u>	Gruppe	N	MW	SD	Min.	Max.	p-Werte
MyD88	Patientengruppe	9	2,55	1,94	,87	5,57	,222
	Kontrollgruppe	9	1,44	1,76	,00	5,31	
IRAK4	Patientengruppe	9	1351,15	594,26	724,40	2631,08	,312
	Kontrollgruppe	9	1092,19	447,26	541,35	1873,28	
TOLLIP	Patientengruppe	9	257,44	520,70	,00	1578,77	,200
	Kontrollgruppe	9	531,35	327,51	72,66	1224,56	
TICAM1	Patientengruppe	9	158,64	145,36	19,42	415,44	,495
	Kontrollgruppe	9	118,35	94,17	5,79	263,19	
cFOS	Patientengruppe	9	224,55	239,24	50,20	811,07	,599
	Kontrollgruppe	9	319,30	472,47	,00	1460,92	

N = Anzahl der Probanden, **MW** = Mittelwert, **SD** = Standardabweichung, **Min.** = Minimum, **Max.** = Maximum
p-Werte: T-Test ohne Korrektur für multiples Testen

3.6.2 Bakteriell Lipopolysaccharid: mRNA-Expression

Der Gruppenvergleich nach der in vitro LPS-Stimulation zeigte in der Baseline-Untersuchung für die gesunde Kontrollgruppe geringfügig höhere Werte (siehe Tabelle 23).

Tabelle 23: Statistik der mRNA-Expression im Gruppenvergleich zwischen Patienten und Kontrollpersonen zum Zeitpunkt Baseline mit LPS-Stimulation.

<u>Baseline</u>	Gruppe	N	MW	SD	Min.	Max.	p-Werte
IRAK4	Patientengruppe	9	1,66	,86	,26	2,73	,919
	Kontrollgruppe	9	1,70	,89	,34	3,16	
TOLLIP	Patientengruppe	9	2,35	1,47	,20	5,09	,716
	Kontrollgruppe	9	2,68	2,15	,28	7,03	

N = Anzahl der Probanden, **MW** = Mittelwert, **SD** = Standardabweichung, **Min.** = Minimum, **Max.** = Maximum
p-Werte: T-Test ohne Korrektur für multiples Testen

Die Follow-up-Untersuchung zeigte für die Kontrollgruppe nach der Stimulation höhere Werte als bei der zu vergleichenden Patientengruppe. Bei der mRNA-Expression von TOILLP ist eine deutliche Signifikanz ablesbar ($p=0,007$). Der Unterschied bei IRAK4 zwischen den Gruppen war ebenfalls signifikant ($p=0,047$). Die Daten sind in der folgenden Tabelle 24 aufgeführt.

Tabelle 24: Statistik der mRNA-Expression im Gruppenvergleich zwischen Patienten und Kontrollpersonen zum Zeitpunkt Follow-up mit LPS-Stimulation.

Follow-up	Gruppe	N	MW	SD	Min.	Max.	p-Werte
IRAK4	Patientengruppe	9	1,39	,57	,68	2,63	,047*
	Kontrollgruppe	9	2,24	1,04	,84	4,56	
TOLLIP	Patientengruppe	9	1,51	,48	,96	2,14	,007*
	Kontrollgruppe	9	3,30	1,66	,67	6,14	

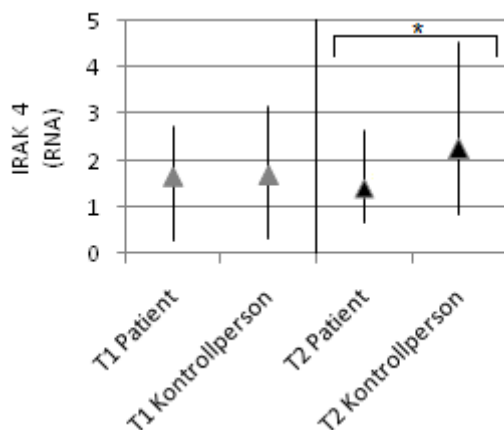
N = Anzahl der Probanden, **MW** = Mittelwert, **SD** = Standardabweichung, **Min.** = Minimum, **Max.** = Maximum

p-Werte: T-Test ohne Korrektur für multiples Testen

* = $p \leq 0,05$, signifikant

Abbildung 7 zeigt die Verteilung der mRNA-Expression von IRAK4 bei LPS-Stimulation für beide Gruppen. Zum Zeitpunkt Follow-up ist ein signifikanter Unterschied ($p=0,047$) zwischen dem Mittelwerten der Patientengruppe und dem der Kontrollgruppe zu registrieren.

Abbildung 7: Graphische Darstellung der exprimierten mRNA von IRAK4 mit LPS-Stimulation, Gegenüberstellung der Mittelwerte (Dreiecke) aus der Patientengruppe und der Kontrollpersonengruppe zum Zeitpunkt Baseline und Follow-up.

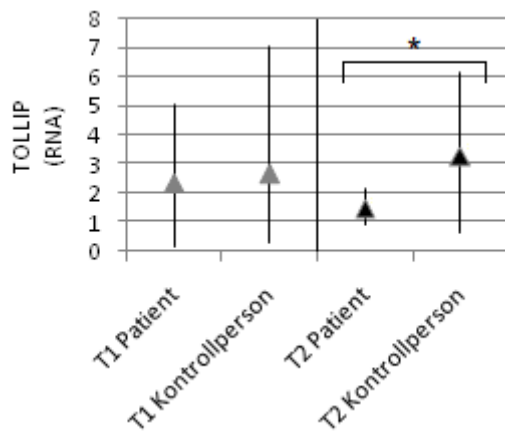


T1 = Baseline, T2 = Follow-up, Darstellung von Mittelwerten (Dreiecke) und erreichten Minimal- und Maximalwerten pro Gruppe und Zeitpunkt.

* = $p \leq 0,05$

In Abbildung 8 wird die mRNA-Expression von TOLLIP bei einer Stimulation mit LPS graphisch dargestellt. Zum Zeitpunkt der Follow-up-Untersuchung ist im Gruppenvergleich bei den Kontrollpersonen eine signifikant höhere Expression festzustellen.

Abbildung 8: Graphische Darstellung der exprimierten mRNA von TOLLIP mit LPS-Stimulation, Gegenüberstellung der Mittelwerte (Dreiecke) aus der Patientengruppe und der Kontrollpersonengruppe zum Zeitpunkt Baseline und Follow-up.



T1 = Baseline, T2 = Follow-up, Darstellung von Mittelwerten (Dreiecke) und erreichten Minimal- und Maximalwerten pro Gruppe und Zeitpunkt.

* = $p \leq 0,05$

3.6.3 Virales poly(I:C): Proteinkonzentration

Die deskriptive Statistik lässt nach Stimulation mit poly(I:C) in der Baseline-Untersuchung eine Tendenz zur Signifikanz für das Protein TOLLIP feststellen ($p=0,093$).

Tabelle 25: Statistik der Proteinkonzentrationen im Gruppenvergleich zwischen Patienten und Kontrollpersonen zum Zeitpunkt Baseline mit poly(I:C)-Stimulation.

Baseline	Gruppe	N	MW	SD	Min.	Max.	p-Werte
MyD88	Patientengruppe	9	3,85	1,81	1,79	7,08	,403
	Kontrollgruppe	9	2,99	2,43	,00	8,17	
IRAK4	Patientengruppe	9	3467,92	1549,38	2000,71	5737,88	,420
	Kontrollgruppe	9	4690,88	4153,63	2108,15	14986,94	
TOLLIP	Patientengruppe	9	47,91	67,73	,00	171,93	,093
	Kontrollgruppe	9	134,06	127,99	,00	381,03	
TICAM1	Patientengruppe	9	145,02	139,45	21,25	392,66	,393
	Kontrollgruppe	9	98,67	75,44	,00	246,14	
cFOS	Patientengruppe	9	156,81	104,26	,00	319,32	,771
	Kontrollgruppe	9	175,64	159,60	1,06	452,12	

N = Anzahl der Probanden, **MW** = Mittelwert, **SD** = Standardabweichung, **Min.** = Minimum, **Max.** = Maximum
p-Werte: T-Test ohne Korrektur für multiples Testen

Die Werte von TOLLIP lagen in der Follow-up-Untersuchung für die Patientengruppe signifikant niedriger im Vergleich zur Kontrollgruppe (p= 0,046). Die deskriptive Statistik ist wie folgt in der Tabelle 26 beschrieben.

Tabelle 26: Statistik der Proteinkonzentrationen im Gruppenvergleich zwischen Patienten und Kontrollpersonen zum Zeitpunkt Follow-up mit poly(I:C)-Stimulation.

Follow-up	Gruppe	N	MW	SD	Min.	Max.	p-Werte
MyD88	Patientengruppe	9	13,59	28,75	,06	89,87	,233 ¹
	Kontrollgruppe	9	3,36	3,98	,16	13,06	
IRAK4	Patientengruppe	9	2656,37	1782,25	1166,15	6632,79	,942
	Kontrollgruppe	9	2603,53	1205,17	1102,44	4265,36	
TOLLIP	Patientengruppe	9	42,07	83,21	,00	246,97	,046*
	Kontrollgruppe	9	207,70	214,13	,00	661,54	
TICAM1	Patientengruppe	9	162,20	138,78	22,51	429,48	,391
	Kontrollgruppe	9	114,73	82,38	12,33	225,43	
cFOS	Patientengruppe	9	150,12	165,23	,00	418,76	,689
	Kontrollgruppe	9	181,62	162,21	,00	492,30	

N = Anzahl der Probanden, **MW** = Mittelwert, **SD** = Standardabweichung, **Min.** = Minimum, **Max.** = Maximum

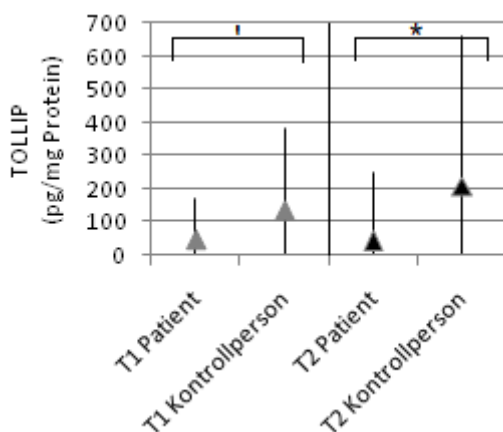
p-Werte: T-Test ohne Korrektur für multiples Testen

¹ = Mann-Whitney-U-Test ohne Korrektur für multiples Testen

* = p≤0,05, signifikant

Die signifikanten Differenzen der Mittelwerte im Gruppenvergleich bei einer Poly(I:C)-Stimulation bei der Proteinkonzentration von TOLLIP zeigt Abbildung 9.

Abbildung 9: Graphische Darstellung der Proteinkonzentration von TOLLIP mit poly(I:C)-Stimulation, Gegenüberstellung der Mittelwerte aus der Patientengruppe und der Kontrollpersonengruppe zum Zeitpunkt Baseline und Follow-up.



T1 = Baseline, T2 = Follow-up, Darstellung von Mittelwerten (Dreiecke) und erreichten Minimal- und Maximalwerten pro Gruppe und Zeitpunkt.

* = p≤0,05

' = p≤0,1, Tendenz zur Signifikanz

3.6.4 Virales poly(I:C): mRNA-Expression

Unter Stimulation mit viralem poly(I:C) konnte man im Gruppenvergleich der Mittelwerte keine wesentlichen Unterschiede feststellen. Die Divergenz der Minimalwerte und Maximalwerte von TOLLIP war bei den gesunden Probanden größer, als die der Patienten. Dies lässt sich aus Tabelle 27 ablesen.

Tabelle 27: Statistik der mRNA-Expression im Gruppenvergleich zwischen Patienten und Kontrollpersonen zum Zeitpunkt Baseline mit poly(I:C)-Stimulation.

<u>Baseline</u>	Gruppe	N	MW	SD	Min.	Max.	p-Werte
IRAK4	Patientengruppe	9	1,51	,53	,77	2,48	,392
	Kontrollgruppe	9	1,81	,88	,49	3,29	
TOLLIP	Patientengruppe	9	2,05	1,05	,97	3,69	,677
	Kontrollgruppe	9	2,35	1,77	,43	6,32	

N = Anzahl der Probanden, **MW** = Mittelwert, **SD** = Standardabweichung, **Min.** = Minimum, **Max.** = Maximum
p-Werte: T-Test ohne Korrektur für multiples Testen

In der Follow-up-Untersuchung wurde die mRNA beider Proteine bei den gesunden Probanden häufiger exprimiert. Bei TOLLIP war eine Tendenz zur Signifikanz ablesbar ($p=0,063$) wie aus Tabelle 28 zu entnehmen ist.

Tabelle 28: Statistik mRNA-Expression im Gruppenvergleich zwischen Patienten und Kontrollpersonen zum Zeitpunkt Follow-up mit poly(I:C)-Stimulation.

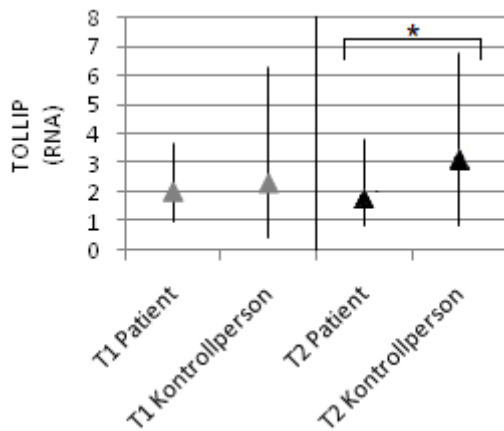
<u>Follow-up</u>	Gruppe	N	MW	SD	Min.	Max.	p-Werte
IRAK4	Patientengruppe	9	1,58	,85	,63	3,12	,192
	Kontrollgruppe	9	2,26	1,24	,97	5,14	
TOLLIP	Patientengruppe	9	1,82	,93	,86	3,81	,063*
	Kontrollgruppe	9	3,18	1,81	,84	6,80	

N = Anzahl der Probanden, **MW** = Mittelwert, **SD** = Standardabweichung, **Min.** = Minimum, **Max.** = Maximum
p-Werte: T-Test ohne Korrektur für multiples Testen

* = $p \leq 0,1$, Tendenz zur Signifikanz

Der Unterschied ($p=0,063$) im Gruppenvergleich zum Zeitpunkt Follow-up für die mRNA-Expression wird von Abbildung 10 aufgezeigt.

Abbildung 10: Graphische Darstellung der mRNA-Expression von TOLLIP mit poly(I:C)-Stimulation, Gegenüberstellung der Mittelwerte (Dreiecke) aus der Patientengruppe und der Kontrollpersonengruppe zum Zeitpunkt Baseline und Follow-up.



T1 = Baseline, T2 = Follow-up, Darstellung von Mittelwerten (Dreiecke) und erreichten Minimal- und Maximalwerten pro Gruppe und Zeitpunkt.

* = $p \leq 0,1$, Tendenz zur Signifikanz

3.7 Stimulationseffekt

3.7.1 Gruppenvergleich

In nachfolgenden Gruppenvergleichen wurde der Stimulationseffekt zwischen Patientengruppe und Kontrollgruppe betrachtet. Hierbei verglich man die gemessenen, stimulierten Werte der Proteinkonzentrationen und der mRNA-Expressionen minus der unstimulierten Werte. Der subtrahierte Wert stimuliert – unstimuliert wurde als Stimulationseffekt bezeichnet.

3.7.1.1 Bakteriellies Lipopolysaccharid: Proteinkonzentration

Betrachtete man den Stimulationseffekt durch LPS zwischen schizophrenen und gesunden Probanden, ergaben sich in der Baseline-Untersuchung keine signifikanten Unterschiede. Der Mittelwert des Stimulationseffekt bei den Patienten war für die Parameter MyD88, IRAK4, TOLLIP und cFOS negativ (d.h. die durchschnittliche Proteinkonzentration war nach LPS-Stimulation niedriger als ohne Stimulation), die Kontrollgruppe zeigte nur für die Proteinkonzentration von IRAK4 einen negativen Stimulationseffekt. Nach medikamentöser Therapie der Patienten (entspricht Zeitpunkt Follow-up) wiesen die Werte des Stimulationseffekts durch LPS im Vergleich zu denen der Kontrollgruppe ebenfalls keine signifikanten

Unterschiede auf. Die Patientengruppe zeigte in der Follow-up-Untersuchung für MyD88 einen negativen Stimulationseffekt, die restlichen waren positiv. In der Kontrollgruppe waren für MyD88, IRAK4 und TICAM1 die Proteinkonzentrationen nach LPS-Stimulation niedriger. Die deskriptive Statistik aller untersuchten Proteine auf LPS-Stimulierbarkeit ist in Tabelle 29 aufgeführt.

Tabelle 29: Statistik des Stimulationseffekts durch LPS bei den Proteinkonzentrationen im Gruppenvergleich zwischen Patienten und Kontrollpersonen zum Zeitpunkt Baseline und Follow-up.

Baseline		N	MW	SD	Min.	Max.	p-Werte
Gruppe							
MyD88	Patientengruppe	9	-2,05	2,46	-,822	5,05	,631
	Kontrollgruppe	9	,04	12,55	-24,62	24,64	
IRAK4	Patientengruppe	9	-237,26	1546,32	-916,86	3984,63	,918
	Kontrollgruppe	9	-171,26	1083,84	-2187,59	1347,49	
TOLLIP	Patientengruppe	9	-2,29	53,03	-38,47	-123,63	,148
	Kontrollgruppe	9	339,90	673,06	-857,26	-2083,46	
TICAM1	Patientengruppe	9	31,50	81,28	-233,53	25,03	,777
	Kontrollgruppe	9	43,94	100,80	-308,65	3,41	
cFOS	Patientengruppe	9	-22,74	87,17	-109,73	115,12	,516
	Kontrollgruppe	9	29,53	219,28	-543,18	158,36	
Follow-up		N	MW	SD	Min.	Max.	p-Werte
Gruppe							
MyD88	Patientengruppe	9	-7,96	20,16	-1,56	61,40	,906
	Kontrollgruppe	9	-6,87	53,15	-,95	159,97	
IRAK4	Patientengruppe	9	235,97	704,04	-1735,15	811,66	,123
	Kontrollgruppe	9	-500,30	1159,08	-768,41	2983,45	
TOLLIP	Patientengruppe	9	219,19	506,34	-1508,19	142,76	,348
	Kontrollgruppe	9	366,39	379,86	-1224,56	26,52	
TICAM1	Patientengruppe	9	36,54	41,22	-94,83	17,84	,942
	Kontrollgruppe	9	34,58	68,96	-124,60	20,96	
cFOS	Patientengruppe	9	101,75	180,99	-563,94	23,51	,945
	Kontrollgruppe	9	122,95	363,83	-955,35	230,08	

N = Anzahl der Probanden, **MW** = Mittelwert, **SD** = Standardabweichung, **Min.** = Minimum, **Max.** = Maximum
p-Werte: T-Test ohne Korrektur für multiples Testen

Die einfache lineare Regression untersucht die Abhängigkeit einer Variablen von einer zweiten. Um zu sehen, ob die Erkrankung Schizophrenie einen Einfluss auf den Stimulationseffekt hat, wurde als binäre Einflussvariable x die Krankheit Schizophrenie gewählt (0 = gesunde Kontrollgruppe, 1 = schizophrene Patientengruppe). Die Zielvariable y enthält die Werte der Stimulationseffekte von Proteinkonzentration bzw. mRNA-Expression durch bakterielle LPS-Stimulation und

virale poly(I:C)-Stimulation. Somit wird der lineare Zusammenhang zwischen der Zielvariablen y und der Einflussvariablen x untersucht.

Die Regressionsanalyse zeigte für den Stimulationseffekt bei LPS-Stimulation in der Proteinkonzentration untersuchter Parameter, dass die Krankheit Schizophrenie vor Medikation (Baseline) und nach Medikation (Follow-up) keinen signifikanten Einfluss darauf hat. Tabelle 30 gibt einen Überblick der linearen Regressionsanalyse mit Bestimmtheitsmaß (R^2), Regressionskoeffizient B , Standardfehler, standardisierter Regressionskoeffizient (Beta), t-Wert (T) und Signifikanz (p-Werte).

Tabelle 30: Lineare Regressionsanalyse mit dem Einflussfaktor Schizophrenie als unabhängige Variable und Stimulationseffekte durch LPS-Stimulation bei den Proteinkonzentrationen als abhängige Variable.

Baseline		R²	Regressions- koeffizient B	Standardfehler	Beta	T	p-Werte
Einflussfaktor							
MyD88	(Konstante)	,015	,038	3,013		,013	,990
	Schizophrenie		-2,086	4,261	-,121	-,489	,631
IRAK4	(Konstante)	,001	-171,258	445,085		-,385	,705
	Schizophrenie		-65,997	629,445	-,026	-,105	,918
TOLLIP	(Konstante)	,126	339,899	159,133		,014	,048
	Schizophrenie		-342,192	225,047	-,355	-1,521	,148
TICAM1	(Konstante)	,005	43,942	30,520		1,440	,169
	Schizophrenie		-12,446	43,162	-,072	-,288	,777
cFOS	(Konstante)	,027	29,527	55,618		,531	,603
	Schizophrenie		-52,272	78,656	-,164	-,665	,516
Follow-up		R²	Regressions- koeffizient B	Standardfehler	Beta	t-value	p-Werte
Einflussfaktor							
MyD88	(Konstante)	,001	-6,873	6,420		-1,071	,300
	Schizophrenie		-1,087	9,079	-,030	-,120	,906
IRAK4	(Konstante)	,142	-500,296	316,648		-1,565	,137
	Schizophrenie		736,265	452,050	,377	1,629	,123
TOLLIP	(Konstante)	,055	417,558	145,106		2,878	,011
	Schizophrenie		-198,367	205,211	-,235	-,967	,348
TICAM1	(Konstante)	,000	34,578	18,938		1,826	,087
	Schizophrenie		1,966	26,782	,018	,073	,942
cFOS	(Konstante)	,000	111,394	97,047		1,148	,268
	Schizophrenie		-9,646	137,246	-,018	-,070	,945

R² = Bestimmtheitsmaß, **Beta** = standardisierter Regressionskoeffizient, **T** = t-Wert

3.7.1.2 Bakteriell Lipopolysaccharid: mRNA-Expression

Die Proteine TOLLIP und IRAK 4 wurden zusätzlich auf ihre mRNA-Expression hin getestet. Im Gruppenvergleich auf ihre Stimulierbarkeit durch LPS gab es in der Follow-up-Untersuchung für TOLLIP eine deutliche Signifikanz (p=0,007), der durchschnittliche Stimulationseffekt der Kontrollgruppe war signifikant höher als in

der Patientengruppe (siehe Tabelle 31 und Abbildung 10). In der mRNA-Expression von IRAK4 zeigten beide Gruppen einen positiven durchschnittlichen Stimulationseffekt durch bakterielles LPS, jedoch keinen signifikanten Unterschied im Gruppenvergleich Kontrolle vs. Patient.

Tabelle 31: Statistik des Stimulationseffekts durch LPS der mRNA-Expression im Gruppenvergleich zwischen Patienten und Kontrollpersonen zum Zeitpunkt Baseline und Follow-up.

Baseline		N	MW	SD	Min.	Max.	p-Werte
	Gruppe						
IRAK4	Patientengruppe	9	,23	,46	-,18	1,15	,963
	Kontrollgruppe	9	,24	,60	-,81	,86	
TOLLIP	Patientengruppe	9	,17	,82	-1,61	1,37	,369
	Kontrollgruppe	9	,55	,91	-,72	2,03	
Follow-up		N	MW	SD	Min.	Max.	p-Werte
	Gruppe						
IRAK4	Patientengruppe	9	,23	,47	-,35	,89	,288
	Kontrollgruppe	9	,57	,81	-,47	2,37	
TOLLIP	Patientengruppe	9	-,03	,57	-1,07	,55	,019*
	Kontrollgruppe	9	,99	1,02	-,44	2,76	

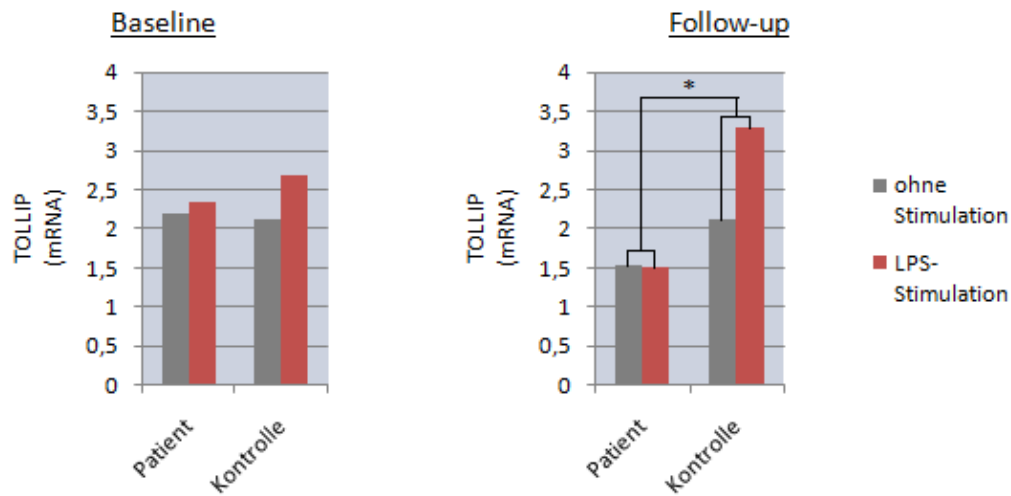
N = Anzahl der Probanden, **MW** = Mittelwert, **SD** = Standardabweichung, **Min.** = Minimum, **Max.** = Maximum

p-Werte: T-Test ohne Korrektur für multiples Testen

* = $p \leq 0,05$, signifikant

Zur Baseline-Untersuchung war der positive Stimulationseffekt bei der mRNA-Expression in der Kontrollgruppe von TOLLIP etwas größer als in der Patientengruppe (siehe Abbildung 11 und Tabelle 31). Zur Follow-up-Untersuchung war die Stimulierbarkeit der mRNA-Expression von TOLLIP durch LPS in der Kontrollgruppe deutlich größer als in der Patientengruppe. Die Stimulierbarkeit der Patientengruppe blieb annähernd gleich niedrig. In Abbildung 11 wird der signifikante Unterschied der Stimulierbarkeit mittels LPS bei der Follow-up-Untersuchung zwischen Patientengruppe und Kontrollgruppe graphisch veranschaulicht.

Abbildung 11: Graphische Darstellung der Mittelwerte je Gruppe für die mRNA-Expression von TOLLIP, unstimuliert und mit LPS stimuliert zum Zeitpunkt Baseline und Follow-up.



Grauer Balken = Mittelwert der mRNA-Expression je Gruppe und Zeitpunkt

Roter Balken = Mittelwert der mRNA-Expression nach LPS-Stimulation je Gruppe und Zeitpunkt

* = $p \leq 0,05$, signifikant

Die Regressionsanalyse ergab, dass die Krankheit Schizophrenie einen signifikant negativen Einfluss ($p=0,019$) auf den Stimulationseffekt durch bakterielles Lipopolysaccharid bei der mRNA-Expression von TOLLIP zum Zeitpunkt Follow-up hat (siehe Tabelle 32).

Tabelle 32: Lineare Regressionsanalyse mit dem Einflussfaktor Schizophrenie als unabhängige Variable und Stimulationseffekte durch LPS-Stimulation bei den mRNA-Expressionen als abhängige Variable.

Baseline		R²	Regressionskoeffizient B	Standardfehler	Beta	T	p-Werte
Einflussfaktor							
IRAK4	(Konstante)	,000	,238	,177		1,343	,198
	Schizophrenie		-,012	,251	-,012	-,047	,963
TOLLIP	(Konstante)	,051	,545	,290		1,881	,078
	Schizophrenie		-,379	,410	-,225	-,924	,369
Follow-up		R²	Regressionskoeffizient B	Standardfehler	Beta	T	p-Werte
Einflussfaktor							
IRAK4	(Konstante)	,070	,570	,221		2,583	,020
	Schizophrenie		-,343	,312	-,265	-1,099	,288
TOLLIP	(Konstante)	,299	,987	,275		3,586	,002
	Schizophrenie		-1,016	,389	-,546	-2,610	,019*

R² = Bestimmtheitsmaß, **Beta** = standardisierter Regressionskoeffizient, **T** = t-Wert
p-Werte: * = p≤0,05, signifikant

3.7.1.3 Virales poly(I:C): Proteinkonzentration

Der Stimulationseffekt durch virales poly(I:C) wurde zwischen schizophrenen Patienten und gesunden Probanden verglichen. Dabei ergab sich für das Protein TOLLIP ein tendenziell signifikanter Unterschied in der Stimulation durch poly(I:C) zum Zeitpunkt Baseline (p=0,094). Der durchschnittliche Stimulationseffekt war in diesem Versuchsansatz für die Kontrollgruppe höher (siehe Tabelle 33 und Abbildung 11). Nachfolgende Tabelle 33 dient zur Darstellung der deskriptiven Statistik. Der durchschnittliche Stimulationseffekt durch poly(I:C) war in der Patientengruppe für alle Versuchsansätze der Proteinkonzentrationen positiv.

Tabelle 33: Statistik des Stimulationseffekts durch poly(I:C) der Proteinkonzentrationen im Gruppenvergleich zwischen Patienten und Kontrollpersonen zum Zeitpunkt Baseline und Follow.

Baseline		N	MW	SD	Min.	Max.	p-Werte
Gruppe							
MyD88	Patientengruppe	9	,33	1,30	-2,49	1,49	,418
	Kontrollgruppe	9	-1,98	124,55	-370,00	22,93	
IRAK4	Patientengruppe	9	936,12	2042,13	-4936,04	2745,76	,233
	Kontrollgruppe	9	2022,60	1658,34	-4664,35	139,54	
TOLLIP	Patientengruppe	9	7,46	12,24	-27,75	3,41	,094*
	Kontrollgruppe	9	94,26	145,97	-381,03	67,82	
TICAM1	Patientengruppe	9	25,42	45,26	-107,30	10,21	,487
	Kontrollgruppe	9	9,99	46,78	-714,13	85,36	
cFOS	Patientengruppe	9	3,68	79,87	-118,17	88,28	,787
	Kontrollgruppe	9	-4,12	117,74	-213,88	177,93	

Follow-up		N	MW	SD	Min.	Max.	p-Werte
Gruppe							
MyD88	Patientengruppe	9	3,08	37,39	-86,14	61,83	,580
	Kontrollgruppe	9	-4,74	3,73	-10,78	1,96	
IRAK4	Patientengruppe	9	1541,19	1765,36	-5400,39	139,50	,525
	Kontrollgruppe	9	1011,04	1661,38	-2952,02	2210,72	
TOLLIP	Patientengruppe	9	3,83	80,13	-176,39	142,76	,239
	Kontrollgruppe	9	93,88	174,18	-397,66	89,02	
TICAM1	Patientengruppe	9	40,11	34,70	-102,30	13,00	,705
	Kontrollgruppe	9	30,96	62,16	-145,88	12,28	
cFOS	Patientengruppe	9	27,31	138,82	-298,29	133,97	,482
	Kontrollgruppe	9	-5,45	180,49	-380,38	242,25	

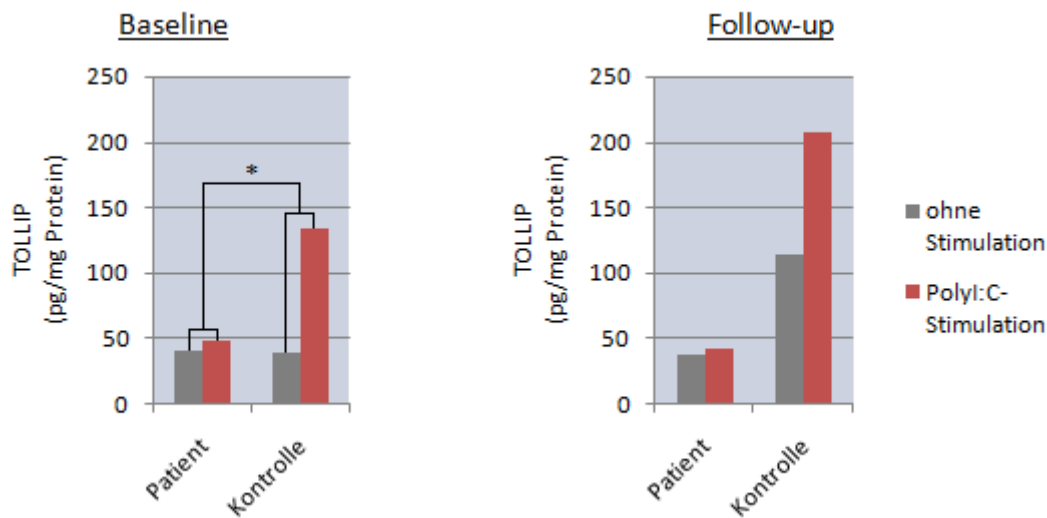
N = Anzahl der Probanden, **MW** = Mittelwert, **SD** = Standardabweichung, **Min.** = Minimum, **Max.** = Maximum

p-Werte: T-Test ohne Korrektur für multiples Testen

* = $p \leq 0,1$, Tendenz zur Signifikanz

Der Stimulationseffekt auf die durchschnittliche Proteinkonzentration von TOILLP durch virales poly(I:C) zum Zeitpunkt Baseline und zum Zeitpunkt Follow-up ist in Abbildung 12 dargestellt.

Abbildung 12: Graphische Darstellung der Mittelwerte je Gruppe für die Proteinkonzentration von TOLLIP, unstimuliert und mit poly(I:C) stimuliert zum Zeitpunkt Baseline und Follow-up.



Grauer Balken = Mittelwert der Proteinkonzentration je Gruppe und Zeitpunkt

Roter Balken = Mittelwert der Proteinkonzentration nach poly(I:C)-Stimulation je Gruppe und Zeitpunkt

* = $p \leq 0,1$, Tendenz zur Signifikanz

Durch die lineare Regressionsanalyse konnte ein tendenziell signifikant negativer Einfluss ($p=0,094$) auf den Stimulationseffekt durch virales poly(I:C) bei der Proteinkonzentration von TOLLIP zum Zeitpunkt Baseline durch den Prädiktor Schizophrenie ermittelt werden. D.h. die Krankheit Schizophrenie hat einen negativen Einfluss auf den Stimulationseffekt durch poly(I:C)-Stimulation in der Proteinkonzentration von TOLLIP zum Zeitpunkt Baseline. Auf die restlichen Parameter zeigte der Prädiktor keinen signifikanten Einfluss (siehe Tabelle 34).

Tabelle 34: Lineare Regressionsanalyse mit dem Einflussfaktor Schizophrenie als unabhängige Variable und Stimulationseffekte durch poly(I:C)-Stimulation bei den Proteinkonzentrationen als abhängige Variable.

Baseline		R²	Regressionskoeffizient B	Standardfehler	Beta	T	p-Werte
Einflussfaktor							
MyD88	(Konstante)	,041	-1,979	1,963		-1,008	,328
	Schizophrenie		2,307	2,776	,203	,831	,418
IRAK4	(Konstante)	,088	2022,597	620,052		3,262	,005
	Schizophrenie		-1086,474	876,886	-,296	-1,239	,233
TOLLIP	(Konstante)	,165	94,264	34,527		2,730	,015
	Schizophrenie		-86,804	48,829	-,406	-1,778	,094*
TICAM1	(Konstante)	,031	9,992	15,342		,651	,524
	Schizophrenie		15,428	21,697	,175	,711	,487
cFOS	(Konstante)	,005	-9,441	33,763		-,280	,783
	Schizophrenie		13,118	47,749	,069	,275	,787
Follow-up		R²	Regressionskoeffizient B	Standardfehler	Beta	T	p-Werte
Einflussfaktor							
MyD88	(Konstante)	,020	-4,740	9,779		-,485	,634
	Schizophrenie		7,817	13,839	,140	,565	,580
IRAK4	(Konstante)	,026	1011,043	576,374		1,754	,099
	Schizophrenie		530,149	815,117	,160	,650	,525
TOLLIP	(Konstante)	,085	93,876	52,108		1,802	,090
	Schizophrenie		-90,050	73,692	-,292	-1,222	,239
TICAM1	(Konstante)	,009	30,958	16,780		1,845	,084
	Schizophrenie		9,152	23,731	,096	,396	,705
cFOS	(Konstante)	,031	-26,277	52,603		-,500	,624
	Schizophrenie		53,589	74,392	,177	,720	,482

R² = Bestimmtheitsmaß, **Beta** = standardisierter Regressionskoeffizient, **T** = t-Wert

3.7.1.4 Virales poly(I:C): mRNA-Expression

Die mRNA-Expression erwies nach einer in vitro Stimulation mittels poly(I:C) einen tendenziell signifikanten Unterschied ($p=0,073$) für Stimulationseffekt Patient vs. Stimulationseffekt Kontrolle für den Versuchsansatz „TOLLIP, mRNA, poly(I:C)-Stimulation, Follow-up“. Der Stimulationseffekt für die mRNA-Expression von TOLLIP

war für die Kontrollgruppe höher als für die Patientengruppe (Baseline und Follow-up). Tabelle 35 gibt die statistische Auswertung des Gruppenvergleichs zum Zeitpunkt Baseline und Follow-up wieder.

Tabelle 35: Statistik des Stimulationseffekts durch poly(I:C) der mRNA-Expression im Gruppenvergleich zwischen Patienten und Kontrollpersonen zum Zeitpunkt Baseline und Follow-up.

Baseline		N	MW	SD	Min.	Max.	p-Werte
	Gruppe						
IRAK4	Patientengruppe	9	,07	,48	-,92	,68	,231
	Kontrollgruppe	9	,35	,44	-,51	,99	
TOLLIP	Patientengruppe	9	-,13	,95	-2,43	,67	,363
	Kontrollgruppe	9	,22	,59	-,47	1,13	
Follow-up		N	MW	SD	Min.	Max.	p-Werte
	Gruppe						
IRAK4	Patientengruppe	9	,42	,63	-,23	1,37	,715
	Kontrollgruppe	9	,56	,99	-,34	2,95	
TOLLIP	Patientengruppe	9	,28	,53	-,59	1,02	,073*
	Kontrollgruppe	9	1,25	1,42	-,26	3,48	

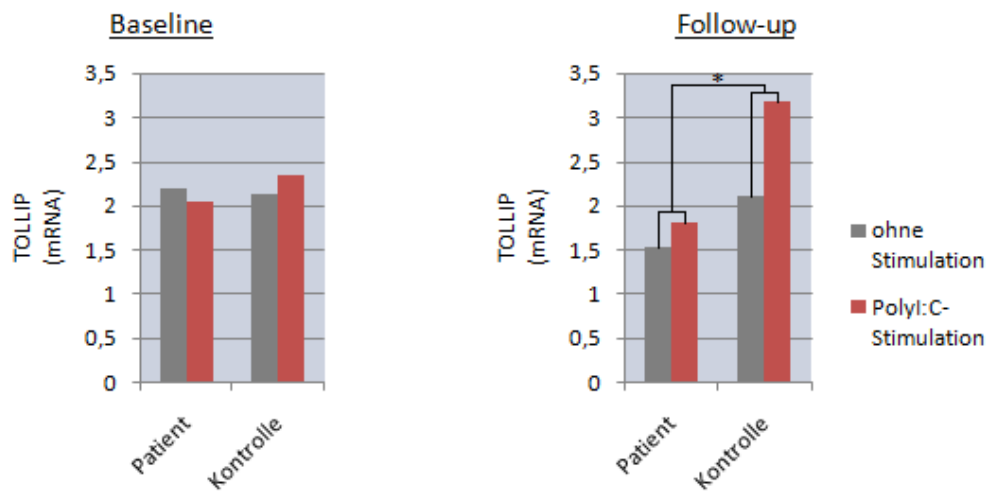
N = Anzahl der Probanden, **MW** = Mittelwert, **SD** = Standardabweichung, **Min.** = Minimum, **Max.** = Maximum

p-Werte: T-Test ohne Korrektur für multiples Testen

* = $p \leq 0,1$, Tendenz zur Signifikanz

Der Stimulationseffekt auf die durchschnittliche mRNA-Expression von TOILLP durch virales poly(I:C) zum Zeitpunkt Baseline und zum Zeitpunkt Follow-up ist in Abbildung 13 dargestellt.

Abbildung 13: Graphische Darstellung der Mittelwerte je Gruppe für die mRNA-Expression von TOLLIP, unstimuliert und mit poly(I:C) stimuliert zum Zeitpunkt Baseline und Follow-up.



Grauer Balken = Mittelwert der Proteinkonzentration je Gruppe und Zeitpunkt

Roter Balken = Mittelwert der Proteinkonzentration nach poly(I:C)-Stimulation je Gruppe und Zeitpunkt

* = $p \leq 0,1$, Tendenz zur Signifikanz

Die lineare Regressionsanalyse zeigt einen negativen Einfluss ($p=0,073$) durch die Krankheit Schizophrenie auf den Versuchsansatz „TOLLIP, mRNA-Expression, poly(I:C)-Stimulation, Follow-up“

Tabelle 36: Lineare Regressionsanalyse mit dem Einflussfaktor Schizophrenie als unabhängige Variable und Stimulationseffekte durch poly(I:C)-Stimulation bei den mRNA-Expressionen als abhängige Variable.

<u>Baseline</u>		R ²	Regressionskoeffizient B	Standardfehler	Beta	T	p-Werte
Einflussfaktor							
IRAK4	(Konstante)	,088	,346	,154		2,247	,039
	Schizophrenie		-,271	,218	-,297	-1,245	,231
TOLLIP	(Konstante)	,052	,215	,263		,817	,426
	Schizophrenie		-,349	,372	-,228	-,937	,363
<u>Follow-up</u>		R ²	Regressionskoeffizient B	Standardfehler	Beta	T	p-Werte
Einflussfaktor							
IRAK4	(Konstante)	,009	,562	,277		2,031	,059
	Schizophrenie		-,145	,391	-,092	-,371	,715
TOLLIP	(Konstante)	,187	1,252	,358		3,494	,003
	Schizophrenie		-,972	,507	-,432	-1,918	,073*

R² = Bestimmtheitsmaß, **Beta** = standardisierter Regressionskoeffizient, **T** = t-Wert

p-Werte: * = $p \leq 0,1$, Tendenz zur Signifikanz

3.8 Medikationseffekt

Um die Auswirkung der medikamentösen Behandlung durch Neuroleptika bei der Patientengruppe zu untersuchen, wurden Proteinkonzentration, mRNA-Expression und die Stimulationseffekte vor medikamentöser Behandlung (Zeitpunkt Baseline) mit den Messdaten unter medikamentöser Behandlung (Zeitpunkt Follow-up) verglichen. Hierfür wurde zuerst der Kolmogorow-Smirnow-Test auf Normalverteilung durchgeführt. Daraufhin wurden die Werte über den t-Test miteinander verglichen. Bis auf den Stimulationseffekt durch bakterielles Lipopolysaccharid auf die Proteinkonzentration von cFOS, konnte für die restlichen untersuchten Parameter in keinem Versuchsansatz aussagekräftige Ergebnisse ermittelt werden (Tabellen der statistischen Auswertung befinden sich im Anhang).

Der Stimulationseffekt bei der *in vitro* Stimulation durch LPS ergab im Vergleich unmediziert zu mediziert für das Protein cFOS eine Tendenz zur Signifikanz ($p=0,082$). Nach medikamentöser Behandlung war die Proteinkonzentration von cFOS beinahe unverändert, jedoch konnte ein deutlicher Anstieg der Proteinkonzentration nach LPS-Stimulation gemessen werden. Vor Neuroleptikaeinnahme war die Stimulierbarkeit niedriger. Die deskriptive Statistik wird in Tabelle 37 aufgeführt.

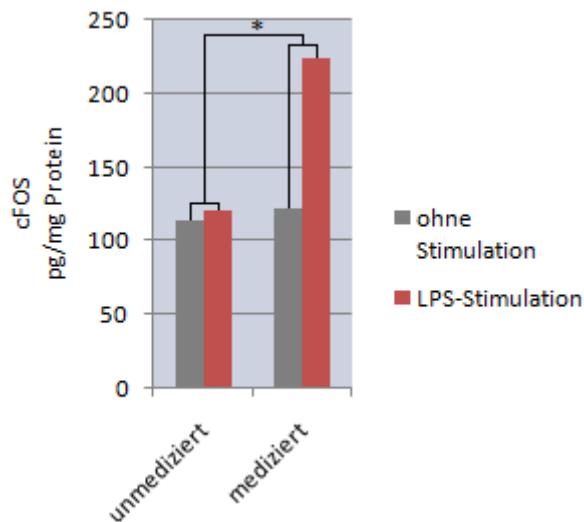
Tabelle 37: Durch den t-Test vergleicht man den Stimulationseffekt durch LPS der Proteinkonzentration vor und nach Medikamenteneinnahme in der Patientengruppe.

Zeitpunkt		N	MW	SD	Min.	Max.	p-Werte
MyD88	unmediziert	9	-2,05	2,46	-5,05	,82	,395
	mediziert	9	-7,96	20,16	-61,40	1,56	
IRAK4	unmediziert	9	-237,26	1546,32	-3984,63	916,88	,416
	mediziert	9	235,97	704,04	-811,66	1735,15	
TOLLIP	unmediziert	9	-2,29	53,03	-58,89	123,63	,210
	mediziert	9	219,19	506,34	-142,76	1508,19	
TICAM1	unmediziert	9	31,50	81,28	-25,03	233,53	,870
	mediziert	9	36,54	41,22	-17,84	94,83	
cFOS	unmediziert	9	-22,74	87,17	-115,12	109,73	,082
	mediziert	9	101,75	180,99	-23,51	563,94	

N = Anzahl der Probanden, **MW** = Mittelwert, **SD** = Standardabweichung, **Min.** = Minimum, **Max.** = Maximum
p-Werte: T-Test ohne Korrektur für multiples Testen

Abbildung 14 stellt den Unterschied des Stimulationseffekts durch LPS für das Protein cFOS jeweils ohne Medikamenteneinfluss und mit Medikamenteneinfluss bildlich dar.

Abbildung 14: Graphische Darstellung der Mittelwerte (Balken) für die Proteinkonzentration von cFOS vor und nach Stimulation durch LPS jeweils vor und nach medikamentöse Behandlung.



Grauer Balken = Mittelwert der Proteinkonzentration je Zeitpunkt (unmediziert/mediziert)

Roter Balken = Mittelwert der Proteinkonzentration nach LPS-Stimulation je Zeitpunkt (unmediziert/mediziert)

* = $p \leq 0,1$, Tendenz zur Signifikanz

3.9 Korrelationsanalyse

Für die signifikanten Messwerte aus den Gruppenvergleichen der Proteinkonzentrationen und der mRNA-Expressionen wurden zusätzlich Korrelationsanalysen mit anamnestischen Parametern durchgeführt. Somit kann der Grad des linearen Zusammenhanges bestimmt werden, jedoch nicht die Kausalität. Untersucht wurde der Zusammenhang von Messwerten zu Alter, Schweregrad der Erkrankung vor Medikation (PANSS-Gesamtpunktwert) und zu Schweregrad der Erkrankung nach Medikation (PANSS-Gesamtpunktwert bei Follow-up). Durch die Betrachtung der Verteilung der anamnestischen Parameter und der Messwerte, kann festgestellt werden, ob die Veränderung der einen Variablen einen Einfluss auf die Veränderung der anderen Variablen besitzt. Das Maß für den Grad der Beeinflussung ist der Korrelationskoeffizient. Dieser variiert von -1.0 bis +1.0, womit nicht nur die Stärke des Zusammenhanges, sondern auch die Richtung angezeigt

wird. Keine der durchgeführten Korrelationsanalysen zeigte einen Zusammenhang zwischen signifikanten Messwerten und anamnestischen Parametern. Die Tabellen 45 – 48 zeigen die Ergebnisse der ausgeführten Korrelationsanalysen.

Tabelle 45: Durch die Korrelationsanalyse wird der Grad des linearen Zusammenhangs zwischen dem Alter der schizophrenen Patienten und signifikanten Proteinkonzentrationen bestimmt.

Korrelation des Alters mit signifikanten Proteinkonzentrationen	N	Korrelationskoeffizient nach Spearman	p-Wert (2-seitig)
TOLLIP PolyI:C-stimuliert Baseline	9	,237	,539
TOLLIP PolyI:C-stimuliert Follow-up	9	-,040	,919

N = Anzahl der Probanden

Tabelle 46: Durch die Korrelationsanalyse wird der Grad des linearen Zusammenhangs zwischen dem Alter der schizophrenen Patienten und signifikanten mRNA-Expressionen bestimmt.

Korrelation des Alters mit signifikanten mRNA-Expressionen	N	Korrelationskoeffizient nach Spearman	p-Wert (2-seitig)
IRAK4 Baseline	9	-,033	,932
IRAK4 Follow-up	9	-,100	,798
IRAK4 LPS-stimuliert Baseline	9	,017	,966
IRAK4 LPS-stimuliert Follow-up	9	,217	,576
TOLLIP LPS-stimuliert Baseline	9	-,033	,932
TOLLIP LPS-stimuliert Follow-up	9	-,533	,139
TOLLIP PolyI:C-stimuliert Baseline	9	,100	,798
TOLLIP POLYI:C-stimuliert Follow-up	9	-,250	,516

N = Anzahl der Probanden

Tabelle 47: Durch die Korrelationsanalyse wird der Grad des linearen Zusammenhangs zwischen dem Schweregrad der Schizophrenie (PANSS-Gesamtpunktzahl) und der signifikanten Proteinkonzentrationen bestimmt.

Korrelation der PANSS mit signifikanten Proteinkonzentrationen	N	Korrelationskoeffizient nach Spearman	p-Wert (2-seitig)
TOLLIP PolyI:C-stimuliert unmediziert	9	,073	,852
TOLLIP PolyI:C-stimuliert mediziert	9	-,099	,799

N = Anzahl der Probanden

Tabelle 48: Durch die Korrelationsanalyse wird der Grad des linearen Zusammenhangs zwischen dem Schweregrad der Schizophrenie (PANSS-Gesamtpunktzahl) und der signifikanten mRNA-Expressionen bestimmt.

Korrelation der PANSS mit signifikanten mRNA-Expressionen	N	Korrelationskoeffizient nach Spearman	p-Wert (2-seitig)
IRAK4 unmediziert	9	-,333	,381
IRAK4 mediziert	9	,000	1,000
IRAK4 LPS-stimuliert unmediziert	9	,167	,668
IRAK4 LPS-stimuliert mediziert	9	,092	,814
TOLLIP LPS-stimuliert unmediziert	9	,033	,932
TOLLIP LPS-stimuliert mediziert	9	-,100	,797
TOLLIP PolyI:C-stimuliert unmediziert	9	-,500	,170
TOLLIP POLYI:C-stimuliert mediziert	9	,025	,949

N = Anzahl der Probanden

4 Diskussion

4.1 Diskussion der Methodik

4.1.1 Studienkollektiv

Bei der explorativ angelegten Studie nahmen neun schizophrene Patienten und neun gesunde Kontrollpersonen teil. Das ursprüngliche Studiendesign sah zwar zwanzig Teilnehmer pro Gruppe vor, konnte aber nicht erreicht werden, da sich die Rekrutierung von Patienten mit den festgelegten Ein- und Ausschlusskriterien als schwierig herausstellte. Da die Studie unter anderem einen Medikationseffekt bei der Patientengruppe untersuchen sollte, war es hierfür ausschlaggebend, dass die Patienten vor der ersten Blutabnahme für mindestens sechs Wochen ohne Medikamenteneinnahme waren. Da die Patienten aus dem stationären und ambulanten Bereich der Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie der LMU München rekrutiert wurden, handelte es sich bei vielen Patienten mit Verdacht auf eine schizophrene Psychose um akute Fälle, so dass noch bei Aufnahme Medikamente verabreicht wurden. Patienten, die durch eine Überweisung von niedergelassenen Psychiatern in die Klinik kamen, waren meist bereits medikamentös anbehandelt. Eine weitere Schwierigkeit bestand darin, dass einige schizophrene Patienten die Teilnahme an der Studie verweigerten. Die mäßige Kooperationsbereitschaft lässt sich bei vielen Patienten womöglich mit wahnhaften Ängsten erklären. Bei einem Teilnehmer aus der Patientengruppe musste die Diagnose Schizophrenie revidiert werden und er fiel nachträglich als Drop-out heraus. Nachdem in einem Zeitraum von Juni 2014 bis November 2015 Blutproben im Rahmen der Studie abgenommen, bearbeitet und eingefroren wurden, wurde entschieden, die bis dahin gesammelten Proben auszuwerten. Maßgeblich für diesen Entschluss war die mögliche Denaturierung und Artefaktbildung in der isolierten mRNA nach mehrmonatiger Lagerung (Shabihkhani et al., 2014). Um ein vergleichbares Ergebnis bei der Auswertung zu erzielen, müssen die Proben gleichzeitig mit den identischen Einstellungen bestimmt werden. Diese Umstände haben dazu geführt, dass die Auswertung mit einer geringeren Teilnehmerzahl als ursprünglich geplant durchgeführt wurde. Für die Kontrollpersonengruppe waren alle Teilnehmer im Bezug auf das Alter (+/- 12 Monate) und das Geschlecht passend ausgewählt. Die

Infektanamnese wurde für beide Gruppen genau, wie in den Ein- und Ausschlusskriterien beschrieben, überprüft. Somit sollten Auswirkungen z.B. eines kürzlich durchgemachten Infekts auf immunologische Parameter ausgeschlossen werden, da diese zur Verzerrung der durchgeführten Untersuchungen führen können. Für keinen Teilnehmer der Studie war zum Zeitpunkt beider Blutabnahmen eine infektiöse oder inflammatorische Erkrankung bekannt. Es wurde ebenfalls darauf geachtet, dass zeitnah geeignete Kontrollpersonen rekrutiert wurden, um einen Einfluss von jahreszeitlichen Schwankungen zu vermeiden. Angesichts der geringen Studienteilnehmer und aufgrund der streng gehaltenen Kriterien, soll diese Studie eher als ein erster Einblick in das komplexe System der Immunregulation, speziell für die Toll-like Rezeptor Signalkaskade, bei Schizophrenie dienen.

4.1.2 Blutproben und Messmethoden

Alle Blutentnahmen erfolgten vormittags in der Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie der LMU München. Die sofortige Weiterverarbeitung wurde im hauseigenen neurochemischen Forschungslabor durchgeführt. Die einheitlichen Abnahmezeiten und die direkte Weiterverarbeitung ohne langen Transportweg setzten für die anschließenden Untersuchungen standardisierte Bedingungen voraus. Unmittelbar nach der Blutentnahme wurden mononukleäre Zellen über die Ficoll-Paque-Zentrifugation isoliert. Dieses Verfahren hat sich in den letzten Jahren als Standardverfahren in der Labortechnik etabliert. Zu beachten ist, dass bei der manuellen Aufbereitung (Pipettieren, Waschvorgänge etc.) Anwendungsfehler unterlaufen können. Von diesen abgesehen, gewinnt man durch das Ficoll-Isolierverfahren ausreichend PBMC einschließlich hochqualitativer RNA und DNA (Corkum et al., 2015). Die Stimulation durch bakterielles LPS und virales poly(I:C) erfolgte im Anschluss für 24 Stunden bei 37°Celsius in Übereinstimmung mit vergleichbaren Studien (Grozdanov et al., 2014; Sathe & Reddy, 2014). Die Blutproben wurden daraufhin bei -80°Celsius gelagert. Die Bestimmung der Proteinkonzentration von cFos, MyD88, IRAK4, TOLLIP und TICAM1 erfolgte über den Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). Diese Methode ist das am häufigsten angewandte Nachweisverfahren für Proteine, Hormone und Antikörper. Wie in 4.1.1 bereits diskutiert, kann es nach einer längeren Lagerungszeit zur Denaturierung und Artefaktbildung kommen (Shabihkhani et al., 2014), was die Proteinkonzentration verzerren kann. Hinzu kommt, dass das Protein TOLLIP für

mehrere Proben unter der Nachweisgrenze lag. Voruntersuchungen zeigten bereits eine schwache Bindung des Proteins TOLLIP an die proteinspezifischen Antikörper. Die geringe Sensitivität der Antikörper führte zu einigen 0-Werten. Dennoch sind die Ergebnisse aussagekräftig, da bei hohen Proteinkonzentrationen Messwerte registriert werden konnten. Zudem ist die Verteilung der Proteinkonzentrationen von TOLLIP in den unterschiedlichen Versuchsansätzen mit den jeweiligen mRNA-Expressionen von TOLLIP vergleichbar, was für die Richtigkeit der ELISA-Auswertung spricht.

Für die Proteine TOLLIP und IRAK4 wurde zusätzlich die mRNA-Expression bestimmt. Dabei wurden wiederum drei Versuchsansätze (ohne Stimulation, LPS-Stimulation, poly(I:C)-Stimulation) jeweils für den Zeitpunkt Baseline und Follow-up untersucht. Die hierfür durchgeführte quantitative Echtzeit-PCR verfolgt kinetisch den Amplifizierungsprozess der cDNA und hat sich dadurch als bestes quantifizierbares Verfahren von Genmaterial bewährt. Durch ihre hohe Sensitivität ist dieses Verfahren jedoch anfällig für Anwendungsfehler (Wong & Medrano, 2005). Hinzu kommt, dass die verwendeten Proben nicht verunreinigt sein dürfen. Aus diesem Grund wurde die RNA-Qualität, wie in 2.6.2 beschrieben, auf ihre Reinheit getestet.

Unseres Wissens nach ist dies die erste Studie, die die Proteinkonzentration und mRNA-Expression der genannten Parameter in Zusammenhang mit Schizophrenie und der Toll-like Rezeptor Signalkaskade untersucht.

4.1.3 Statistik

Bei der Statistik wurde auf eine Korrektur für multiple Vergleiche verzichtet, da es sich um eine explorative Studie handelt. Dabei ist zu beachten, dass durch den Verzicht auf eine Korrektur für multiple Vergleiche die Ergebnisse kritisch zu betrachten sind. Die gewonnenen Resultate müssen mit Vorsicht interpretiert werden, sie geben jedoch die Möglichkeit, neue Hypothesen für dieses Forschungsthema aufzustellen. Das Ziel einer explorativen Studie ist es, unerforschte Themen zu betrachten und mögliche Auffälligkeiten zu diskutieren. Auf Basis dieser Ergebnisse kann anschließend eine konfirmatorische Studie angeschlossen werden. Durch den Verzicht auf eine Korrektur für multiple Vergleiche läuft man Gefahr, falsch positive (signifikante) Ergebnisse zu erhalten, da man die Fehlerwahrscheinlichkeit der Statistik außer Acht lässt. Daher muss bei der Diskussion verdeutlicht werden, dass signifikante Ergebnisse auch das Resultat einer Fehlerwahrscheinlichkeit sein

können. Dennoch ermöglichen die gewonnenen Erkenntnisse die Regulierung der Toll-like Rezeptor Signalkaskade bei Schizophrenie genauer zu betrachten. Zudem ist anzumerken, dass trotz der geringen Anzahl der Studienteilnehmer durchaus signifikante Unterschiede gemessen werden konnten. Bei hohen Fallzahlen können auch kleine Unterschiede signifikant werden, wohingegen die Unterschiede bei kleinen Stichproben deutlicher sein müssen, um ein signifikanten Wert zu bekommen. Auch nicht signifikante Ergebnisse können interpretiert werden.

4.2 Diskussion der Ergebnisse

4.2.1 Anamnestische Daten

Neben den Konzentrations- und Expressionsbestimmungen vor und nach Stimulation wurde auch der Einfluss von Neuroleptika (Medikationseffekt) auf diese Parameter hin untersucht. Deswegen waren für die weiteren Labortests vor allem die Infektanamnese und die Medikation interessant. Wie von den Ein- und Ausschlusskriterien gefordert, konnte für alle Teilnehmer der Studie eine systemische infektiöse oder inflammatorische Erkrankung innerhalb vier Wochen vor Studienteilnahme bzw. währenddessen ausgeschlossen werden. Somit kann angenommen werden, dass die Ergebnisse nicht durch eine bakterielle oder virale Infektion in vivo bei den Studienteilnehmer verzerrt wurden.

Um eine Einflussnahme der Neuroleptikatherapie auf die fokussierten Parameter zu untersuchen, war es von besonderer Bedeutung, dass die Patienten vor der Baseline-Untersuchung für mindestens sechs Wochen keine psychiatrischen Medikamente (mit Ausnahme von Lorazepam, Diazepam, Zopiclon und Zolpidem) einnahmen. Dies traf auf alle Patienten ausnahmslos zu. Dieser Umstand bekräftigt die Aussagekraft der Ergebnisse des Medikationseffekts. Eine Einflussnahme durch Medikamente, die auf das Immunsystem wirken (NSAID, Cortison, Immunsuppressiva), konnte aufgrund der Anamnese ebenfalls ausgeschlossen werden.

Die höheren Werte für die Häufigkeit des Nikotinkonsums in der Patientengruppe ($p=0,052$) wurde bei den Untersuchungen im Gruppenvergleich nicht berücksichtigt. Für die Korrelationsanalyse wurde der Nikotinkonsum der Patienten miteinbezogen. Der höhere Nikotinkonsum bei schizophrenen Patienten wurde bereits durch mehrere Studien bestätigt (Esterberg, Jones, Compton, & Walker, 2007; Strassnig,

Brar, & Ganguli, 2006). Zwei Patienten gaben an, in der Vergangenheit Cannabis konsumiert zu haben. Im Laufe des stationären Aufenthalts wurde eine Substanz-induzierte psychotische Störung (ICD.10: F1x.5) ausgeschlossen. Die Patienten wurden daher nicht aus der Studie ausgeschlossen.

Die Gesamtpunktzahl der PANSS zeigte bei allen Patienten eine Besserung von mindestens 30% nach medikamentöser Therapie. Somit wurde das Kriterium für die Therapieresponse bei allen Patienten für die Follow-up-Untersuchung erreicht. Das durch die Cohen's Perceived Stress Scale gemessene Stressempfinden fiel, wie zu erwarten, bei der Patientengruppe signifikant höher aus. Erhöhtes Stressempfinden bei schizophrenen Patienten kann auch durch signifikant höhere Cortisolwerte im Blut nach Stresssituationen nachgewiesen werden (Chiappelli et al., 2016). Nach Medikamenteneinnahme stellte sich zwar eine durchschnittliche Besserung von 16,65% ein, jedoch war der Mittelwert der Follow-up-Untersuchung im Vergleich zur Kontrollgruppe immer noch signifikant höher. Die Bewertung der PSS für die Follow-up-Untersuchung fand meistens während des stationären Aufenthalts oder kurz nach Entlassung statt. Die psychische Erkrankung und die damit verbundenen Umstände stellten für die meisten Patienten einen deutlichen Stressor dar. Um einen deutlicheren Therapieeffekt, gemessen an der Perceived Stress Scale, zu sehen, müsste das Stressempfinden längerfristig und in gewohnten Lebenssituationen eingeschätzt werden.

4.2.2 Proteinkonzentration und mRNA-Expression ohne Stimulation

Die Toll-like Rezeptoren sind in den letzten Jahren vermehrt in den Fokus der Schizophrenieforschung gerückt. Nachdem man erhöhte Expressionen von monozytären Zytokinen (IL-1, IL-6, TNF- α) bei schizophrenen Patienten feststellte (Drexhage, van der Heul-Nieuwenhuijsen, et al., 2010), folgten Studien, die Toll-like Rezeptoren bei schizophrenen Patienten untersuchten. Eine weitere Studie, die durch molekulare Pathway Analysis mit Schizophrenie in Verbindung gesehene Genloci untersuchte, sah auch einen Zusammenhang mit den Schizophrenie assoziierten Genloci und denen für Toll-like Rezeptoren (Crisafulli, Drago, Calabro, Spina, & Serretti, 2015). TLRs können nach Stimulierung durch LPS und poly(I:C), aber auch durch endogene Liganden über eine komplexe Signalkaskade den Transkriptionsfaktor NF κ B aktivieren. Durch seine Aktivierung werden vermehrt Zytokine transkribiert. Hierzu gehören auch Interleukin-1, Interleukin-6 und der

Tumornekrosefaktor- α (Akira, 2009). Um eine mögliche Dysfunktion dieses Signalwegs zu erforschen, wurden für diese Studie Proteine untersucht, die an dieser Signalkaskade beteiligt sind. Dabei haben MyD88, IRAK4 und TICAM einen aktivierenden Effekt (Akira, 2009; Ullah et al., 2013), TOLLIP hingegen einen hemmenden. TOLLIP kann mit dem aktivierenden Protein IRAK4 einen Komplex eingehen und somit den weiteren Signalweg unterbrechen. Dadurch kommt es zu einer geringeren Transkription von Zytokinen durch NF κ B (Burns et al., 2000; Zhang & Ghosh, 2002).

Proteinkonzentration

Betrachtet man die Proteinkonzentrationen zwischen Patienten und Kontrollen ohne Stimulation, zeigten die Ergebnisse der Baseline-Untersuchung für MyD88, IRAK4, cFOS, TICAM1 und TOLLIP im Gruppenvergleich mittels t-Tests keine signifikanten Unterschiede. Bei TOLLIP und IRAK4 konnte man zum Zeitpunkt Follow-up leicht, jedoch nicht signifikant, niedrigere Werte für die Patientengruppe (je $p=0,118$) im Vergleich zur Kontrollgruppe feststellen. Die niedrigeren Proteinkonzentrationen von TOLLIP und IRAK4 in der Patientengruppe bei der Follow-up-Untersuchung entsprechen den Ergebnissen der mRNA-Expression.

mRNA-Expression

Die mRNA-Expression von IRAK4 und TOLLIP waren in der Baseline-Untersuchung annähernd identisch im Vergleich zwischen den Gruppen. Zur Follow-up-Untersuchung ergab sich eine signifikant niedrigere mRNA-Expression von IRAK4 für die Patientengruppe ($p=0,018$). Womöglich besteht ein Zusammenhang zwischen der medikamentösen Therapie mit Neuroleptika und der mRNA-Expression. Die niedrigere Expression von IRAK4 ohne Stimulation nach Medikation müsste bei den Patienten schließlich auch zu einer geringeren Zytokintranskription über den TLR-Signalweg führen und somit zu einer geringeren Ausschüttung. Erhöhte Zytokinkonzentrationen bei schizophrenen Patienten ohne Medikation konnten in der Studie von Potvin (Potvin et al., 2008){Potvin, 2008 #124;Upthegrove, 2014 #139} für die Zytokine L-1RA, sIL-2R, und IL-6 nachgewiesen werden. Ein Review von Upthegrove (Upthegrove, Manzanares-Teson, & Barnes, 2014) über 23 unabhängige Studien, die zusammen 570 Patientenfälle (Einschlusskriterien: erste psychotische Phase einer Schizophrenie, unmediziert) und 683 gesunden Kontrollpersonen

umfassen, zeigt ebenfalls signifikant höhere Werte in der Patientengruppe für die Zytokine sIL-2R und IL-6, hinzukommend IL-1 β und TNF- α . Durch die medikamentöse Therapie könnte sich die Zytokinproduktion über NF κ B nach unten reguliert haben, indem das aktivierende Proteine IRAK4 geringer exprimiert wird. Die Metaanalyse von Miller (Miller, Buckley, Seabolt, Mellor, & Kirkpatrick, 2011) fasst 40 Studien zusammen, die den Zusammenhang zwischen dem Zytokinlevel bei Schizophrenie und dem Einfluss von antipsychotischer Behandlung untersucht haben. Dabei zeigen die erhöhten Werte von IL-1 β , IL-6 und TGF- β während einer akuten Exazerbation eine Normalsierung nach antipsychotischer Behandlung. Wohingegen IL-12, IFN- γ , TNF- α und sIL-2R sowohl während akuter Symptome als auch nach medikamentöser Behandlung erhöht bleiben. Unser Ergebnis ist dennoch kritisch zu betrachten, da der signifikante Unterschied nicht nur aus dem gesunkenen Wert der mRNA-Expression von IRAK4 nach Medikation resultiert, sondern auch aus der Variabilität der Expression in der Kontrollgruppe. Die gesunden Probanden hatten zur Follow-up-Untersuchung keine Medikamente eingenommen, somit sollte der Mittelwert in der Kontrollgruppe zwischen Baseline und Follow-up annähernd gleich sein. Der statistische Vergleich vor und nach Medikation in der Patientengruppe (Medikationseffekt) führte zu keinem signifikanten Unterschied für IRAK4. Die mRNA-Expression von TOLLIP zeigt wie für die Proteinkonzentration in der Follow-up-Untersuchung niedrigere Werte ($p=0,128$) für die Patientengruppe. TOLLIP hat in der TLR-Signalkaskade eine hemmende Funktion (Burns et al., 2000; Zhang & Ghosh, 2002). Eine geringere mRNA-Expression führt somit zu einer verminderten Hemmung des TLR-Signalwegs und die Herunterregulierung der Zytokinproduktion ist dadurch beeinträchtigt. Wie oben beschrieben, führt ein niedriger Wert an IRAK4 zu einer niedrigeren Zytokinausschüttung, somit wäre die hemmende Wirkung von TOLLIP weniger benötigt und so ließen sich die geringere mRNA-Expression von TOLLIP erklären. Die Resultate aus den Gruppenvergleichen für TOLLIP-mRNA zeigen keine Signifikanz, bei IRAK4-mRNA zeigt sich hingegen ein signifikanter Unterschied ($p=0,018$). Demzufolge kann die erniedrigte mRNA-Expression von IRAK4 nach Medikation als möglicher immunmodulatorischer Effekt betrachtet werden, der die proinflammatorische Zytokinausschüttung verringert. Die Ergebnisse der mRNA-Expression sind dennoch auch kritisch zu betrachten, da zum einen bei der statistischen Auswertung auf eine Korrektur für multiple Vergleiche

verzichtet wurde, zum anderen die Gruppengrößen klein sind. Jedoch zeigen sich trotz des kleinen Studienkollektivs signifikante Unterschiede.

4.2.3 Proteinkonzentration und mRNA-Expression nach Stimulation

Die in vitro-Stimulation durch Lipopolysaccharide und poly(I:C) soll Aufschluss geben, ob das Immunsystem schizophrener Patienten bei einer nachgeahmten Infektion die gleiche Regulation durchläuft, wie bei den gesunden Kontrollpersonen. Dabei wurden die Proteinkonzentrationen und mRNA-Expressionen nach Stimulation (LPS bzw. poly(I:C)) zwischen Patienten und Kontrollen verglichen. Zusätzlich wurden Stimulationseffekte berechnet (stimuliert - unstimuliert), welche zwischen Patientengruppe und Kontrollgruppe mittels t-Tests und Regressionsanalyse untersucht wurden.

Virales poly(I:C): Proteinkonzentration

Der Versuchsansatz „Protein TOLLIP, poly(I:C)-stimuliert, Baseline“ zeigte einen niedrigeren Wert ($p=0,093$) für die Patientengruppe. Nach Medikation war der Mittelwert der Proteinkonzentration von TOLLIP nach poly(I:C)-Stimulation signifikant niedriger ($p=0,046$) in der Patientengruppe. Die Stimulation durch poly(I:C) imitiert eine virale Infektion, wobei Toll-like Rezeptoren poly(I:C) als Liganden binden und stimuliert werden. Dadurch wird die TLR-Signalkaskade aktiviert und es kommt zu einer erhöhten Ausschüttung von Zytokinen (Akira, 2009). Das Protein TOLLIP hat hierbei eine hemmende Wirkung. Um eine überschießende Immunantwort zu verhindern, unterbricht es die Weiterleitung der Signalkaskade und dient so als Gegenregulator zu einer Immunreaktion (Zhang & Ghosh, 2002). Die signifikant niedrigere Proteinkonzentration von TOLLIP bei schizophrenen Patienten nach Stimulation kann ein Hinweis auf eine Fehlregulation der Immunantwort sein. Durch die geringere Konzentration von TOLLIP, könnte bei einer viralen Infektion die Immunantwort stärker ausfallen als bei gesunden Kontrollpersonen. Diese Hypothese könnte auch die höheren Zytokinwerte bei Schizophrenie (Drexhage, Knijff, et al., 2010; Muller & Schwarz, 2010; Muller, Weidinger, Leitner, & Schwarz, 2015; Rothermundt et al., 2001) erklären. Die Aussagekraft der Proteinkonzentrationen ist hier jedoch fraglich, da bei dem ELISA-Versuch etliche 0-Werte registriert wurden. Die geringe Bindungsaffinität des TOLLIP-Proteins an den Antikörper kann ein Grund dafür sein. Die Ergebnisse der mRNA-Expression von

TOLLIP nach poly(I:C)-Stimulation zeigen jedoch auch niedrigere Werte in der Patientengruppe und sprechen somit gegen ein methodisches Artefakt und für eine reale niedrige Konzentration (siehe hierfür nachfolgenden Absatz „Virales poly(I:C): mRNA-Expression“). Die Stimulierbarkeit des Proteins TOLLIP durch poly(I:C) unterschied sich ebenfalls deutlich im Gruppenvergleich. Die Mittelwertwerte des Stimulationseffekts in der Patientengruppe waren für beide Zeitpunkte niedriger. Zur Baseline-Untersuchung zeigte sich schließlich ein niedrigerer Stimulationseffekt für die Patientengruppe ($p=0,094$). Die Regressionsanalyse zeigte ebenfalls, dass der Faktor Schizophrenie die Stimulierbarkeit von TOLLIP durch poly(I:C) negativ beeinflusst. In der Follow-up-Untersuchung war der Stimulationseffekt immer noch geringer im Vergleich zur Kontrollgruppen, jedoch ohne Signifikanz ($p=0,239$). Der geringere Stimulationseffekt auf das Protein TOLLIP bei schizophrenen Patienten könnte eine mögliche Ursache bei der Fehlregulation in der TLR-Signalkaskade sein. Obwohl TOLLIP für die Hemmung der Immunantwort über das TLR-System verantwortlich ist, steigt nach viraler und bakterieller Stimulation der TLR-Rezeptoren neben den aktivierenden Proteinen der TLR-Signalkaskade auch das hemmende Protein TOLLIP. Somit kann insbesondere in der Spätphase einer Immunantwort die Zytokinproduktion gehemmt werden und eine überschießende Immunreaktion verhindert werden (Liu et al., 2015). Eine überhöhte TLR-Aktivität kann schließlich das immunologische Gleichgewicht stören und könnte so für die Entstehung von Autoimmunkrankheiten und entzündlichen Krankheiten verantwortlich sein (Kondo, Kawai, & Akira, 2012). Die niedrigere Konzentration von TOLLIP kann somit in Zusammenhang mit einer erhöhten Zytokinkonzentration stehen. Erhöhte Zytokinwerte, insbesondere IFN- γ , TNF- α , IL-1 und IL-6, steigern wiederum die Indolamin-2,3-Dioxygenase-Aktivität. Dadurch kommt es zu einem vermehrten Abbau von Tryptophan zu Kynurenin (Schrocksadel et al., 2006). Der auf diese Weise induzierte Tryptophan-Mangel wirkt sich negativ auf die Serotonin-Synthese aus und kann somit depressive Symptome auslösen (Merens et al., 2008) (siehe hierfür auch 1.3). Zudem entstehen aufgrund der proinflammatorischen Immunlage Stoffwechselprodukte des Kynureninmetabolismus (z.B. erhöhter Bildung von Kynureninsäure), die sowohl zur Positivsymptomatik als auch Negativsymptomatik und kognitive Defizite, wie sie sich in einer Schizophrenie äußern, führen (Capuron & Miller, 2011).

Virales Poly(I:C): mRNA-Expression

Die Ergebnisse der mRNA-Expression unterstützen die Aussage der ELISA-Auswertung. Der Versuchsansatz „mRNA, TOLLIP, poly(I:C), Baseline“ zeigt im Mittelwertvergleich eine niedrigere mRNA-Expression in der Patientengruppe, jedoch ohne Signifikanz. Bei dem Versuchsansatz „mRNA, TOLLIP, poly(I:C), Follow-up“ wurde in der Patientengruppe eine mit Tendenz zur Signifikanz niedrigere Expression der mRNA von TOLLIP ($p=0,063$) ermittelt. Der berechnete Stimulationseffekt durch poly(I:C) zeigt im Vergleich ebenfalls einen niedrigeren Wert für die Patientengruppe in der Follow-up-Untersuchung ($p=0,073$). Eine geringere mRNA-Expression von TOLLIP nach einer viralen Infektion führt somit zu einer höheren Aktivierung von NF κ B im Vergleich zu den gesunden Kontrollpersonen. Dies wiederum beeinflusst eine vermehrte Ausschüttung durch NF κ B transkribierter proinflammatorischer Zytokine. Die Auswertung der mRNA-Expression von IRAK4 von schizophrenen Patienten und Kontrollen zeigte keine signifikanten Unterschiede oder Tendenzen.

Bakterielles Lipopolysaccharid: Proteinkonzentration

Über die Auswertungen der Proteinkonzentrationen nach einer in vitro-LPS-Stimulation lässt sich für keinen der untersuchten Parameter eine richtungsweisende Aussage treffen. Die Analyse der Stimulationseffekt konnte keine unserer Annahmen bekräftigen oder verwerfen.

Bakterielles Lipopolysaccharid: mRNA-Expression

Nach Stimulation durch bakterielles Lipopolysaccharid war die mRNA-Expression von TOLLIP in der Baseline-Untersuchung für die Patientengruppe niedriger als in der Kontrollgruppe. In der Follow-up-Untersuchung zeigte die statistische Auswertung eine signifikant niedrigere mRNA-Expression von TOLLIP bei den schizophrenen Patienten ($p=0,007$). Zudem war der ermittelte Stimulationseffekt auf die mRNA-Expression von TOLLIP durch bakterielles Lipopolysaccharid in der Patientengruppe geringer. Zum Zeitpunkt des Follow-up waren die Stimulationswerte der Patienten signifikant niedriger ($p=0,019$). Die in vitro nachgeahmte bakterielle Infektion löst in der gesunden Kontrollgruppe zu beiden Zeitpunkten einen deutlichen Anstieg der mRNA-Expression von TOLLIP aus. Wie bereits beschrieben, hat das hemmende Protein TOLLIP eine regulatorische Funktion in der TLR-Signalkaskade. Die niedrigere mRNA-Expression von TOLLIP in der Patientengruppe nach der

durchgeführten in vitro-Stimulation durch LPS lässt, wie schon nach der poly(I:C)-Stimulation, ein Fehlregulation der TLR-Signalkaskade vermuten und könnte eine höhere Ausschüttung von Zytokinen verursachen. Die mRNA-Expression des Proteins IRAK4 war nach LPS-Stimulation zum Zeitpunkt Follow-up für die Patientengruppe signifikant niedriger ($p=0,047$). IRAK4 hat im Gegensatz zu TOLLIP einen aktivierenden Effekt auf NF κ B und auf den mitogen-activated protein Kinase-Weg (MAP-Kinase-Weg) (Li, Strelow, Fontana, & Wesche, 2002). Eine geringere mRNA-Expression von IRAK4 führt schließlich zu einer geringeren Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen und einer verminderten Immunreaktion. Für die Proteinkonzentration von IRAK4 hingegen wurde in dem gleichen Versuchsansatz ein höherer Wert (ohne Signifikanz) für die Patientengruppe gemessen. In dem Zusammenhang muss diskutiert werden, inwiefern die exprimierte mRNA eine Aussagekraft auf die Menge der exprimierten Proteine hat. Guo et al. untersuchte in seiner Studie die Korrelation von 71 exprimierten Proteinen und den korrespondierenden exprimierten mRNAs. Die Ergebnisse zeigten, dass es für gewisse Gene eine hoch signifikante Korrelation zwischen exprimierter mRNA und exprimierten Proteinen gibt. Für andere Gene hingegen war der Zusammenhang weniger eindeutig. Schließlich wirken die exprimierten IRAK4-Proteine direkt in der TLR-Signalkaskade mit. Diese waren in der Patientengruppe etwas höher. Somit kann nicht von einer niedrigeren Zytokinausschüttung bei den Patienten aufgrund geringerer IRAK4-mRNA-Expression ausgegangen werden. Die unterschiedliche Verteilung von Proteinkonzentration und mRNA-Expression des Proteins IRAK4 nach LPS-Stimulation in der Patientengruppe könnte auch auf Messabweichungen zurückzuführen sein (siehe 4.1.2).

4.2.4 Medikationseffekt

Der Vergleich der Proteinkonzentrationen, mRNA-Expressionen und Stimulationseffekt vor Medikation und nach Medikation in der Patientengruppe führte zu keinen aussagekräftigen Unterschieden. Allein die Stimulierbarkeit durch bakterielles Lipopolysaccharid auf die Proteinkonzentration von cFOS zeigte nach Medikation einen Anstieg ($p=0,082$). Dieses Protein ist Teil des Aktivator-Protein-1, kurz AP-1, welches Gen-Expressionen nach bestimmten Stimuli (Zytokine, Wachstumsfaktoren, Infektionen) reguliert (Hess, Angel, & Schorpp-Kistner, 2004). Es wird angenommen, dass c-FOS die Zellproliferation über AP-1 beeinflusst

(Watanabe et al., 2013). Der Anstieg der Stimulierbarkeit nach Neuroleptikaeinnahme lässt eine Einflussnahme der medikamentösen Behandlung auf den AP-1-Signalweg vermuten. Der zeitliche Abstand zwischen den zwei Blutabnahmen und somit die medikamentöse Therapie, betragen vier bis sechs Wochen. Um einen nachweisbaren Einfluss messen zu können, sollte man womöglich einen größeren zeitlichen Abstand wählen. Geht man davon aus, dass die verwendeten Antipsychotika keinen Einfluss auf den hypothetisch fehlregulierten TLR-Signalweg haben, könnte man den medikamentösen Therapieansatz für schizophrene Patienten erweitern. Auf dieser Grundlage wurden bereits Therapiekonzepte entwickelt. So konnte in einer randomisierten, placebokontrollierten Doppelblindstudie mit 49 schizophrenen Patienten ein signifikant besseres Ergebnis für die Gruppe erzielt werden, die zur herkömmlichen Amisulpridbehandlung (atypisches Neuroleptikum) zusätzlich mit dem Cyclooxygenase-2-Hemmer Celecoxib, der die Produktion von Kynureninsäure verringern soll (Muller et al., 2011), behandelt wurden. Die andere Gruppe wurde ausschließlich mit Amisulprid therapiert (Muller et al., 2010). Außerdem zeigten Gruber, Bunse, Weidinger, Reichard, and Muller (2014) in einer Studie, dass eine adjuvante Interferon Gamma-1b Therapie bei zwei therapieresistenten schizophrenen Patienten zu einer Verbesserung der Symptome führte. Diese Therapieansätze könnten als Möglichkeiten gesehen werden, Patienten zu behandeln, die unzulänglich auf die herkömmliche medikamentöse Therapie ansprechen.

4.2.5 Korrelationsanalyse

Es bestand kein signifikanter Zusammenhang zwischen den signifikanten Messwerten und den anamnestischen Parametern wie Alter und klinischer Schweregrad der Erkrankung (PANSS). Aufgrund der kleinen Stichprobengröße (n=9) ist die Aussagekraft dieser Analyse kritisch zu betrachten. Um Zusammenhänge wie etwa Alter (entspricht hier gleich dem Erkrankungsbeginn), Erkrankungsdauer, aber auch Schweregrad der Erkrankung zu überprüfen, müsste die Fallzahl vergrößert und der weitere Verlauf der Krankheit über Monate oder Jahre hinweg kontrolliert werden.

4.3 Zusammenfassende Interpretation und Ausblick

Diese Studie vergleicht Proteinkonzentrationen, mRNA-Expressionen und Stimulationseffekte bestimmter Proteine der TLR-Signalkaskade zwischen einer schizophrenen Patientengruppe und einer gesunden Kontrollgruppe. Die signifikanten Ergebnisse der statistischen Auswertung müssen jedoch kritisch betrachtet werden, da, aufgrund der explorativen Auslegung der Studie, anschließend keine Korrekturen für multiples Testen durchgeführt wurden. Die Ergebnisse der Proteine TOLLIP und IRAK4 aus den Vergleichsanalysen haben durchaus richtungsweisende Tendenzen und zum Teil signifikante Resultate gezeigt, wohingegen die Ergebnisse der Proteine MyD88, TICAM1 und cFOS in dieser Studie keine Gruppenunterschiede zeigten und für die weitere Interpretation nicht mit eingeschlossen wurden. Nach in vitro-Stimulation zeigte die Proteinkonzentration und die mRNA-Expression von TOLLIP auffällige Unterschiede zwischen den Gruppen. Das Protein TOLLIP ist nachweislich für die Hemmung der TLR-Signalkaskade entscheidend (Kondo et al., 2012; Liu et al., 2015; Steenholdt, Andresen, Pedersen, Hansen, & Brynskov, 2009). Nach einer Infektion ist es im TLR-Signalweg dafür verantwortlich, die Immunantwort wieder zu regulieren und eine überschießende Immunreaktion zu kontrollieren. Die Ergebnisse unserer Studie lassen die Hypothese aufstellen, dass Proteinkonzentration und mRNA-Expression des Proteins TOLLIP nach Infektionen geringer sind als bei gesunden Probanden. Dies könnte zu einer erhöhten Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine über den Transkriptionsfaktor NF κ B führen. Eine erhöhte Zytokinkonzentration lässt dieIDO-Aktivität ansteigen, welche über den Abbau von Tryptophan zu einer gesteigerten Konzentration von Kynureninsäure führt. Diese wirkt als NMDA-Antagonist und stört somit die Glutamat-NMDA-Rezeptor-Stimulation (Muller et al., 2011). Des Weiteren wirkt Kynureninsäure als α 7nACh-Rezeptor-Antagonist, was zu kognitiven Defiziten, wie sie bei einer Schizophrenieerkrankung beschrieben werden, führt (Young & Geyer, 2013). Um bessere Aussagen treffen zu können, gilt es in nachfolgenden Studien das Studienkollektiv zu vergrößern. Man könnte auch mehrere unterschiedliche Parameter parallel messen, zum Beispiel TOLLIP-Expression, Zytokinlevel und Kynureninkonzentration, und diese mit einer gesunden Kontrollgruppe vergleichen. Da in unserer Studie keine Auswirkung der Medikation mit Neuroleptika auf die TLR-Signalkaskade nachgewiesen werden konnte, könnte eine Vergleichsstudie zwischen Patienten unterschiedlicher Medikation (Neuroleptika

vs. Neuroleptika mit adjuvanter Interferon gamma-1b Therapie) Aufschluss über deren Effekt auf bestimmte Parameter (Zytokinlevel, TOLLIP, Kynureninkonzentration) geben. Eine fortführende forcierte Forschung auf diesem Gebiet der Psychoneuroimmunologie ist für die betroffenen Patienten von großer Bedeutung, da vor allem die Aufklärung der Ätiologie neue Therapieansätze ermöglicht.

5 Zusammenfassung

Zahlreiche Studien unterstützen die Annahme, dass das Immunsystem einen wichtigen Ausgangspunkt in der Ätiologie der Schizophrenie einnimmt. Veränderte Toll-like Rezeptor-Expressionen und erhöhte Zytokinwerte bei schizophrenen Patienten haben den Anlass gegeben, Proteine der TLR-Signalkaskade zu untersuchen. In unserer explorativen Fall-Kontroll-Studie wurde das Blut von neun schizophrenen Patienten vor medikamentöser Behandlung und unter medikamentöser Behandlung (Neuroleptika) untersucht. Hinzu kamen neun geschlechts- und altersangepasste Kontrollpersonen, die bei beiden Blutabnahmen unmediziert waren. Aus den isolierten mononukleären Zellen des peripheren Blutes, kurz PBMC, wurden sowohl die Proteinkonzentrationen von MyD88, TICAM1, IRAK4, TOLLIP und cFOS als auch die mRNA-Expressionen von IRAK4 und TOLLIP vergleichend bestimmt. Um den Einfluss von Infektionen auf die Regulierung der TLR-Signalkaskade und ihrer Proteine zu testen, wurden Proben mit bakteriellem Lipopolysaccharid und viralem poly(I:C) in vitro stimuliert und bei 37°Celsius für 24 Stunden im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die unstimulierten und die stimulierten Konzentrationen der Proteine und die mRNA-Expressionen betrachtet. Zusätzlich wurde die Veränderung der einzelnen Werte vor und nach Stimulation berechnet (Stimulationseffekt) und verglichen. Durch den Vergleich der Patientenwerte vor und nach Medikation sollte die Auswirkung von Neuroleptika auf die TLR-Signalkaskade untersucht werden (Medikationseffekt). Zusammenhänge zwischen anamnestischen Parametern und signifikanten Messwerten wurden mittels Korrelationsanalyse geprüft.

Es zeigten sich für das Protein TOLLIP im unstimulierten Zustand keine niedrigeren Werte in der Proteinkonzentration bzw. in der mRNA-Expression der schizophrenen Patienten im Vergleich zu den gesunden Kontrollen. Nach in vitro-Stimulation durch poly(I:C) war sowohl die Proteinkonzentration bei den schizophrenen Patienten niedriger ($p=0,046$) als auch die mRNA-Expression ($p=0,063$). Der Stimulationseffekt war somit in der Patientengruppe schwächer (Proteinkonzentration $p=0,094$; mRNA-Expression $p=0,073$). Die Stimulation mit bakteriellem Lipopolysaccharid zeigte gleichfalls niedrigere Werte in der Patientengruppe, in der mRNA-Expression mit einer deutlichen Signifikanz ($p=0,007$). Der berechnete Stimulationseffekt war in der Patientengruppe ebenfalls geringer ($p=0,019$). Die mRNA-Expression des Proteins

IRAK4 war zum Zeitpunkt Follow-up für die Patientengruppe niedriger ($p=0,018$). Die Ergebnisse nach Stimulation zeigten keine signifikanten Unterschiede. Die Tests bezüglich Medikationseffekt und Korrelationsanalyse zwischen anamnestischen Parametern und signifikanten Messwerten konnten keine relevanten Resultate liefern, allerdings ist dabei immer die sehr geringe Stichprobengröße in Betracht zu ziehen.

Die Ergebnisse dieser Studie lassen eine gestörte Immunantwort auf Höhe der TLR-Signalkaskade nach viraler und bakterieller Infektion bei schizophrenen Patienten vermuten. Hierbei könnte das hemmende Protein TOLLIP eine zentrale pathophysiologische Rolle spielen. Die verringerte Expression von TOLLIP nach infektiösen Stimuli führt somit zu einer erhöhten Zytokinausschüttung über die TLR-Signalkaskade. Der Zusammenhang zwischen Psyche, Nervensystem und Immunsystem wird weiterhin ein wichtiges Forschungsgebiet für die Klärung der Ätiologie der Schizophrenie sein.

6 Literaturverzeichnis

- Abbas, A. K., Murphy, K. M., & Sher, A. (2005). Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature*, 383(6603), 787-793.
- Abi-Dargham, A. (2004). Do we still believe in the dopamine hypothesis? New data bring new evidence. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, 7(Suppl. 1), S1-S5.
- Agerbo, E., Sullivan, P. F., Vilhjalmsen, B. J., Pedersen, C. B., Mors, O., Borglum, A. D., . . . Mortensen, P. B. (2015). Polygenic Risk Score, Parental Socioeconomic Status, Family History of Psychiatric Disorders, and the Risk for Schizophrenia: A Danish Population-Based Study and Meta-analysis. *JAMA Psychiatry*, 72(7), 635-641.
- Akhondzadeh, S., Tabatabaee, M., Amini, H., Ahmadi Abhari, S. A., Abbasi, S. H., & Behnam, B. (2007). Celecoxib as adjunctive therapy in schizophrenia: a double-blind, randomized and placebo-controlled trial. *Schizophr Res*, 90(1-3), 179-185.
- Akira, S. (2009). Pathogen recognition by innate immunity and its signaling. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*, 85(4), 143-156.
- Anderson, K. V. (2000). Toll signaling pathways in the innate immune response. *Curr Opin Immunol*, 12(1), 13-19.
- Andreasen, N. C., Nopoulos, P., Schultz, S., Miller, D., Gupta, S., Swayze, V., & Flaum, M. (1994). Positive and negative symptoms of schizophrenia: Past, present, and future. *Acta Psychiatrica Scandinavica*, 90(SUPPL. 384), 51-59.
- Beutler, B. (2004). Inferences, questions and possibilities in Toll-like receptor signalling. *Nature*, 430(6996), 257-263.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1), 248-254.
- Burns, K., Clatworthy, J., Martin, L., Martinon, F., Plumpton, C., Maschera, B., . . . Volpe, F. (2000). Tollip, a new component of the IL-1RI pathway, links IRAK to the IL-1 receptor. *Nat Cell Biol*, 2(6), 346-351.

- Capuron, L., & Miller, A. H. (2011). Immune system to brain signaling: Neuropsychopharmacological implications. *Pharmacology & Therapeutics*, *130*(2), 226-238.
- Chiappelli, J., Shi, Q., Kodi, P., Savransky, A., Kochunov, P., Rowland, L. M., . . . Hong, L. E. (2016). Disrupted glucocorticoid--Immune interactions during stress response in schizophrenia. *Psychoneuroendocrinology*, *63*, 86-93.
- Corkum, C. P., Ings, D. P., Burgess, C., Karwowska, S., Kroll, W., & Michalak, T. I. (2015). Immune cell subsets and their gene expression profiles from human PBMC isolated by Vacutainer Cell Preparation Tube (CPT) and standard density gradient. *BMC Immunol*, *16*, 48.
- Crisafulli, C., Drago, A., Calabro, M., Spina, E., & Serretti, A. (2015). A molecular pathway analysis informs the genetic background at risk for schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, *59*, 21-30.
- Davies, J. M. (1997). Molecular mimicry: can epitope mimicry induce autoimmune disease? *Immunol Cell Biol*, *75*(2), 113-126.
- Davis, K. L., Kahn, R. S., Ko, G., & Davidson, M. (1991). Dopamine in Schizophrenia a Review and Reconceptualization. *American Journal of Psychiatry*, *148*(11), 1474-1486.
- Dilling. (2005). *Internationale Klassifikation psychischer Störungen. ICD 10*: Hans Huber.
- Drexhage, R. C., Knijff, E. M., Padmos, R. C., Van Der Heul-Nieuwenhuijzen, L., Beumer, W., Versnel, M. A., & Drexhage, H. A. (2010). The mononuclear phagocyte system and its cytokine inflammatory networks in schizophrenia and bipolar disorder. *Expert Review of Neurotherapeutics*, *10*(1), 59-76.
- Drexhage, R. C., van der Heul-Nieuwenhuijzen, L., Padmos, R. C., van Beveren, N., Cohen, D., Versnel, M. A., . . . Drexhage, H. A. (2010). Inflammatory gene expression in monocytes of patients with schizophrenia: overlap and difference with bipolar disorder. A study in naturalistically treated patients. *Int J Neuropsychopharmacol*, *13*(10), 1369-1381.
- Edelman, G. M. (1991). Antibody Structure and Molecular Immunology. *Scandinavian Journal of Immunology*, *34*(1), 4-22.

Esterberg, M. L., Jones, E. M., Compton, M. T., & Walker, E. F. (2007). Nicotine consumption and schizotypy in first-degree relatives of individuals with schizophrenia and non-psychiatric controls. *Schizophr Res*, 97(1-3), 6-13.

Flint, S. J. (2009). *Principles of virology*. Washington, DC: ASM Press.

Gay, N. J., & Gangloff, M. (2007). Structure and function of toll receptors and their Ligands. *Annual Review of Biochemistry*, 76, 141-165.

Germain, R. N. (1994). MHC-dependent antigen processing and peptide presentation: Providing ligands for T lymphocyte activation. *Cell*, 76(2), 287-299.

Goutagny, N., & Fitzgerald, K. A. (2006). Pattern recognition receptors: an update. *Expert Rev Clin Immunol*, 2(4), 569-583.

Grozdanov, V., Bliederaeuser, C., Ruf, W. P., Roth, V., Fundel-Clemens, K., Zondler, L., . . . Danzer, K. M. (2014). Inflammatory dysregulation of blood monocytes in Parkinson's disease patients. *Acta Neuropathologica*, 128(5), 651-663.

Gruber, L., Bunse, T., Weidinger, E., Reichard, H., & Muller, N. (2014). Adjunctive recombinant human interferon gamma-1b for treatment-resistant schizophrenia in 2 patients. *Journal of Clinical Psychiatry*, 75(11), 1266-1267.

Guo, Y., Xiao, P., Lei, S., Deng, F., Xiao, G. G., Liu, Y., . . . Deng, H. How is mRNA expression predictive for protein expression? A correlation study on human circulating monocytes. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 40(5), 426-436.

Hafner, H. (2015). What is schizophrenia? 25 years of research into schizophrenia - the Age Beginning Course Study. *World J Psychiatry*, 5(2), 167-169.

Heine, H., & Lien, E. (2003). Toll-like receptors and their function in innate and adaptive immunity. *Int Arch Allergy Immunol*, 130(3), 180-192.

Hess, J., Angel, P., & Schorpp-Kistner, M. (2004). AP-1 subunits: quarrel and harmony among siblings. *J Cell Sci*, 117(Pt 25), 5965-5973.

Janeway, C. (2005). *Immunobiology*. New York, NY [u.a.]: Garland Science.

- Kondo, T., Kawai, T., & Akira, S. (2012). Dissecting negative regulation of Toll-like receptor signaling. *Trends in Immunology*, 33(9), 449-458.
- Kyziridis, T. C. (2005). Notes on the history of schizophrenia. *German Journal of Psychiatry*, 8(3), 42-48.
- Leucht, S., Corves, C., Arbter, D., Engel, R. R., Li, C., & Davis, J. M. (2009). Second-generation versus first-generation antipsychotic drugs for schizophrenia: a meta-analysis. *Lancet*, 373(9657), 31-41.
- Li, S., Strelow, A., Fontana, E. J., & Wesche, H. (2002). IRAK-4: a novel member of the IRAK family with the properties of an IRAK-kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(8), 5567-5572.
- Liu, Y., Zhang, Q., Ding, Y., Li, X., Zhao, D., Zhao, K., . . . Cao, X. (2015). Histone lysine methyltransferase Ezh1 promotes TLR-triggered inflammatory cytokine production by suppressing Tollip. *J Immunol*, 194(6), 2838-2846.
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25(4), 402-408.
- Ljunggren, H.-G., & Kärre, K. (1990). In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition. *Immunology Today*, 11, 237-244.
- Maatz, A., Hoff, P., & Angst, J. (2015). Eugen Bleuler's schizophrenia--a modern perspective. *Dialogues Clin Neurosci*, 17(1), 43-49.
- Martin, M. U., & Resch, K. (2009). *Immunologie*. Stuttgart: UTB
- Merens, W., Booij, L., Haffmans, P. J., & van der Does, A. (2008). The effects of experimentally lowered serotonin function on emotional information processing and memory in remitted depressed patients. *J Psychopharmacol*, 22(6), 653-662.
- Miller, B. J., Buckley, P., Seabolt, W., Mellor, A., & Kirkpatrick, B. (2011). Meta-analysis of cytokine alterations in schizophrenia: clinical status and antipsychotic effects. *Biol Psychiatry*, 70(7), 663-671.

- Möller, H.-J. (2011). *Psychiatrie, Psychosomatik, Psychotherapie*. Berlin [u.a.]: Springer.
- Möller, H.-J., Laux, G., & Deister, A. (2015). *Psychiatrie, Psychosomatik und Psychotherapie*. Stuttgart: Thieme.
- Möller, H. J. (2003). Management of the negative symptoms of schizophrenia: new treatment options. *CNS Drugs*, 17(11), 793-823.
- Muller, N., Krause, D., Dehning, S., Musil, R., Schennach-Wolff, R., Obermeier, M., . . . Riedel, M. (2010). Celecoxib treatment in an early stage of schizophrenia: results of a randomized, double-blind, placebo-controlled trial of celecoxib augmentation of amisulpride treatment. *Schizophr Res*, 121(1-3), 118-124.
- Muller, N., Myint, A. M., & Schwarz, M. J. (2011). Kynurenine pathway in schizophrenia: pathophysiological and therapeutic aspects. *Current Pharmaceutical Design*, 17(2), 130-136.
- Muller, N., & Schwarz, M. J. (2008). COX-2 inhibition in schizophrenia and major depression. *Curr Pharm Des*, 14(14), 1452-1465.
- Muller, N., & Schwarz, M. J. (2010). Immune System and Schizophrenia. *Curr Immunol Rev*, 6(3), 213-220.
- Muller, N., Wagner, J. K., Krause, D., Weidinger, E., Wildenauer, A., Obermeier, M., . . . Schwarz, M. J. (2012). Impaired monocyte activation in schizophrenia. *Psychiatry Res*, 198(3), 341-346.
- Muller, N., Weidinger, E., Leitner, B., & Schwarz, M. J. (2015). The role of inflammation in schizophrenia. *Front Neurosci*, 9, 372.
- Murphy, K. M., Travers, P., & Walport, M. (2009). *Janeway Immunologie*. Heidelberg: Spektrum, Akad. Verl.
- Napper, C. E., Dyson, M. H., & Taylor, M. E. (2001). An extended conformation of the macrophage mannose receptor. *J Biol Chem*, 276(18), 14759-14766.
- Pape, H.-C., Klinke, R., & Brenner, B. (2014). *Physiologie*. Stuttgart [u.a.]: Thieme.

- Potvin, S., Stip, E., Sepehry, A. A., Gendron, A., Bah, R., & Kouassi, E. (2008). Inflammatory cytokine alterations in schizophrenia: a systematic quantitative review. *Biol Psychiatry*, 63(8), 801-808.
- Rothermundt, M., Arolt, V., & Bayer, T. A. (2001). Review of immunological and immunopathological findings in schizophrenia. *Brain, Behavior, & Immunity*, 15(4), 319-339.
- Sathe, A., & Reddy, K. V. R. (2014). TLR9 and RIG-I signaling in human endocervical epithelial cells modulates inflammatory responses of macrophages and dendritic cells in vitro. *PLoS ONE*, 9 (1) (no pagination)(e83882).
- Schizophrenia Working Group of the Psychiatric Genomics, C. (2014). Biological insights from 108 schizophrenia-associated genetic loci. *Nature*, 511(7510), 421-427.
- Schlienger, K., Craighead, N., Lee, K. P., Levine, B. L., & June, C. H. (2000). Efficient priming of protein antigen-specific human CD4(+) T cells by monocyte-derived dendritic cells. *Blood*, 96(10), 3490-3498.
- Schneider. (1946). *Klinische Psychopathologie*. Stuttgart: Thieme.
- Schrocksadel, K., Wirleitner, B., Winkler, C., & Fuchs, D. (2006). Monitoring tryptophan metabolism in chronic immune activation. *Clin Chim Acta*, 364(1-2), 82-90.
- Schütt, C., & Bröker, B. (2011). *Grundwissen Immunologie*. Heidelberg: Spektrum, Akad. Verl.
- Shabihkhani, M., Lucey, G. M., Wei, B., Mareninov, S., Lou, J. J., Vinters, H. V., . . . Yong, W. H. (2014). The procurement, storage, and quality assurance of frozen blood and tissue biospecimens in pathology, biorepository, and biobank settings. *Clin Biochem*, 47(4-5), 258-266.
- Steenholdt, C., Andresen, L., Pedersen, G., Hansen, A., & Brynskov, J. (2009). Expression and function of toll-like receptor 8 and Tollip in colonic epithelial cells from patients with inflammatory bowel disease. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 44(2), 195-204.

- Stein, D., Kurtsman, L., Stier, S., Remnik, Y., Meged, S., & Weizman, A. (2004). Electroconvulsive therapy in adolescent and adult psychiatric inpatients--a retrospective chart design. *J Affect Disord*, *82*(3), 335-342.
- Steinman, L. (1995). Escape from "horror autotoxicus": pathogenesis and treatment of autoimmune disease. *Cell*, *80*(1), 7-10.
- Strassnig, M., Brar, J. S., & Ganguli, R. (2006). Increased caffeine and nicotine consumption in community-dwelling patients with schizophrenia. *Schizophr Res*, *86*(1-3), 269-275.
- Suerbaum, S., Burchard, G. D., & Kaufmann, S. H. E. (2016). *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*. Berlin ; Heidelberg: Springer.
- Sullivan, P. F., Kendler, K. S., & Neale, M. C. (2003). Schizophrenia as a complex trait: evidence from a meta-analysis of twin studies. *Arch Gen Psychiatry*, *60*(12), 1187-1192.
- Takeuchi, O., Hoshino, K., Kawai, T., Sanjo, H., Takada, H., Ogawa, T., . . . Akira, S. (1999). Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity*, *11*(4), 443-451.
- Tuominen, H. J., Tiihonen, J., & Wahlbeck, K. (2005). Glutamatergic drugs for schizophrenia: A systematic review and meta-analysis. *Schizophrenia Research*, *72*(2-3), 225-234.
- Turner, M. W. (2003). The role of mannose-binding lectin in health and disease. *Mol Immunol*, *40*(7), 423-429.
- Ullah, M. O., Ve, T., Mangan, M., Alaidarous, M., Sweet, M. J., Mansell, A., & Kobe, B. (2013). The TLR signalling adaptor TRIF/TICAM-1 has an N-terminal helical domain with structural similarity to IFIT proteins. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, *69*(Pt 12), 2420-2430.
- Upthegrove, R., Manzanares-Teson, N., & Barnes, N. M. (2014). Cytokine function in medication-naive first episode psychosis: a systematic review and meta-analysis. *Schizophr Res*, *155*(1-3), 101-108.
- van Os, J., Kenis, G., & Rutten, B. P. (2010). The environment and schizophrenia. *Nature*, *468*(7321), 203-212.

- Waldmann, T. A. (1987). The Arrangement of Immunoglobulin and T Cell Receptor Genes in Human Lymphoproliferative Disorders *Dixon, F. J. (Ed.). Advances in Immunology, Vol. 40. Vi+450p. Academic Press, Inc.: San Diego, California, USA; London, England, Uk. Illus. 247-322, 1987.*
- Ward, E. S., & Ghetie, V. (1995). The effector functions of immunoglobulins: Implications for therapy. *Therapeutic Immunology, 2(2), 77-94.*
- Watanabe, T., Hiasa, Y., Tokumoto, Y., Hirooka, M., Abe, M., Ikeda, Y., . . . Onji, M. (2013). Protein kinase R modulates c-Fos and c-Jun signaling to promote proliferation of hepatocellular carcinoma with hepatitis C virus infection. *PLoS ONE, 8(7), e67750.*
- Wong, M. L., & Medrano, J. F. (2005). Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques, 39(1), 75-85.*
- Young, J. W., & Geyer, M. A. (2013). Evaluating the role of the alpha-7 nicotinic acetylcholine receptor in the pathophysiology and treatment of schizophrenia. *Biochem Pharmacol, 86(8), 1122-1132.*
- Zhang, G., & Ghosh, S. (2002). Negative regulation of toll-like receptor-mediated signaling by Tollip. *J Biol Chem, 277(9), 7059-7065.*

7 Anhang

Medikamentendaten

Tabelle 49: Neuroleptikaeinnahme zum Zeitpunkt der zweiten Blutabnahme (Follow-up) bei schizophrene Patienten und gesunden Kontrollen.

	schizophrene Patienten [N]	gesunde Kontrollen [N]
Amisulprid	1	0
Aripiprazol	3	0
Risperidon	5	0
Quetiapin	1	0
Olanzapin	2	0
Promethazin	1	0

Tabelle 50: Einnahme psychiatrischer Medikation außer Neuroleptika zum Zeitpunkt Follow-up bei schizophrene Patienten und gesunden Kontrollen.

	schizophrene Patienten [N]	gesunde Kontrollen [N]
Sertralin	1	0
Lorazepam	4	0
Diazepam	2	0
Mirtazipim	1	0
Biperiden	1	0

Tabelle 51: Einnahme psychiatrischer Medikation außer Neuroleptika zum Zeitpunkt Baseline bzw. Follow-up bei schizophrene Patienten und gesunden Kontrollen.

Baseline	schizophrene Patienten [N]	gesunde Kontrollen [N]
Marcumar	1	0
Follow-up		
Marcumar	1	0
Propranolol	3	0
Pantoprazol	1	0
Movicol	1	0

Medikationseffekte

Tabelle 52: Durch den Mann-Whitney-U-Test vergleicht man die Proteinkonzentration ohne Stimulation vor und nach Medikamenteneinnahme in der Patientengruppe.

Zeitpunkt		N	p-Werte
MyD88	unmediziert	9	,436
	mediziert	9	
IRAK4	unmediziert	9	,387
	mediziert	9	
TOLLIP	unmediziert	9	,931
	mediziert	9	
TICAM1	unmediziert	9	,650
	mediziert	9	
cFOS	unmediziert	9	,387
	mediziert	9	

N = Anzahl der Probanden, **MW** = Mittelwert, **SD** = Standardabweichung, **Min.** = Minimum, **Max.** = Maximum
p-Werte: ohne Korrektur für multiples Testen

Tabelle 53: Durch den Mann-Whitney-U-Test vergleicht man die Proteinkonzentration mit LPS-Stimulation vor und nach Medikamenteneinnahme in der Patientengruppe.

Zeitpunkt		N	p-Werte
MyD88	unmediziert	9	,340
	mediziert	9	
IRAK4	unmediziert	9	,194
	mediziert	9	
TOLLIP	unmediziert	9	,931
	mediziert	9	
TICAM1	unmediziert	9	1,000
	mediziert	9	
cFOS	unmediziert	9	,831
	mediziert	9	

N = Anzahl der Probanden, **MW** = Mittelwert, **SD** = Standardabweichung, **Min.** = Minimum, **Max.** = Maximum
p-Werte: ohne Korrektur für multiples Testen

Tabelle 54: Durch den Mann-Whitney-U-Test vergleicht man die Proteinkonzentration mit poly(I:C)-Stimulation vor und nach Medikamenteneinnahme in der Patientengruppe.

Zeitpunkt		N	p-Werte
MyD88	unmediziert	9	,730
	mediziert	9	
IRAK4	unmediziert	9	,318
	mediziert	9	
TOLLIP	unmediziert	9	,730
	mediziert	9	
TICAM1	unmediziert	9	,796
	mediziert	9	
cFOS	unmediziert	9	,919
	mediziert	9	

N = Anzahl der Probanden, **MW** = Mittelwert, **SD** = Standardabweichung, **Min.** = Minimum, **Max.** = Maximum
p-Werte: ohne Korrektur für multiples Testen

Tabelle 55: Durch den Mann-Whitney-U-Test vergleicht man die mRNA-Expression ohne Stimulation vor und nach Medikamenteneinnahme in der Patientengruppe.

Zeitpunkt		N	p-Werte
IRAK4	unmediziert	9	,387
	mediziert	9	
TOLLIP	unmediziert	9	,436
	mediziert	9	

N = Anzahl der Probanden, **MW** = Mittelwert, **SD** = Standardabweichung, **Min.** = Minimum, **Max.** = Maximum
p-Werte: ohne Korrektur für multiples Testen

Tabelle 56: Durch den Mann-Whitney-U-Test vergleicht man die mRNA-Expression mit LPS-Stimulation vor und nach Medikamenteneinnahme in der Patientengruppe.

Zeitpunkt		N	p-Werte
IRAK4	unmediziert	9	,436
	mediziert	9	
TOLLIP	unmediziert	9	,222
	mediziert	9	

N = Anzahl der Probanden, **MW** = Mittelwert, **SD** = Standardabweichung, **Min.** = Minimum, **Max.** = Maximum
p-Werte: ohne Korrektur für multiples Testen

Tabelle 57: Durch den Mann-Whitney-U-Test vergleicht man die mRNA-Expression mit poly(I:C)-Stimulation vor und nach Medikamenteneinnahme in der Patientengruppe.

Zeitpunkt		N	p-Werte
IRAK4	unmediziert	9	,863
	mediziert	9	
TOLLIP	unmediziert	9	,796
	mediziert	9	

N = Anzahl der Probanden, **MW** = Mittelwert, **SD** = Standardabweichung, **Min.** = Minimum, **Max.** = Maximum
p-Werte: ohne Korrektur für multiples Testen

Tabelle 58: Durch den t-Test vergleicht man den Stimulationseffekt für LPS der mRNA-Expression vor und nach Medikamenteneinnahme in der Patientengruppe.

Zeitpunkt		N	MW	SD	Min.	Max.	p-Werte
IRAK4	unmediziert	9	,23	,46	-,18	916,88	,994
	mediziert	9	,23	,47	-811,66	1735,15	
TOLLIP	unmediziert	9	,17	,82	-1,61	1,15	,566
	mediziert	9	-,03	,57	-,35	,89	

N = Anzahl der Probanden, **MW** = Mittelwert, **SD** = Standardabweichung, **Min.** = Minimum, **Max.** = Maximum
p-Werte: T-Test ohne Korrektur für multiples Testen

Tabelle 59: Durch den t-Test vergleicht man den Stimulationseffekt für poly(I:C) der Proteinkonzentration vor und nach Medikamenteneinnahme in der Patientengruppe.

Zeitpunkt		N	MW	SD	Min.	Max.	p-Werte
MyD88	unmediziert	9	,33	1,30	-1,49	2,49	,828
	mediziert	9	3,08	37,39	-61,83	86,14	
IRAK4	unmediziert	9	936,12	2042,13	-2745,75	4936,04	,511
	mediziert	9	1541,19	1765,36	-139,50	5400,39	
TOLLIP	unmediziert	9	7,46	12,24	-3,41	27,75	,895
	mediziert	9	3,83	80,13	-142,76	176,39	
TICAM1	unmediziert	9	25,42	45,26	-10,21	107,30	,451
	mediziert	9	40,11	34,70	-13,00	102,30	
cFOS	unmediziert	9	3,68	79,87	-88,28	118,17	,664
	mediziert	9	27,31	138,82	-133,97	298,29	

N = Anzahl der Probanden, **MW** = Mittelwert, **SD** = Standardabweichung, **Min.** = Minimum, **Max.** = Maximum
p-Werte: T-Test ohne Korrektur für multiples Testen

Tabelle 60: Durch den t-Test vergleicht man den Stimulationseffekt für poly(I:C) der mRNA-Expression vor und nach Medikamenteneinnahme in der Patientengruppe.

Zeitpunkt		N	MW	SD	Min.	Max.	p-Werte
IRAK4	unmediziert	9	,07	,48	-,92	,68	,215
	mediziert	9	,42	,63	-,23	1,37	
TOLLIP	unmediziert	9	-,13	,95	-2,43	,67	,269
	mediziert	9	,28	,53	-,59	1,02	

N = Anzahl der Probanden, **MW** = Mittelwert, **SD** = Standardabweichung, **Min.** = Minimum, **Max.** = Maximum
p-Werte: T-Test ohne Korrektur für multiples Testen

Gesundheitsfragebogen

Bitte beantworten Sie die nachfolgenden Fragen zu Ihrem Gesundheitszustand möglichst genau und kreuzen Sie nur ärztlich diagnostizierte Krankheiten an.

Herz-/ Kreislaufferkrankungen:

Hoher Blutdruck	ja	<input type="checkbox"/>	nein	<input type="checkbox"/>
Angina pectoris	ja	<input type="checkbox"/>	nein	<input type="checkbox"/>
Herzrhythmusstörungen	ja	<input type="checkbox"/>	nein	<input type="checkbox"/>
Herzinfarkt	ja	<input type="checkbox"/>	nein	<input type="checkbox"/>
Herzklappenersatz	ja	<input type="checkbox"/>	nein	<input type="checkbox"/>
Herzschrittmacher(-ausweis)	ja	<input type="checkbox"/>	nein	<input type="checkbox"/>
Herzoperation	ja	<input type="checkbox"/>	nein	<input type="checkbox"/>
Endokarditis	ja	<input type="checkbox"/>	nein	<input type="checkbox"/>

Allgemeine Erkrankungen:

Anfallsleiden (Epilepsie)	ja	<input type="checkbox"/>	nein	<input type="checkbox"/>
Schlaganfall	ja	<input type="checkbox"/>	nein	<input type="checkbox"/>
Thrombose	ja	<input type="checkbox"/>	nein	<input type="checkbox"/>
Asthma/Lungenerkrankungen	ja	<input type="checkbox"/>	nein	<input type="checkbox"/>
Blutgerinnungsstörung	ja	<input type="checkbox"/>	nein	<input type="checkbox"/>
Diabetes/Zuckerkrankheit	ja	<input type="checkbox"/>	nein	<input type="checkbox"/>
Grüner Star (Glaukom)	ja	<input type="checkbox"/>	nein	<input type="checkbox"/>
Nierenerkrankungen	ja	<input type="checkbox"/>	nein	<input type="checkbox"/>
Osteoporoseerkrankung	ja	<input type="checkbox"/>	nein	<input type="checkbox"/>
Rheumatisches Fieber	ja	<input type="checkbox"/>	nein	<input type="checkbox"/>
Schilddrüsenerkrankung	ja	<input type="checkbox"/>	nein	<input type="checkbox"/>
Lebererkrankung	ja	<input type="checkbox"/>	nein	<input type="checkbox"/>
Gelenkprothesen	ja	<input type="checkbox"/>	nein	<input type="checkbox"/>

Infektiöse Erkrankungen:

HIV-Infektion	ja	<input type="checkbox"/>	nein	<input type="checkbox"/>
Hepatitis A/B/C	ja	<input type="checkbox"/>	nein	<input type="checkbox"/>
Tuberkulose	ja	<input type="checkbox"/>	nein	<input type="checkbox"/>
Andere Infektionserkrankungen	ja	<input type="checkbox"/>	nein	<input type="checkbox"/>

Wenn ja, welche?

Welche Medikamente nehmen Sie regelmäßig?

- 1).....
- 2).....
- 3).....
- 4).....

Besteht eine Schwangerschaft? ja nein

Allergien bzw. Unverträglichkeiten? ja nein

Wenn ja, welche?

.....

Krebserkrankung ja nein

Welche Körperregion?

Wann bzw. seit:

Strahlentherapie bei Krebserkrankung ja nein

Chemotherapie ja nein

Organtransplantation ja nein

Operationen ja nein

Wenn ja, welche?

Autoimmunerkrankungen:

Rheumatoide Arthritis ja nein

Kollagenose ja nein

Zöliakie ja nein

Morbus Crohn ja nein

Sarkoidose ja nein

Wurden andere Autoimmunerkrankungen diagnostiziert, die hier nicht abgefragt werden?

Wenn ja, welche?

Leidet jemand aus Ihrer Familie (Vater/Mutter/Geschwister) an einer Autoimmunerkrankung?

.....

.

Geburtsdatum _____

Geschlecht weiblich männlich

Körpergröße _____ in cm Gewicht _____ in kg

Volkszugehörigkeit

	Patient	Vater	Mutter
Europäisch			
Amerikanisch			
Afrikanisch			
Asiatisch			
Australisch			

Raucher Nichtraucher

Wenn ja, wie viele Zigaretten pro Tag? _____

Alkoholkonsum ja nein

Wenn ja, wie viel pro Tag? _____

Drogenkonsum ja nein

Wenn ja, welche Drogen und wie viel? _____

Verheiratet / in einer Partnerschaft lebend

Ledig

Verwitwe

Arbeit/Studium? _____

Wohnsituation

Eigenständiges Wohnen

Betreutes Wohnen

Psychische Erkrankungen in der Familie ja nein

Wenn ja, welche? _____

Wann wurde Ihre psychische Erkrankung diagnostiziert? _____

War das Ihr erster psychotischer Schub? ja nein

Seit wann haben Sie Symptome Ihrer aktuellen Episode? _____

Wie oft hatten Sie schon derartige Schübe (der aktuelle mit eingeschlossen)? _____

Anzahl Ihrer stationären Psychiatrieaufenthalte (der aktuelle mit eingeschlossen)? _____

Wann war Ihr erster Psychiatrieaufenthalt? _____

Positiv- und Negativ-Syndrom Skala (PANSS) – Scoreblatt

1 = fehlt / nicht vorhanden

2 = minimal / vorhanden

3 = leicht

4 = mäßig

5 = mäßig schwer

6 = schwer

7 = extrem

I. Positivskala (P)

P1	Wahnideen	<input type="checkbox"/> - 1	<input type="checkbox"/> - 2	<input type="checkbox"/> - 3	<input type="checkbox"/> - 4	<input type="checkbox"/> - 5	<input type="checkbox"/> - 6	<input type="checkbox"/> - 7
P2	Formale Denkstörungen	<input type="checkbox"/> - 1	<input type="checkbox"/> - 2	<input type="checkbox"/> - 3	<input type="checkbox"/> - 4	<input type="checkbox"/> - 5	<input type="checkbox"/> - 6	<input type="checkbox"/> - 7
P3	Halluzinationen	<input type="checkbox"/> - 1	<input type="checkbox"/> - 2	<input type="checkbox"/> - 3	<input type="checkbox"/> - 4	<input type="checkbox"/> - 5	<input type="checkbox"/> - 6	<input type="checkbox"/> - 7
P4	Erregung	<input type="checkbox"/> - 1	<input type="checkbox"/> - 2	<input type="checkbox"/> - 3	<input type="checkbox"/> - 4	<input type="checkbox"/> - 5	<input type="checkbox"/> - 6	<input type="checkbox"/> - 7
P5	Größenideen	<input type="checkbox"/> - 1	<input type="checkbox"/> - 2	<input type="checkbox"/> - 3	<input type="checkbox"/> - 4	<input type="checkbox"/> - 5	<input type="checkbox"/> - 6	<input type="checkbox"/> - 7
P6	Mißtrauen / Verfolgungsideen	<input type="checkbox"/> - 1	<input type="checkbox"/> - 2	<input type="checkbox"/> - 3	<input type="checkbox"/> - 4	<input type="checkbox"/> - 5	<input type="checkbox"/> - 6	<input type="checkbox"/> - 7
P7	Feindseligkeit	<input type="checkbox"/> - 1	<input type="checkbox"/> - 2	<input type="checkbox"/> - 3	<input type="checkbox"/> - 4	<input type="checkbox"/> - 5	<input type="checkbox"/> - 6	<input type="checkbox"/> - 7

II. Negativskala (N)

N1	Affektverflachung	<input type="checkbox"/> - 1	<input type="checkbox"/> - 2	<input type="checkbox"/> - 3	<input type="checkbox"/> - 4	<input type="checkbox"/> - 5	<input type="checkbox"/> - 6	<input type="checkbox"/> - 7
N2	Emotionaler Rückzug	<input type="checkbox"/> - 1	<input type="checkbox"/> - 2	<input type="checkbox"/> - 3	<input type="checkbox"/> - 4	<input type="checkbox"/> - 5	<input type="checkbox"/> - 6	<input type="checkbox"/> - 7
N3	Mangel in der affektiver Rapport	<input type="checkbox"/> - 1	<input type="checkbox"/> - 2	<input type="checkbox"/> - 3	<input type="checkbox"/> - 4	<input type="checkbox"/> - 5	<input type="checkbox"/> - 6	<input type="checkbox"/> - 7
N4	Soziale Passivität / Apathie	<input type="checkbox"/> - 1	<input type="checkbox"/> - 2	<input type="checkbox"/> - 3	<input type="checkbox"/> - 4	<input type="checkbox"/> - 5	<input type="checkbox"/> - 6	<input type="checkbox"/> - 7
N5	Schwierigkeiten beim abstrakten Denken	<input type="checkbox"/> - 1	<input type="checkbox"/> - 2	<input type="checkbox"/> - 3	<input type="checkbox"/> - 4	<input type="checkbox"/> - 5	<input type="checkbox"/> - 6	<input type="checkbox"/> - 7
N6	Mangel an Spontaneität / Flüssigkeit der Sprache	<input type="checkbox"/> - 1	<input type="checkbox"/> - 2	<input type="checkbox"/> - 3	<input type="checkbox"/> - 4	<input type="checkbox"/> - 5	<input type="checkbox"/> - 6	<input type="checkbox"/> - 7
N7	Stereotype Gedanken	<input type="checkbox"/> - 1	<input type="checkbox"/> - 2	<input type="checkbox"/> - 3	<input type="checkbox"/> - 4	<input type="checkbox"/> - 5	<input type="checkbox"/> - 6	<input type="checkbox"/> - 7

III. Skala der Alltagspsychopathologie (G)

G1	Sorge um die Gesundheit	<input type="checkbox"/> - 1	<input type="checkbox"/> - 2	<input type="checkbox"/> - 3	<input type="checkbox"/> - 4	<input type="checkbox"/> - 5	<input type="checkbox"/> - 6	<input type="checkbox"/> - 7
G2	Angst	<input type="checkbox"/> - 1	<input type="checkbox"/> - 2	<input type="checkbox"/> - 3	<input type="checkbox"/> - 4	<input type="checkbox"/> - 5	<input type="checkbox"/> - 6	<input type="checkbox"/> - 7
G3	Schuldgefühle	<input type="checkbox"/> - 1	<input type="checkbox"/> - 2	<input type="checkbox"/> - 3	<input type="checkbox"/> - 4	<input type="checkbox"/> - 5	<input type="checkbox"/> - 6	<input type="checkbox"/> - 7
G4	Anspannung	<input type="checkbox"/> - 1	<input type="checkbox"/> - 2	<input type="checkbox"/> - 3	<input type="checkbox"/> - 4	<input type="checkbox"/> - 5	<input type="checkbox"/> - 6	<input type="checkbox"/> - 7
G5	Manierismen und unnatürliche Körperhaltung	<input type="checkbox"/> - 1	<input type="checkbox"/> - 2	<input type="checkbox"/> - 3	<input type="checkbox"/> - 4	<input type="checkbox"/> - 5	<input type="checkbox"/> - 6	<input type="checkbox"/> - 7
G6	Depression	<input type="checkbox"/> - 1	<input type="checkbox"/> - 2	<input type="checkbox"/> - 3	<input type="checkbox"/> - 4	<input type="checkbox"/> - 5	<input type="checkbox"/> - 6	<input type="checkbox"/> - 7
G7	Motorische Verlangsamung	<input type="checkbox"/> - 1	<input type="checkbox"/> - 2	<input type="checkbox"/> - 3	<input type="checkbox"/> - 4	<input type="checkbox"/> - 5	<input type="checkbox"/> - 6	<input type="checkbox"/> - 7
G8	Unkooperatives Verhalten	<input type="checkbox"/> - 1	<input type="checkbox"/> - 2	<input type="checkbox"/> - 3	<input type="checkbox"/> - 4	<input type="checkbox"/> - 5	<input type="checkbox"/> - 6	<input type="checkbox"/> - 7
G9	Ungewöhnliche Denkinhalte	<input type="checkbox"/> - 1	<input type="checkbox"/> - 2	<input type="checkbox"/> - 3	<input type="checkbox"/> - 4	<input type="checkbox"/> - 5	<input type="checkbox"/> - 6	<input type="checkbox"/> - 7

G10	Desorientiertheit	<input type="checkbox"/> - 1	<input type="checkbox"/> - 2	<input type="checkbox"/> - 3	<input type="checkbox"/> - 4	<input type="checkbox"/> - 5	<input type="checkbox"/> - 6	<input type="checkbox"/> - 7
G11	Mangelnde Aufmerksamkeit	<input type="checkbox"/> - 1	<input type="checkbox"/> - 2	<input type="checkbox"/> - 3	<input type="checkbox"/> - 4	<input type="checkbox"/> - 5	<input type="checkbox"/> - 6	<input type="checkbox"/> - 7
G12	Mangel an Urteilsfähigkeit und Einsicht	<input type="checkbox"/> - 1	<input type="checkbox"/> - 2	<input type="checkbox"/> - 3	<input type="checkbox"/> - 4	<input type="checkbox"/> - 5	<input type="checkbox"/> - 6	<input type="checkbox"/> - 7
G13	Willensschwäche	<input type="checkbox"/> - 1	<input type="checkbox"/> - 2	<input type="checkbox"/> - 3	<input type="checkbox"/> - 4	<input type="checkbox"/> - 5	<input type="checkbox"/> - 6	<input type="checkbox"/> - 7
G14	Mangelnde Impulskontrolle	<input type="checkbox"/> - 1	<input type="checkbox"/> - 2	<input type="checkbox"/> - 3	<input type="checkbox"/> - 4	<input type="checkbox"/> - 5	<input type="checkbox"/> - 6	<input type="checkbox"/> - 7
G15	Selbstbezogenheit	<input type="checkbox"/> - 1	<input type="checkbox"/> - 2	<input type="checkbox"/> - 3	<input type="checkbox"/> - 4	<input type="checkbox"/> - 5	<input type="checkbox"/> - 6	<input type="checkbox"/> - 7
G16	Aktives soziales Vermeidungsverhalten	<input type="checkbox"/> - 1	<input type="checkbox"/> - 2	<input type="checkbox"/> - 3	<input type="checkbox"/> - 4	<input type="checkbox"/> - 5	<input type="checkbox"/> - 6	<input type="checkbox"/> - 7

COHEN'S PERCEIVED STRESS SCALE (PSS)

Pat. Nr.

Datum

In den 14 Fragen dieser Skala werden Sie nach Ihren Gefühlen und Gedanken innerhalb des letzten Monats gefragt. Wir bitten Sie bei jeder Frage anzugeben, wie oft sie sich in der angegebenen Art und Weise gefühlt oder gedacht haben, indem sie ihre Antwort mit einem Kreuzchen in der entsprechenden Spalte markieren.

Obwohl sich einige Fragen ähneln, gibt es Unterschiede zwischen ihnen und wir bitten Sie deshalb jede Frage unabhängig von den anderen Fragen zu beantworten. Als günstig hat sich erwiesen, die Fragen zügig hintereinander zu beantworten. Dabei kommt es nicht auf die genaue Anzahl der Situationen an, in denen Sie in angegebener Weise gedacht oder gefühlt haben, sondern auf ihre spontane Einschätzung der Häufigkeit.

	Nie	Fast nie	Manch -mal	Häufig	Sehr häufig
1. Im letzten Monat, wie häufig fühlten Sie sich durch etwas in Aufregung versetzt, das unerwartet geschah?	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
2. Im letzten Monat, wie häufig haben Sie sich außerstande gefühlt, die entscheidenden Dinge in ihrem Leben zu kontrollieren?	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
3. Im letzten Monat, wie häufig haben Sie sich nervös und gestresst gefühlt?	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
4. Im letzten Monat, wie häufig konnten Sie alltägliche Probleme und Ärgernisse erfolgreich bewältigen?	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
5. Im letzten Monat, wie häufig hatten Sie das Gefühl, mit wichtigen Veränderungen in Ihrem Leben gut umgehen zu können?	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
6. Im letzten Monat, wie häufig hatten Sie Vertrauen in Ihre Fähigkeit, Ihre persönlichen Probleme zu bewältigen?	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
7. Im letzten Monat, wie häufig hatten Sie das Gefühl, dass die Dinge sich in Ihrem Sinne entwickelten?	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
	Nie	Fast nie	Manch -mal	Häufig	Sehr häufig
8. Im letzten Monat, wie häufig hatten Sie das Gefühl, dass Sie nicht allen Ihren Pflichten nachkommen konnten?	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
9. Im letzten Monat, wie häufig waren Sie in der Lage, die Kontrolle über Ärgernisse in Ihrem Leben zu behalten?	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>

10. Im letzten Monat, wie häufig hatten Sie das Gefühl, dass Sie alles im Griff hatten?	○	○	○	○	○
11. Im letzten Monat, wie häufig haben Sie sich über Dinge geärgert, die Sie nicht beeinflussen konnten?	○	○	○	○	○
12. Im letzten Monat, wie häufig haben Sie sich dabei ertappt, dass Sie an Dinge dachten, die Sie noch erledigen mussten?	○	○	○	○	○
13. Im letzten Monat, wie häufig konnten Sie entscheiden, wie Sie Ihre Zeit verbringen?	○	○	○	○	○
14. Im letzten Monat, wie häufig hatten Sie das Gefühl, dass Schwierigkeiten sich so sehr angehäuft hatten, dass sie sie nicht überwinden konnten?	○	○	○	○	○

8 Danksagung

Ich bedanke mich insbesondere bei Prof. Dr. med. Norbert Müller für die Überlassung des interessanten Themas. Durch seine sehr freundliche und ergebnisorientierte Betreuung war es mir möglich, diese Arbeit zu vervollständigen.

Ein besonderer Dank gilt meiner Betreuerin Dr. med. Elif Weidinger. Ihre stetige und herzliche Unterstützung war mir während der gesamten Zeit eine große Hilfe.

Den Mitarbeitern des Neurochemischen Forschungslabors der Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie der LMU München danke ich für ihre Mitarbeit und Bemühungen, vor allem Sylvia de Jong, die mir bei allen Fragen zur Seite stand.

Ich bedanke mich auch bei allen Mitarbeitern und Ärzten der Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie der LMU München, die mir jederzeit behilflich waren.

Zum Schluss möchte ich noch meiner Familie von ganzem Herzen danken. Meine Eltern, Kurt Erhardt und Claudia Erhardt, so wie meine Geschwister Johannes und Katharina standen unablässig mit ihrer Unterstützung hinter mir.