

**Untersuchung von Oberflächenmolekülen  
auf T-Lymphozyten bei Schizophrenen  
mittels Durchflußzytometrie**

**Miriam Hadjamu  
2002**

Aus der Klinik und Poliklinik  
für Psychiatrie und Psychotherapie  
der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Direktor: Prof. Dr. H.-J. Möller

**Untersuchung von Oberflächenmolekülen auf  
T-Lymphozyten bei Schizophrenen mittels Durchflußzytometrie**

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

vorgelegt von  
Miriam Hadjamu  
aus Wuppertal  
2002

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der LMU München

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

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. M.-C. Jung  
Priv. Doz. Dr. E. Meinel

Promovierter Mitbetreuer: Dr. med. R. Gruber

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

Tag der mündlichen Prüfung: 10.10.2002

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	<b>Schizophrene Psychosen</b>	<b>1</b>
1.1.1	Immunologische Auffälligkeiten bei Schizophrenen	1
1.2	<b>Das Immunsystem</b>	<b>3</b>
1.2.1	Lymphozyten	3
1.3	<b>Adhäsionsmoleküle</b>	<b>5</b>
1.3.1	Integrine	6
1.3.1.1	LFA-1 (CD11a)	6
1.3.1.2	VLA-4 (CD49d)	7
1.3.2	Bedeutung von LFA-1 und VLA-4 für die Schizophrenieforschung	7
1.4	<b>T-Zellrezeptor (TCR)</b>	<b>8</b>
1.4.1	Der $\gamma\delta$ -T-Zellrezeptor	8
1.4.2	Bedeutung von $\gamma\delta^+$ T-Zellen für die Schizophrenieforschung	8
<b>2</b>	<b>Zielsetzung der Arbeit</b>	<b>10</b>
<b>3</b>	<b>Material</b>	<b>11</b>
3.1	Chemikalien	11
3.2	Geräte	11
3.3	Antikörper	11
3.4	Einwegartikel/Sonstiges	12
3.5	Patienten und Kontrollpersonen	12
<b>4</b>	<b>Methoden</b>	<b>19</b>
4.1	Isolierung von Lymphozyten aus Vollblut	19
4.2	Einfrieren und Auftauen der Zellen	20
4.3	<b>Immunfluoreszenz</b>	<b>20</b>
4.3.1	Färben	20
4.3.1.1	Konzentration der Zellen	20
4.3.1.2	Konzentration der Färbereagentien	20
4.3.1.3	Färbezeit und Färbetemperatur	21
4.3.1.4	Waschen	22
4.3.1.5	Fixierung	22
4.3.2	Messung mit Durchflußzytometer	22

---

4.3.2.1	Durchflußzytometer .....	22
4.3.3	Datenauswertung .....	24
<b>4.4</b>	<b>Untersuchung des Liquor cerebrospinalis .....</b>	<b>27</b>
<b>4.5</b>	<b>Statistische Methoden .....</b>	<b>28</b>
<b>5</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>29</b>
<b>5.1</b>	<b>Adhäsionsmolekülrezeptoren: LFA-1 (CD11a), VLA-4 (CD49d) .....</b>	<b>29</b>
5.1.1	Adhäsionsmolekülrezeptoren: LFA-1 (CD11a), VLA-4 (CD49d) bei Kontrollen, unbehandelten und behandelten Patienten.....	30
5.1.2	Adhäsionsmolekülrezeptoren: LFA-1 (CD11a), VLA-4 (CD49d) bei Patienten mit gestörter Blut–Liquorschranke .....	34
<b>5.2</b>	<b>Der <math>\gamma\delta</math>T-Zellrezeptor .....</b>	<b>35</b>
5.2.1	Der $\gamma\delta$ T-Zellrezeptor bei Kontrollen, unbehandelten und behandelten Patienten.....	35
5.2.2	Der $\gamma\delta$ T-Zellrezeptor bei Patienten mit gestörter Blut–Liquorschranke .....	37
<b>6</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>43</b>
<b>6.1</b>	<b>Adhäsionsmolekülrezeptoren .....</b>	<b>44</b>
6.1.1	Zunahme der Expression von VLA-4 und LFA-1 auf CD8+ Zellen, sowie VLA-4 auf CD4+ Zellen unter Neuroleptikabehandlung .....	44
6.1.2	Stärkere Expression von VLA-4 und LFA-1 auf CD4+ Zellen bei Patienten mit gestörter Blut–Liquorschranke .....	45
<b>6.2</b>	<b>Der <math>\gamma\delta</math>T-Zellrezeptor .....</b>	<b>46</b>
6.2.1	Erhöhte Zahl der CD8+/ $\gamma\delta$ +Zellen bei unbehandelten Schizophrenen .....	46
6.2.2	Erniedrigte CD8+/ $\gamma\delta$ +Zellen bei Patienten mit Blut- Liquorschrankenstörung.....	49
<b>6.3</b>	<b>Ausblick .....</b>	<b>50</b>
<b>7</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>51</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>53</b>
<b>9</b>	<b>Lebenslauf.....</b>	<b>65</b>

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
CD	Cluster of Differentiation
DMSO	Dimethylsulfoxid
Facs	fluorescence activated cell sorter
FCS	Fetal calf serum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	Forward light scatter
Ig	Immunglobulin
µl	Microliter
MHC	Major histocompatibility complex
ml	Milliliter
MS	Multiple Sklerose
Pat.	Patient
PBS	Phosphate buffered saline
PE	Phycoerythrin
RPMI	Rosewell Park Memorial Institute
SSC	Sidescatter
Tab.	Tabelle
TCR	T cell receptor
u. a.	unter anderem
z. B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem
TC	Tricolor

# 1 Einleitung

## 1.1 Schizophrene Psychosen

Die schizophrenen Psychosen werden den endogenen Psychosen zugeordnet. Sie sind sehr vielgestaltig in ihrem Erscheinungsbild. Es kann zum Auftreten einer Vielzahl von Symptomen wie Wahn, Halluzinationen, formalen Denkstörungen, Ich-Störungen, Affektstörungen und psychomotorischen Störungen kommen (Möller et al., 1996).

Das durchschnittliche Erkrankungsrisiko in der Bevölkerung liegt bei etwa bei 1% (Wyatt et al., 1988). Die Verteilung auf die beiden Geschlechter ist annähernd gleich, der Erkrankungsbeginn liegt bei Frauen tendenziell später. Mehr als die Hälfte aller Schizophrenien beginnen zwischen der Pubertät und dem 30. Lebensjahr, wobei die verschiedenen Subtypen der Erkrankung Unterschiede bezüglich des Erstmanifestationsalter machen.

Die Diagnose der Schizophrenie wird aufgrund der Symptomatik, der Dauer des Auftretens der Symptome und dem Ausschluß einer organischen Erkrankung gestellt (siehe DSM-IV und ICD-10).

Man kann bei der Schizophrenie von einer multifaktoriellen Entstehung ausgehen. Pathogenese und Ätiologie sind bis dato ungeklärt, was Raum für eine Vielzahl von Hypothesen schafft (Tsuang und Faraone, 1995).

### 1.1.1 Immunologische Auffälligkeiten bei Schizophrenen

Endogene Psychosen haben einen schub- bzw. phasenhaften Verlauf, oft einen frühen Krankheitsbeginn und eine genetische Vulnerabilität, ähnlich wie bei vielen Autoimmunerkrankungen (Noy et al., 1994). Die Hypothese, Immunprozesse seien an der Pathogenese psychiatrischer Erkrankungen beteiligt, wird deshalb seit langem immer wieder diskutiert (Yolken und Torrey, 1995; Kirch, 1993; Ganguli et al., 1993).

Auffälligkeiten des Immunsystems bei Schizophrenen wurden schon Anfang dieses Jahrhunderts beschrieben. Bei einem Drittel der Schizophrenen, speziell bei katatonen Schizophrenen, wurde eine Lymphozytose und Eosinophilie

beobachtet (Dameshok, 1930). Auch von anderen Autoren (Lehmann-Facius, 1939; Bruce und Peebles, 1903) wurden Befunde veröffentlicht, die auf einen Autoimmunprozeß bei Katatonen hinwiesen.

Es wurden immer wieder Befunde über Veränderungen des Immunsystems von Schizophrenen, ähnlich denen, wie sie bei Autoimmunerkrankungen auftreten beschrieben: Antikörper gegen ZNS-Strukturen (Heath, 1969; Pandey et al., 1981; Fessel, 1963; DeLisi et al., 1985), erhöhte Serumkonzentrationen löslicher Interleukin-2-Rezeptoren (Rapaport et al., 1994; Maes et al., 1995a; Hornberg et al., 1995), erhöhte Interleukin-6-Spiegel im Serum (Shintani et al., 1991) und erhöhte Antikörpertiter gegen humanes 60kD heat-shock Protein (Kilidireas et al., 1992; Schwarz et al., 1999).

Beim Aufkommen der Dopamin-Hypothese (Carlsson und Linnquist, 1963) wurden die Ergebnisse der immunologischen Untersuchungen in den Hintergrund gedrängt. Knight suchte eine Verbindung zwischen den Theorien und glaubte, daß stimulierende Autoantikörper gegen Dopaminrezeptoren für die Überaktivität der dopaminergen Neurotransmissionen verantwortlich sind (Knight, 1982).

Auf der anderen Seite wurden schizophrenie-ähnliche Symptome bei Autoimmunerkrankungen mit ZNS-Beteiligung beobachtet: Lupus erythematoses (Krüger, 1984), Sklerodermie (Müller et al., 1993b), Sjögren syndrom (Raps et al., 1986) und Antiphospholipidsyndrom (Kurtz und Müller, 1994).

Die Entwicklung neuer immunologischer Methoden ermöglichte mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern die Untersuchung verschiedener Lymphozytensubpopulationen. Eine Erhöhung der CD5+ B-Zellen, die bei Autoimmunerkrankungen oft beobachtet wird, wurde im Blut schizophrener Patienten festgestellt (McAllister et al., 1989). In einer anderen Studie konnte sie jedoch nicht bestätigt werden (Ganguli und Rabin, 1993). Auch bei weiteren Untersuchungen wurden z. T. eine erhöhte Anzahl der CD3+, CD4+ und CD8+ T-Zellen im Blut von Schizophrenen festgestellt (Henneberg et al., 1990; Müller



et al., 1991), aber auch eine erniedrigte oder unveränderte Zahl der T-Zellen wurden beobachtet (Villemain et al., 1989; Nyland et al., 1980).

All dieser Ergebnisse geben Anlaß, weitere Untersuchungen in dieser Richtung zu unternehmen, um so vielleicht neue Ansätze bei der Diagnostik und Therapie der Schizophrenie zu finden.

## **1.2 Das Immunsystem**

Den menschlichen Organismus bedrohen täglich eine Vielzahl von mikrobiellen Erregern (Bakterien, Viren, Protozoen und Pilzen). Eine Aufgabe des Immunsystems ist es den Körper gegen diese große Anzahl von eindringenden Keimen zu schützen, eine andere Aufgabe besteht darin, körpereigene Zellen zu überwachen, um so eine Entartung schnell zu erkennen und die Entstehung von entarteten Zellen zu verhindern.

Man unterscheidet die angeborene, natürliche Immunität, die durch Makrophagen, Granulozyten, natürliche Killerzellen und das Komplementsystem gewährleistet wird. Sie ist unabhängig von einem vorherigem Kontakt mit dem Erreger. Wird diese Abwehr durchbrochen, so ist die erworbene Abwehr gefordert.

Die erworbene Immunität beruht auf den Lymphozyten. Sie wird durch den Kontakt mit fremden Substanzen (Antigenen) stimuliert.

### **1.2.1 Lymphozyten**

Die Lymphozyten befinden sich im Knochenmark, im Thymus, in den peripheren lymphatischen Organen, in den Schleimhäuten, im Blut und der Lymphflüssigkeit.

Alle Lymphozyten leiten sich von Stammzellen des Knochenmark ab und können anhand ihres Differenzierungsortes und ihrer Funktion in zwei Typen von antigenspezifischen Lymphozyten unterschieden werden. Die B-Lymphozyten entwickeln sich im Knochenmark und differenzieren dann in den Foliolen der Lymphknoten zu antikörperproduzierenden Plasmazellen oder Gedächtniszellen. Die von den Plasmazellen produzierten Antikörper sind Bestandteil der humoralen Immunantwort der spezifischen Immunität.

T-Lymphozyten reifen im Thymus heran und bilden dort ihre Antigen-spezifität aus. Sie werden zu Effektorzellen, die als zytotoxische T-Zellen (CTL) infizierte Zellen abtöten oder als Helferzellen (TH) andere Zellen des Immunsystems wie Makrophagen und B-Lymphozyten aktivieren. Man unterscheidet TH-1-Zellen, die Interferon  $\gamma$ , Interleukin-2 (IL-2) und Tumornekrosefaktor  $\alpha$  sezernieren und Makrophagen aktivieren, von TH-2-Zellen, die B-Zellen aktivieren, indem sie IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13 produzieren. Die T-Lymphozyten sind für die zellvermittelte Immunantwort der erworbenen Immunität verantwortlich.

Mit Hilfe Differenzierungscluster (clusters of differentiation, CD), Gruppen monoklonaler Antikörper, die gegen dasselbe Zelloberflächenmolekül gerichtet sind, lassen sich heute eine Vielzahl von Lymphozytensubpopulationen definieren.

Eine Übersicht der in der Arbeit beschriebenen CD-Antigene und der Zellen, die das Antigen exprimieren, gibt Tabelle 1.

CD-Antigen	Expression auf	Funktion
CD 3	allen T-Zellen	assoziiert mit dem Antigenrezeptor von T-Zellen (TCR); notwendig für die Signalübertragung des TCR
CD 4	T-Helferzellen	Corezeptor für MHC-Klasse-II-Moleküle
CD 8	zytotoxische T-Zellen	Corezeptor für MHC-Klasse-I-Moleküle
CD 11a	Leukozyten	$\alpha$ -Kette des LFA-1; bindet an CD 54 (ICAM-1), ICAM-2 und ICAM-3
CD 49d	T-Zellen, Monozyten, B-Zellen	$\alpha^4$ -Integrin (VLA-4); bindet an VCAM-1 und Fibronectin

**Tabelle 1:** Auflistung der in der Arbeit beschriebenen CD-Antigene und der Zellen, die das Antigen exprimieren

### 1.3 Adhäsionsmoleküle

Die Wanderung, Aktivierung und Effektorfunktion der Lymphozyten sind u.a. von Adhäsionsmolekülen abhängig. Auf der Oberfläche des T-Lymphozyten befindet sich ein variierendes Aufgebot von Adhäsionsmolekülen, das eine komplementäre Anordnung auf der Oberfläche der Zellen erkennt, mit denen die T-Zelle interagiert.

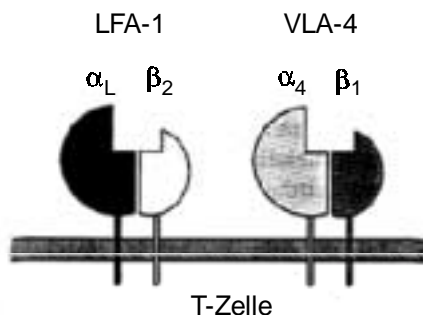
Die wichtigsten Klassen, von denen bekannt ist, daß sie eine Rolle bei der Lymphozyteninteraktion spielen, sind die Integrine, die Selektine, Mitglieder der Immunglobulin-Superfamilie sowie einige Mucin ähnliche Moleküle.

Auf die Integrine soll im folgendem näher eingegangen werden.

### 1.3.1 Integrine

Die Integrine umfassen eine große Familie von Zelloberflächenproteinen, die die Adhäsion zwischen Zellen, sowie zwischen Zellen und der extrazellulären Matrix bei der Immunantwort und der inflammatorischen Antwort ermöglichen. Diese Adhäsion ist eine Grundvoraussetzung für die Zellwanderung und –erkennung.

Es gibt verschiedene Untergruppen der Integrine unterteilt durch ihre  $\beta$ -Kette. Die Adhäsionsmolekülrezeptoren LFA-1 und VLA-4 gehören zu den Integrinen, eine Familie heterodimerer Glykoproteine bestehend aus je einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Kette (Abb.1). LFA-1 und VLA-4 werden konstitutiv auf T-Zellen exprimiert.



**Abbildung 1** : T-Zell-Integrine LFA-1 und VLA-4 schematisch dargestellt. Man erkennt die größere  $\alpha$ -Kette und die  $\beta$ -Kette. LFA-1 und VLA-4 werden stark auf T-Zellen exprimiert und sind für die Wanderung und Aktivierung dieser Zellen von Bedeutung.

#### 1.3.1.1 LFA-1 (CD11a)

LFA-1 (lymphocyte function-associated antigen-1) gehört zu den Leukozytenintegrinen, die eine gemeinsame  $\beta_2$ -Kette mit unterschiedlichen  $\alpha$ -Ketten besitzen. Alle T-Zellen exprimieren LFA-1. Es spielt bei T-Lymphozyten eine Rolle bei der Adhäsion an antigenpräsentierende Zellen, an abzutötende Zielzellen und an Endothelzellen. Man nimmt an, daß es das wichtigste Adhäsionsmolekül für die Lymphozytenaktivierung ist, da Antikörper gegen LFA-1 die Aktivierung der naiven als auch der bewaffneten T-Effektorzellen effektiv hemmen (Hynes, 1992; Hogg und Landis, 1993).

Es existieren mehrere Liganden für LFA-1: bedeutsam sind ICAM-1 (intercellular adhesion molecule) und -2, die zur Immunglobulin-Superfamilie gehören und u. a. von Endothelzellen exprimiert werden.

### **1.3.1.2 VLA-4 (CD49d)**

VLA-4 (very late activation antigen-4) gehört zu den  $\beta_1$ -Integrinen. Die Expression der  $\beta_1$ -Integrine steigt während der späten Phase der T-Zell-Aktivierung deutlich an.

VLA-4 vermittelt die Bindung der Lymphozyten an Entzündungsstellen an das Endothel. Das geschieht durch die Anlagerung an VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1), das auf dem aktivierten Endothel exprimiert wird. Außerdem bindet VLA-4 an Fibronektin (Hynes, 1992; Hogg und Landis, 1993). Eine Bindung an diese Moleküle ermöglicht es so den Lymphozyten, durch Blutgefäße zu wandern.

### **1.3.2 Bedeutung von LFA-1 und VLA-4 für die Schizophrenieforschung**

Die Expression von Adhäsionsmolekülen wird durch Zytokine reguliert (de Vries et al., 1994), Veränderungen am Zytokinsystem bei Schizophrenen, nicht nur im Blut auch im Liquor, wurden immer wieder beschrieben, eine Übersicht gibt Müller und Ackenheil (Müller und Ackenheil, 1998). So liegt es nahe, die Expression von LFA-1 und VLA-4 bei Schizophrenen und besonders bei Schizophrenen mit gestörter Blut-Liquorschranke zu untersuchen.

Die Liganden von LFA-1 und VLA-4, ICAM-1 und VCAM-1 werden auch im Gehirn auch auf Astrozyten, Mikrogliazellen und Neuronen exprimiert (Hery et al., 1995; Fabry et al., 1992).

Es gibt einige Untersuchungen zu ICAM-1, dem Liganden von LFA-1, es wurde z.B. eine Verbindung von löslichem ICAM-1 mit der gestörten Blut-Liquor-Schranke bei Schizophrenen beobachtet (Schwarz et al., 1998). ICAM-1 ist als lösliches Adhäsionsmolekül im Serum nachweisbar (van de Stolpe und van der Saag, 1996), wenn es von der Zelloberfläche abgeschert wird. Man weiß ferner, daß die Serumkonzentration von löslichem ICAM-1 bei einigen

Autoimmunerkrankungen, z.B. Multiples Sklerose (Dore-Duffy et al., 1995; Tsukada et al., 1993; Hartung et al., 1993) oder dem systemischen Lupus erythematodes (Tulek et al., 1996) erhöht ist.

Für die Schizophrenie wurden bisher keine Daten veröffentlicht, was die Expression von LFA-1 und VLA-4 auf peripheren Lymphozyten betrifft, doch bieten sie sich für eine nähere Untersuchung an, da sie eine zentrale Rolle im Immunsystem spielen.

#### **1.4 T-Zellrezeptor (TCR)**

Der T-Zellrezeptor (TCR) ist die zentrale Struktur des T-Zellsystems. T-Zellen erkennen den Komplex aus Antigenpeptid und MHC (major histocompatibility complex) -Molekül über den T-Zellrezeptor. Er aktiviert die T-Zell-vermittelte Immunität nach Antigenkontakt.

Über 90% der T-Zellen tragen einen Rezeptor bestehend aus einem Heterodimer einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Kette, weniger als 10% verwenden als TCR ein Heterodimer bestehend aus einer  $\gamma$ - und einer  $\delta$ -Kette. Die genaue Funktion der  $\gamma\delta$ + T-Zellen ist noch nicht geklärt.

##### **1.4.1 Der $\gamma\delta$ T-Zellrezeptor**

In der frühen Ontogenese dominieren die  $\gamma\delta$ + T-Zellen. Von der Geburt an exprimieren jedoch über 90% der T-Zellen  $\alpha\beta$ -Rezeptoren.

Eine der auffallendsten Eigenschaften ist die geringe Vielfalt ihrer Rezeptoren.  $\gamma\delta$ + T-Zellen sind besonders häufig in der Haut lokalisiert (Bergstresser et al., 1993; Bos et al., 1990), man vermutet, daß sie dort, als eine unspezifische erste Immunantwort, die Aufgabe haben eindringende Keime abzuwehren. Der  $\gamma\delta$ TCR benötigt keine Antigenprozessierung und erkennt die Proteine direkt, ohne daß diese an MHC gebunden sind (Chien et al., 1996).

##### **1.4.2 Bedeutung von $\gamma\delta$ + T-Zellen für die Schizophrenieforschung**

Es wurde gezeigt, daß der  $\gamma\delta$ TCR in menschlichem Hirngewebe von gesunden Kontrollpersonen und Schizophrenen exprimiert wird (Frenzel et al., 1995). Man

vermutet, daß  $\gamma\delta+$  T-Zellen bei ZNS-Erkrankungen eine Rolle spielen, es wurden  $\gamma\delta+$  T-Zellen beschrieben, die Oligodendrozyten, die aus menschlichen Hirngewebe kultiviert wurden, lysierten (Freedman et al., 1991).

Der  $\gamma\delta$ TCR wurde in den letzten Jahren immer wieder mit Autoimmunerkrankungen in Zusammenhang gebracht (Hayday und Geng, 1997). Bei Patienten mit akuter Multiples Sklerose wurde z. B. eine Ausbreitung von  $\gamma\delta+$  T-Zellen beschrieben, nachdem sie aus dem Liquor cerebrospinalis isoliert, in Kultur genommen und mit T-Zell-Wachstumsfaktor stimuliert wurden (Shimonkevitz et al., 1993). Stinissen et al. fand eine erhöhte Anzahl von  $\gamma\delta+$  T-Zellen im Blut und Liquor cerebrospinalis von Patienten mit Multiples Sklerose (Stinissen et al., 1995). Auch bei anderen Autoimmunerkrankungen, wie z. B. der rheumathoiden Arthritis (Keystone et al., 1991), der primär sklerosierenden Cholangitis (Martins et al., 1996) oder der autoimmunen chronischen Lebererkrankung (Wen et al., 1992) wurden erhöhte Zahlen von  $\gamma\delta+$  T-Zellen gemessen.

Es zeigte sich, daß besonders die  $CD8+/\gamma\delta+$  Zellen gut das Endothel durchwandern (Galea et al., 1994). In das ZNS einwandernde Lymphozyten werden als Zeichen eines Immunprozesses bei ZNS-Erkrankungen gedeutet. Die Untersuchung einer Untergruppen von Lymphozyten, die eine hohe Durchwanderungskapazität besitzen, ist bei der Schizophrenie interessant, die oft mit einer gestörten Blut-Liquorschranke assoziiert ist (Kirch et al., 1992; Müller und Ackenheil, 1995).

## 2 Zielsetzung der Arbeit

Das Ziel der Arbeit war, mit Hilfe der Durchflußzytometrie Veränderungen am zellulären Immunsystem von Schizophrenen zu bestimmen und die Ergebnisse mit gesunden Kontrollpersonen zu vergleichen. Um Behandlungseffekte aufzuzeigen bzw. auszuschließen sollten sowohl Blutproben vor der medikamentösen Behandlung als auch während der Behandlung untersucht werden. Außerdem sollten auch Liquorproben der schizophrenen Patienten, soweit vorhanden, untersucht werden, um Veränderungen an der Blut-Liquorschranke festzustellen, um so eventuell bei Patienten mit Blut-Liquorschrankenstörungen Veränderungen am zellulären Immunsystem feststellen zu können.

Die verschiedenen Lymphozytensubpopulationen sollten mittels FACS-Analysen anhand der verschiedenen Oberflächenantigene bestimmt werden, um so eine Aussage über den Funktionszustand des Immunsystems zu treffen. Im einzelnen sollte eine Auswahl von Oberflächenantigenen gemessen werden, die mit der Aktivierung des Immunsystems bzw. mit Autoimmunprozessen in Zusammenhang gebracht werden. Dies waren die T-Helferzellen (CD4+/CD3+), die T-Suppressorzellen (CD8+/CD3+) und die T-Zellrezeptor- $\gamma\delta$ -Zellen, sowie die Expression von den Adhäsionsmolekülrezeptoren LFA-1+ (CD11a), VLA-4+ (CD49d) auf CD4+ und CD8+ Zellen.



### 3 Material

#### 3.1 Chemikalien

<u>Chemikalien</u>	<u>Hersteller\Vertrieb</u>
Paraformaldehyd (CH <sub>2</sub> O) <sub>n</sub>	Fluka Chemie
Natriumazid (N <sub>3</sub> Na)	Fluka Chemie
PBS Dulbecco	Biochrom KG
Milchpulver	Bio-Rad Laboratories
RPMI 1640	Biochrom KG
Ficoll	Biochrom KG
Fetal Calf Serum	Boehringer Mannheim
Dimethyl Sulfoxide (C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> OS)	Sigma Chemikal co.

#### 3.2 Geräte

Schüttler Vortex Genie 2	Bender&Hobein AG
Zentrifuge Mikro Rapid\K	Hettich
Zentrifuge Omnifuge 2.ORS	Heraeus Sepatech
Zellzähler Coulter Counter	Coulter Electronics Ltd.
Waage Mettler P 203 N	Mettler Waagen GmbH
Durchflußzytometer Facscan	Becton&Dickinson
Facscan Software Version B	Becton&Dickinson
Mikropipetten	
200-1000µl	
50- 250µl	
10- 100µl	
0,5- 10µl	Eppendorf

#### 3.3 Antikörper

Antikörper	Fluoreszenz	Hersteller
------------	-------------	------------

CD 3	FITC	Coulter
CD 4	PE	Becton&Dickinson
CD 4	TC	Caltag Laboratories
CD 8	TC	Caltag Laboratories
CD 11a (LFA-1)	FITC	Caltag Laboratories
CD 49d (VLA-4)	PE	Labgen
$\gamma\delta$ T-Zellrezeptor	FITC	Becton&Dickinson

Isotypkontrollen:

IgG1	FITC	Becton&Dickinson
IgG2	PE	DAKO

### 3.4 Einwegartikel\Sonstiges

Latexhandschuhe Peha-safe		Hartmann
ReagiergefäÙe:	1,5 ml	Eppendorf
	13 ml	Sarstedt
Pipettenspitzen:	blau	
	gelb	
	durchsichtig	Sarstedt

### 3.5 Patienten und Kontrollpersonen

Unter sterilen Bedingungen wurde von 45 Patienten mit Erkrankungen aus dem schizophrenen Formenkreis vor der medikamentösen Behandlung und von 20 Patienten nach der Behandlung mit Neuroleptika und von 41 gesunden Kontrollpersonen jeweils zwischen 20-50 ml Blut abgenommen. Als Antikoagulans wurde 5000 IE Heparin Novo pro 100ml Blut hinzugefügt. Die Blutabnahmen erfolgten zwischen 9 und 11 Uhr morgens.

Die Patienten waren zur stationären Behandlung in die Psychiatrische Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München aufgenommen worden.

Die Untersuchung fand im Rahmen einer von der Ethikkommission der medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

genehmigten Studie statt. Die Patienten und Probanden wurden entsprechend der dort festgelegten Richtlinien aufgeklärt. Sie wurden in die Studie aufgenommen, nachdem sie ihr Einverständnis gegeben hatten.

Die Patienten wurden mit dem strukturiertem klinischem Interview diagnostiziert (American Psychiatric Association(APA), 1990) gemäß den diagnostischen Kriterien nach DMS-III R (American Psychiatric Association(APA), 1987). Sie wurden körperlich sowie neurologisch untersucht, eine routinemäßige Blutuntersuchung wurde vorgenommen. Patienten mit Alkohol- (erhöhte Leberwerte und einer positiven Anamnese) oder Drogenabusus (Urinscreening Test) wurden ausgeschlossen. Weitere Ausschlußkriterien waren eine akute oder chronische Infektionskrankheit, sowie eine bekannte Autoimmunerkrankung. Es wurden Alter und Geschlecht der Patienten erfaßt. Das Alter der 45 (13 Frauen, 32 Männer) Patienten lag zwischen 18 und 63 Jahren, das Durchschnittsalter war  $30,44 \pm 9,34$  Jahre.

16 der Patienten hatten eine erste Episode der Schizophrenie und waren noch nie mit Neuroleptika behandelt worden. Die Mehrheit der Patienten wurde in den letzten Monaten nicht mit Neuroleptika behandelt, mindestens jedoch zwei Wochen vor Aufnahme mußten die Patienten medikamentenfrei sein.

Die Krankheitsdauer vor Einschluß in die Studie beträgt zwischen sechs und 300 Monaten, die mittlere Krankheitsdauer beträgt  $54,5 \pm 77,9$  Monate (Tab.2).

Nr.	Alter	Geschl.	Diagnose (DSM III R)	Stat. Dauer	Erkr. gesamt	Episode	Erstm.
s001	44	1	katatoner Typ (295.22)	4	240	1	1
s003	26	1	paranoider Typ (295.31)	1	12	1	1
s005	18	2	desorganisierter Typ (295.12)	3	36	4	2
s006	30	2	katatoner Typ (295.20)	2	48	6	2
s007	26	1	desorganisierter Typ (295.13)	0,03	3	1	1
s008	22	1	schizophreniforme St. (295.40)	1	1	1	1
s009	19	1	paranoider Typ (295.13)	0,5	5	2	2
s010	29	2	paranoider Typ (295.34)	3	60	4	2
s011	22	1	desorganisierter Typ (295.14)	0,03	24	2	2
s013	20	2	paranoider Typ (295.33)	4	24	1	1
s014	28	1	paranoider Typ (295.34)	1	48	2	2
s015	21	1	schizophreniforme St. (295.40)	0,5	1	1	1
s016	30	1	desorganisierter Typ (295.14)	1	24	4	2
s017	31	1	paranoider Typ (295.34)	7	132	8	2
s018	31	2	paranoider Typ (295.34)	1,5	48	1	1
s019	30	1	paranoider Typ (295.34)	0,2	48	3	2
s021	38	1	paranoider Typ (295.32)	3	96	1	1
s023	28	1	residualer Typ (295.62)	1	17	1	1
s024	33	1	paranoider Typ (295.34)	3	87	3	2
s026	29	1	paranoider Typ (295.34)	3	36	4	2
s028	24	1	paranoider Typ (295.34)	1	7	2	2
s029	63	2	paranoider Typ (295.34)	1	288	2	2
s032	32	1	paranoider Typ (295.32)	0,5	36	2	2
s033	25	1	desorganisierter Typ (295.14)	2	24	2	2
s034	19	1	wahnhafte Störung (297.10)	1	1,5	1	1
s038	19	1	desorganisierter Typ (295.12)	1	18	1	1
s039	34	2	paranoider Typ (295.32)	0,16	12	1	1
s041	27	1	desorganisierter Typ (295.14)	4	28	2	2
s042	19	1	desorganisierter Typ (295.14)	4	6	1	1
s044	24	1	paranoider Typ (295.34)	1	48	1	1
s045	21	1	katatoner Typ (295.24)	2	12	2	2
s046	35	1	desorganisierter Typ (295.14)	3	12	2	2
s049	39	1	schizophreniforme St. (295.40)	1	10	1	1
s051	47	1	paranoider Typ (295.34)	1	300	3	2
s053	24	1	desorganisierter Typ (295.12)	1	36	7	2
s056	49	2	paranoider Typ (295.33)	1	12	1	1
s057	22	2	paranoider Typ (295.33)	3	3	1	1
s059	44	2	paranoider Typ (295.34)	3	240	5	2
s060	36	2	paranoider Typ (295.34)	3	12	1	1
s061	31	1	paranoider Typ (295.34)	1	6	2	2
s062	30	1	paranoider Typ (295.34)	2,5	2,5	2	2
s063	40	2	paranoider Typ (295.34)	2	4	5	2
s071	35	1	paranoider Typ (295.34)	1	12	1	1
s073	33	2	paranoider Typ (295.34)	2	120	5	2
s074	43	1	paranoider Typ (295.34)	2	212	3	2

**Tabelle 2 :** Übersicht über die 45 unbehandelten schizophrenen Patienten; aufgelistet sind die laufende Nummer der Patienten, Alter, Geschlecht (1=männlich, 2=weiblich), Diagnose, Dauer des stationären Aufenthaltes (in Monaten), Gesamtdauer der Erkrankung (in Monaten), Anzahl der Episoden und ob es sich um eine Erstmanifestation handelte oder nicht (1=ja, 2=nein).

Nach Aufnahme in die Klinik und vor der Blutabnahme erhielten 16 der Patienten für ca. ein bis drei Tage Benzodiazepine, wenn es klinisch indiziert war (z. B. bei Schlafstörungen); 29 erhielten keine Medikamente.

Da die Patienten zum Teil ein bis maximal drei Tage vor Beginn der antipsychotischen Behandlung mit Benzodiazepinen anbehandelt waren, wurden die Patienten in zwei Gruppen geteilt (Patienten, die Benzodiazepine genommen haben (n=15) und Patienten, die keine Benzodiazepine genommen haben (n=29) ), um so auszuschließen, das die Benzodiazepineinnahme einen Einfluß auf die immunologischen Parameter hatte. Es ließ sich kein Unterschied zwischen den beiden Gruppen feststellen.

Ferner wurde untersucht, ob die Art des eingenommenen Neuroleptikums Einfluß auf die Immunparameter hatte. Die Patienten wurden in vier Gruppen geteilt (Butyrophenonderivate, Phenothiazinderivate, Clozapin, andere atypische Neuroleptika).

20 (8 Frauen, 12 Männer) der Patienten wurden nach mindestens einem Monat Behandlung noch einmal untersucht. Es wurde ein Behandlungszeitraum von einem Monat gewählt, da immunologische Effekte von Neuroleptika bei einer kürzeren Behandlungsdauer nicht wahrscheinlich wären (Rapaport et al., 1991a; Rapaport et al., 1991b). Deshalb konnten nicht alle der 45 Patienten nachuntersucht werden, da die Patienten zum Teil vorzeitig entlassen oder verlegt wurden.

Das Alter der Patienten lag zwischen 20 und 63 Jahren, das Durchschnittsalter war  $32,75 \pm 9,08$  Jahre. Ihre Behandlungsdauer lag zwischen einem und vier Monaten ( $2,6 \pm 1,8$  Monaten). Die Patienten wurden mit Butyrophenonderivaten, Phenothiazinderivaten, Clozapin oder anderen atypischen Neuroleptika behandelt. Wer mit welchem Neuroleptika behandelt wurde, wurde nach medizinischen Gesichtspunkten bestimmt (Tab.3).

Nr.	Alter	Geschl.	Diagnose (DSM III R)	Stat. Dauer	Erkr. gesamt	Episode	Erstm.
sb001	44	1	katatoner Typ (295.22)	4	240	1	1
sb006	30	2	katatoner Typ (295.20)	2	48	6	2
sb010	29	2	paranoider Typ (295.34)	3	60	4	2
sb013	20	2	paranoider Typ (295.33)	4	24	1	1
sb014	28	1	paranoider Typ (295.34)	1	48	2	2
sb016	30	1	desorganisierter Typ (295.14)	1	24	4	2
sb017	31	1	paranoider Typ (295.34)	7	132	8	2
sb018	31	2	paranoider Typ (295.34)	1,5	48	1	1
sb021	38	1	paranoider Typ (295.32)	3	96	1	1
sb023	28	1	residualer Typ (295.62)	1	17	1	1
sb026	29	1	paranoider Typ (295.34)	3	36	4	2
sb029	63	2	paranoider Typ (295.34)	1	288	2	2
sb033	25	1	desorganisierter Typ (295.14)	2	24	2	2
sb041	27	1	desorganisierter Typ (295.14)	4	28	2	2
sb046	35	1	desorganisierter Typ (295.14)	3	12	2	2
sb049	39	1	schizophreniforme St. (295.40)	1	10	1	1
sb057	22	2	paranoider Typ (295.33)	3	3	1	1
sb060	36	2	paranoider Typ (295.34)	3	12	1	1
sb062	30	1	paranoider Typ (295.34)	2,5	2,5	2	2
sb063	40	2	paranoider Typ (295.34)	2	4	5	2

**Tabelle 3 :** Übersicht über die 20 behandelten schizophrenen Patienten; aufgelistet sind die laufende Nummer der Patienten, Alter, Geschlecht (1=männlich, 2=weiblich), Diagnose, Dauer des stationären Aufenthaltes (in Monaten), Gesamtdauer der Erkrankung (in Monaten), Anzahl der Episoden und ob es sich um eine Erstmanifestation handelte oder nicht (1=ja, 2=nein). Die Dauer des stationären Aufenthaltes entspricht dem Zeitraum zwischen den beiden Blutabnahmen.

41 (18 Frauen, 23 Männer) gesunde Kontrollpersonen wurden untersucht. Das Alter der Freiwilligen lag zwischen 20 und 53 Jahren, das Durchschnittsalter betrug  $29,27 \pm 7,56$  Jahre (Tab.4).

Die Kontrollpersonen durften weder an einer akuten oder chronischen Infektionskrankheit, noch an einer Autoimmunerkrankung leiden.

Nr.	Alter (Jahre)	Geschlecht (1=m)
ko001	26	1
ko002	24	2
ko003	28	1
ko004	44	2
ko005	50	2
ko006	44	1
ko007	27	2
ko008	26	1
ko009	20	2
ko010	21	2
ko011	25	1
ko012	26	1
ko013	25	2
ko014	23	2
ko017	37	2
ko018	40	1
ko019	32	1
ko020	32	1
ko021	27	1
ko022	25	1
ko023	29	2
ko024	26	1
ko025	27	1
ko026	30	1
ko027	32	1
ko028	53	2
ko029	22	2
ko030	27	1
ko031	26	1
ko032	21	2
ko033	23	2
ko035	24	2
ko036	24	1
ko037	34	1
ko038	25	2
ko039	26	2
ko040	27	1
ko041	28	1
ko043	35	1
ko044	31	2
ko045	28	1

**Tabelle 4** : Übersicht über die 41 Kontrollpersonen; aufgelistet sind die laufende Nummer der freiwilligen Probanden, Alter und Geschlecht (1=männlich, 2=weiblich).

Bei 32 (12 Frauen, 20 Männer) der 45 schizophrenen Patienten wurde eine Entnahme von Liquor cerebrospinalis vorgenommen. Das Durchschnittsalter lag bei  $30,09 \pm 9,85$  Jahren.

Eine Liquorpunktion wurde nur bei klinischer Indikation vorgenommen, d. h. bei Patienten, die erstmals eine schizophrene Episode hatten und bei Patienten, bei denen noch nie Liquor untersucht wurde, um eine organische Ursache der Erkrankung, speziell einen entzündlichen Prozeß auszuschließen.

Nr.	Alter	Geschl.	Diagnose (DSM III R)	Stat. Dauer	Erkr. gesamt	Episode	Erstm.
s001	44	1	katatoner Typ (295.22)	4	240	1	1
s003	26	1	paranoider Typ (295.31)	1	12	1	1
s005	18	2	desorganisierter Typ (295.12)	3	36	4	2
s007	26	1	desorganisierter Typ (295.13)	0,03	3	1	1
s009	19	1	paranoider Typ (295.13)	0,5	5	2	2
s010	29	2	paranoider Typ (295.34)	3	60	4	2
s011	22	1	desorganisierter Typ (295.14)	0,03	24	2	2
s013	20	2	paranoider Typ (295.33)	4	24	1	1
s014	28	1	paranoider Typ (295.34)	1	48	2	2
s015	21	1	schizophreniforme Störung (295.40)	0,5	1	1	1
s016	30	1	desorganisierter Typ (295.14)	1	24	4	2
s017	31	1	paranoider Typ (295.34)	7	132	8	2
s019	30	1	paranoider Typ (295.34)	0,2	48	3	2
s023	28	1	residualer Typ (295.62)	1	17	1	1
s026	29	1	paranoider Typ (295.34)	3	36	4	2
s028	24	1	paranoider Typ (295.34)	1	7	2	2
s029	63	2	paranoider Typ (295.34)	1	288	2	2
s039	34	2	paranoider Typ (295.32)	0,16	12	1	1
s041	27	1	desorganisierter Typ (295.14)	4	28	2	2
s042	19	1	desorganisierter Typ (295.14)	4	6	1	1
s044	24	1	paranoider Typ (295.34)	1	48	1	1
s045	21	1	katatoner Typ (295.24)	2	12	2	2
s049	39	1	schizophreniforme St. (295.40)	1	10	1	1
s051	47	1	paranoider Typ (295.34)	1	300	3	2
s053	24	1	desorganisierter Typ (295.12)	1	36	7	2
s056	49	2	paranoider Typ (295.33)	1	12	1	1
s057	22	2	paranoider Typ (295.33)	3	3	1	1
s061	31	1	paranoider Typ (295.34)	1	6	2	2
s062	30	1	paranoider Typ (295.34)	2,5	2,5	2	2
s063	40	2	paranoider Typ (295.34)	2	4	5	2
s071	35	1	paranoider Typ (295.34)	1	12	1	1
s073	33	2	paranoider Typ (295.34)	2	120	5	2

**Tabelle 5 :** Übersicht über die 32 schizophrenen Patienten bei denen eine Liquorpunktion vorgenommen wurde; aufgelistet sind die laufende Nummer der Patienten, Alter, Geschlecht (1=männlich, 2=weiblich), Diagnose, Dauer des stationären Aufenthaltes (in Monaten), Gesamtdauer der Erkrankung (in Monaten), Anzahl der Episoden und ob es sich um eine Erstmanifestation handelte oder nicht (1=ja, 2=nein).



## 4 Methoden

### 4.1 Isolierung von Lymphozyten aus Vollblut

Die Lymphozyten wurden nach einem von Boyum (Boyum, 1984) beschriebenen Verfahren isoliert.

Die Auftrennung der mononukleären Zellen von Granulo- und Erythrozyten erfolgte mittels einem Dichtegradienten.

Ficoll dient dabei aufgrund seiner Dichte und Viskosität als Trennmedium.

Man überschichtet vorsichtig Ficoll mit Vollblut. Während der Zentrifugation erfolgt dann die Auftrennung, so daß sich die mononukleären Zellen, d. h. Lymphozyten und Monozyten, in der Phase zwischen Plasma und Ficoll befinden. Die Erythro- und Granulozyten wandern durch das Trennmedium und setzen sich am Grunde des Gefäßes ab.

Protokoll zur Lymphozytenabtrennung unter sterilen Bedingungen:

40 ml Vollblut wurde mit 400µl Heparin versetzt, gemischt und anschließend 10 min bei 2000 U zentrifugiert. Daraufhin wurde das Plasma abgenommen und der Rückstand im Verhältnis 1:2 mit RPMI verdünnt.

13 ml Ficoll wurden vorgelegt und mit dem Blut\Medium-Gemisch überschichtet, nach 20 min Zentrifugation bei 2000 U, die Lymphozytenringe abgenommen und immer zwei in einem neuem Röhrchen vereinigt.

Die Röhrchen wurden mit RPMI aufgefüllt, kurz gemischt und erneut zentrifugiert, 12 min bei 1800 U, danach der Überstand abgekippt, die Pellets mit 10 ml Medium resuspendiert und in einem Röhrchen vereinigt, die leeren Röhrchen noch einmal mit wiederum 10 ml RPMI nachgespült und vereinigt.

50 µl der Zellsuspension wurden entnommen und mit 50 µl Trypanblau gemischt, um in der Neubauerkammer die Zellzählung vorzunehmen.

## **4.2 Einfrieren und Auftauen der Zellen**

Die einzufrierenden Zellen werden in dem erforderlichem Volumen Einfriermedium, bestehend aus 20% DMSO und 50% FCS in RPMI langsam resuspendiert und auf Eis in Einfrierröhrchen pipettiert.

Über eine Gefrierkette von beginnend mit  $-20^{\circ}\text{C}$  über  $-70^{\circ}\text{C}$  bis zum Stickstofftank ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) werden die Zellen langsam eingefroren, wo sie bis zur Analyse verbleiben.

Das Auftauen erfolgt möglichst schnell durch Schwenken im  $37^{\circ}\text{C}$ -Wasserbad.

Die Zellsuspension wird in ein Zentrifugenröhrchen überführt und mit Auftaumedium, bestehend aus 30% FCS in RPMI aufgefüllt und zentrifugiert.

Nach nochmaligem Waschen mit RPMI erfolgt die Zellzählung mit Coulter, sowie eine Trypanblaufärbung und Zählung in der Neubauerkammer zur Bestimmung der Anzahl der toten Zellen.

## **4.3 Immunfluoreszenz**

### **4.3.1 Färben**

#### **4.3.1.1 Konzentration der Zellen**

Um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten, mußte eine Standardisierung der Zell- sowie der Antikörperkonzentration vorgenommen werden. Leitgedanke war dabei, die Konzentration so zu wählen, daß nur hochaffine Antigen-Antikörper-Reaktionen und nicht niedrigaffine Kreuzreaktionen möglich sind. Andererseits sollte die Färbung möglichst intensiv sein.

Das Färbevolumen wurde auf  $40\ \mu\text{l}$  mit einer Zellkonzentration von  $2,5 \times 10^5$  eingestellt.

#### **4.3.1.2 Konzentration der Färbereagentien**

Zur Optimierung der Färbung wurden die Antikörper einzeln austitriert, da zu niedrige Konzentrationen zu schlechter Diskriminanz zwischen positiven und negativen Zellpopulationen, bis hin zu überlappenden Verteilungen führen können und so die statistische Auswertung sehr erschweren oder unmöglich

machen. Zu hohe Konzentrationen führen zu unspezifischer Anfärbung negativer Zellen, aufgrund niedrigaffiner Kreuzreaktionen, was wiederum zu Fehlinterpretationen führt.

Die Titration erfolgte durch Färbung unter standardisierten Bedingungen, d. h. die Zellkonzentration, das Färbervolumen, die Färbezeit, die Temperatur und die Waschschriffe blieben gleich, der einzige Parameter, der verändert wurde war die Konzentration des auszutitrierenden Antikörpers.

So wurden folgende Konzentrationen ermittelt:

Endverdünnung:

CD 3	FITC	1 :	500
CD 4	PE	1 :	25
CD 4	TC	1 :	50
CD 8	TC	1 :	100
CD 11a	FITC	1 :	10
CD 49d	PE	1 :	10
$\gamma\delta$ T-Zellrezeptor	FITC	1 :	10

Isotypkontrollen:

IgG1	FITC	1 :	8
IgG2	PE	1 :	5

#### 4.3.1.3 Färbezeit und Färbetemperatur

Die Zeit und die Temperatur, bei der die Färbung vorgenommen wird ist wichtig, um gute Färbungen zu erhalten. Die Färbezeit sollte nicht zu lang sein, da sonst unspezifische Nebenreaktionen, wie z.B. Kreuzreaktionen oder Absorptionen auftreten können. Die Färbetemperatur bei lebenden Zellen sollte nicht mehr als 12°C betragen, um stoffwechselbedingte Beeinflussung zu verhindern. Lymphozyten können durch "Capping" kreuzvernetzte Rezeptoren mit den

färbenden Antikörper abwerfen und erscheinen dann als negative Zellen im Durchflußzytometer.

Deshalb wurde festgelegt, die Zellen mit den Antikörpern 30 min auf Eis zu inkubieren, um so eine optimale Färbung zu erzielen.

#### **4.3.1.4 Waschen**

Das Waschen, das Entfernen ungebundener Antikörper durch Abzentrifugieren und Aufnahme der Zellen in frisches Medium, führt fast immer zu Verlusten und sollte deshalb auf das unbedingt nötige Maß beschränkt werden.

So wurde bei dieser direkten Färbung einmal gewaschen.

#### **4.3.1.5 Fixierung**

Die Zellen wurden mit 1% Paraformaldehyd fixiert. Die Fixierung soll Infektionsrisiken minimieren und erlaubt, die Zellen mehrere Tage ohne Beeinflussung der Ergebnisse aufzubewahren (Lifson et al., 1986)

### **4.3.2 Messung mit Durchflußzytometer**

#### **4.3.2.1 Durchflußzytometer**

Das Durchflußzytometer ist ein optisches Meßsystem das Streulicht- und Fluoreszenzsignale einzelner in einem Flüssigkeitsstrom fokussierter Partikel analysiert.

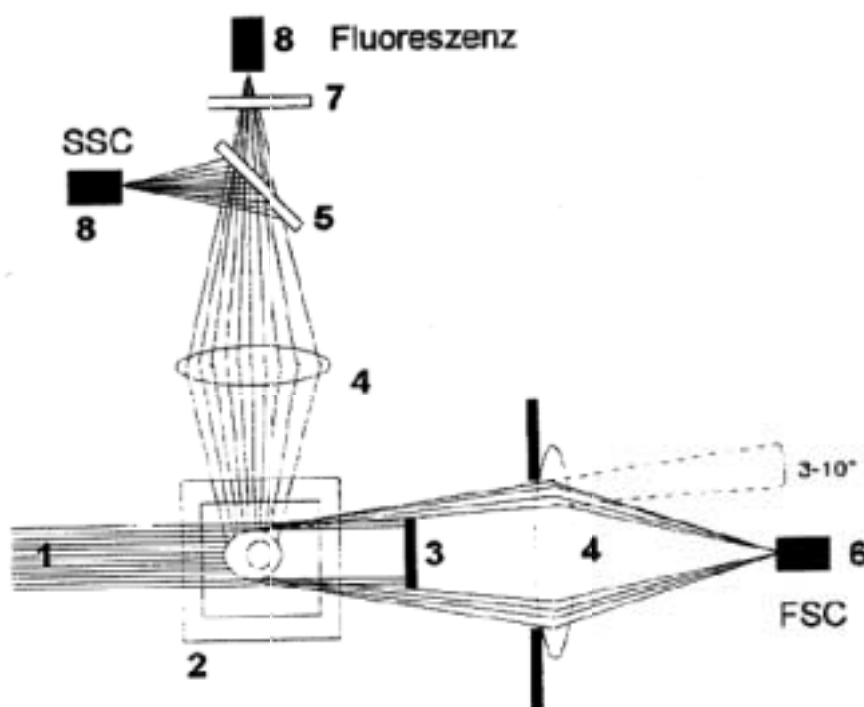
Die Durchflußzytometrie ist eine relativ junge Technologie. In den 60er und 70er Jahren entwickelten mehrere Arbeitsgruppen unabhängig voneinander Geräte zur Messung von Tumorzellen, Lymphozyten und Bakterien mit Hilfe von Protein-, Nukleinsäurefarbstoffen und fluoreszenzmarkierten Antikörpern.

Durchflußzytometer arbeiten überwiegend mit optischen Meßprinzipien. Zellen werden über Mehrfarbenfluoreszenzmessungen differenziert. Der Schwerpunkt dieser Messung liegt nicht bei der Zählung von Zellen, sondern bei der

analytischen Charakterisierung heterogener Zellsysteme unterschiedlicher Herkunft.

Die zu messenden Zellen werden in einer Trägerflüssigkeit zum Analysepunkt geleitet, an dem sie vom fokussierten Lichtstrahl einer Lichtquelle beleuchtet werden. Als Lichtquelle wird ein Argonlaser mit einer Wellenlänge von 488nm verwendet.

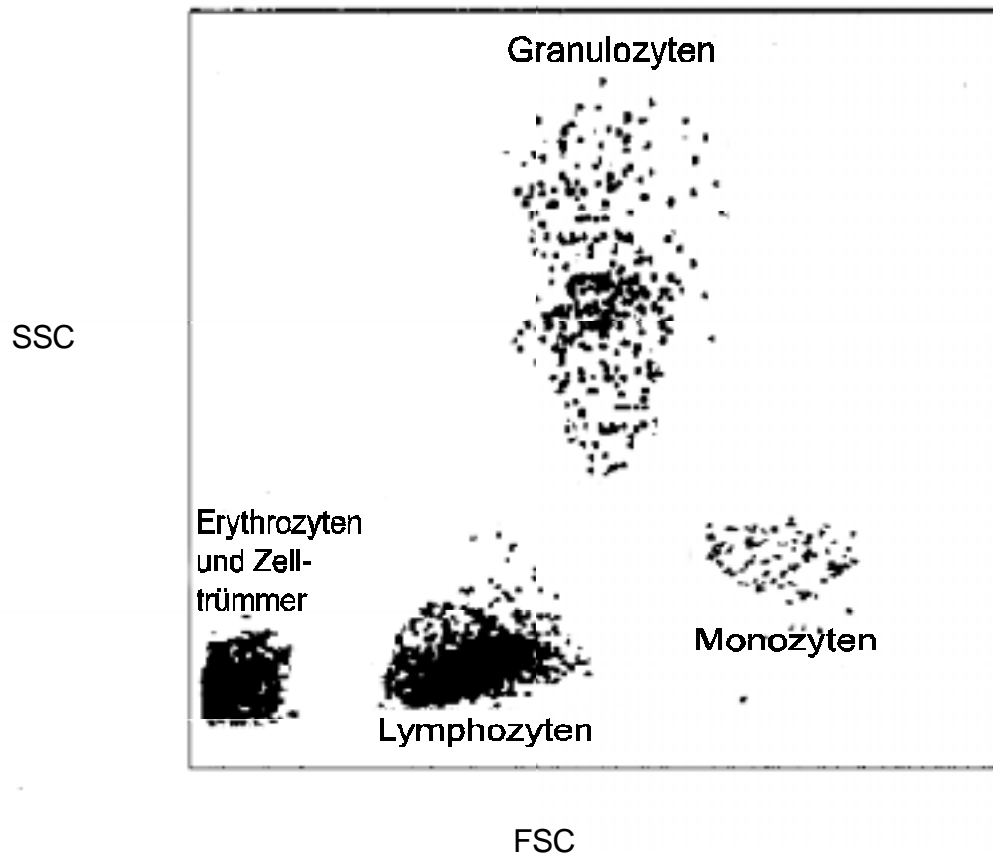
Die Fluoreszenz- und Streulichtemissionen jeder einzelnen Zelle werden vom optischem Detektionssystem (Abb.2) und der Elektronik quantifiziert. Somit besteht eine Analyse aus der Summe vieler Einzelmessungen.



**Abbildung 2 :** Schematische Darstellung des optischen Systems eines Durchflußzytometers; 1=Laserstrahl, 2=Quarzglaszuvette, 3=Blockerstreifen, 4=Sammellinse, 5=Teilerspiegel, 6=Photodiode, 7=Lichtfilter, 8=Photomultiplier.

Die Streulichtemissionen können in Vorwärtsstreulicht ( $0-10^\circ$ ) und in Seitwärtsstreulicht ( $90^\circ$ ) unterteilt werden, wobei das Vorwärtsstreulicht sensitiv für die Querschnittsfläche ist und somit Informationen über die Zellgröße gibt. Das Seitwärtsstreulicht hingegen gibt Auskunft über die Granularität, Membranfaltung und äußere Form. Mittels dieser beiden Lichtstreuparameter lassen sich die wichtigsten Leukozytengruppen, wie Lymphozyten, Monozyten und neutrophile Granulozyten unterscheiden (Abb.3). Mit diesen Voraussetzungen lassen sich die Lymphozyten unter den

verschiedenen Leukozytenuntergruppen bei der Immunfluoreszenzanalyse eingrenzen in einem Fenster, daß sogenannte "Gating".



**Abbildung 3** : Dotplot, auf dem die verschiedenen Zellen aufgrund ihrer Größe (x-Achse) und Granularität (y-Achse) in einem bestimmten Bereich erscheinen.

Sind die Zellen mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert können zusätzliche Parameter dieser Zelle gemessen werden. Als Fluoreszenzfarbstoffe dienen Fluorescein (FITC), Phycoerythrin (PE) und Tricolor (TC), die mit 488nm angeregt werden können. Die Farbstoffe emittieren verschiedene Wellenlängen, so kann man eine Zelle mit mehreren Farbstoffen markieren und durch bestimmte Filter die Signale getrennt verarbeiten.

#### 4.3.3 Datenauswertung

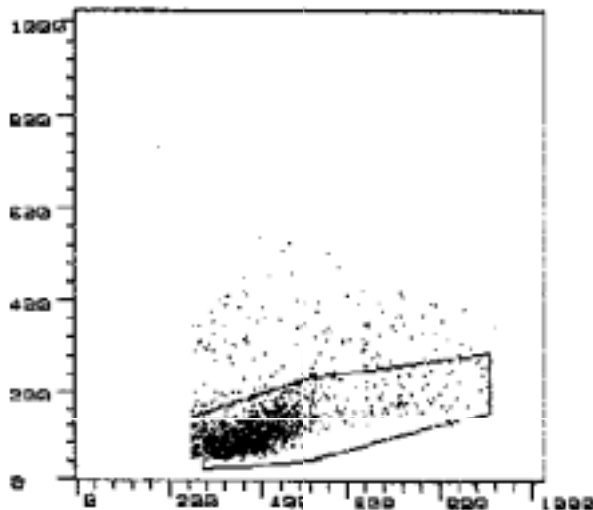
Die Proben wurden am selben oder nächsten Tag am Durchflußzytometer ausgewertet.

Für die Datenaufnahme und spätere Verarbeitung wurde das Programm Facscan Software Version B von Becton&Dickinson verwendet.

Zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse, wurde bei den ersten fünf Messungen immer, dann bei jeder fünften Messung eine Interessaykontrolle mitgeführt.

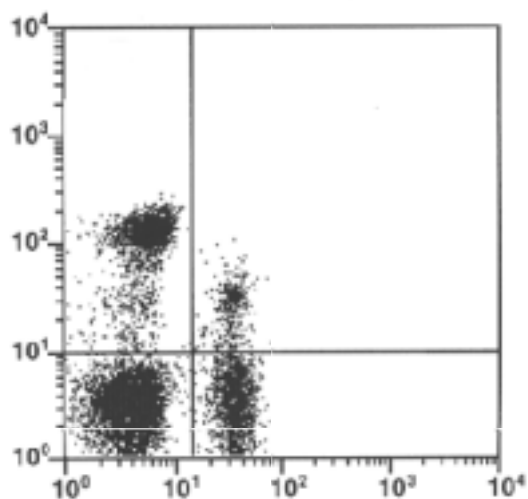
Es werden zwischen 5000 und 10000 Zellen für jede Probe aufgezeichnet. Dabei werden durch ein entsprechendes Aufnahme Fenster die Zellen so eingegrenzt, daß möglichst nur Lymphozyten aufgenommen werden.

Bei der weiteren Auswertung werden die aufgenommen Zellen durch ein sogenanntes Analysefenster noch einmal eingegrenzt, um so andere Zellpopulationen wie Monozyten und Zelltrümmer nicht in die Berechnung mit einzubeziehen (Abb.4).

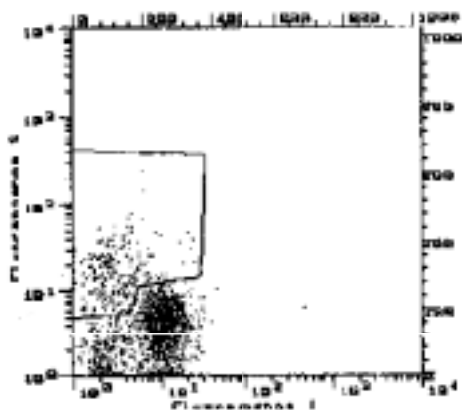


**Abbildung 4** : Dotplot, auf dem die Lymphozyten nochmals eingegrenzt wurden, um Monozyten und Zelltrümmer nicht in die Berechnung mit einzubeziehen.

Die Berechnung der Verteilung der verschiedenen Lymphozytensubpopulationen erfolgte zum einen mittels der Quadrantenanalyse (Abb.5), zum anderen bei Populationen, die sich nicht gut voneinander abgrenzen ließen, erfolgt die Auswertung mit Hilfe eines Histogrammes (Abb.7).

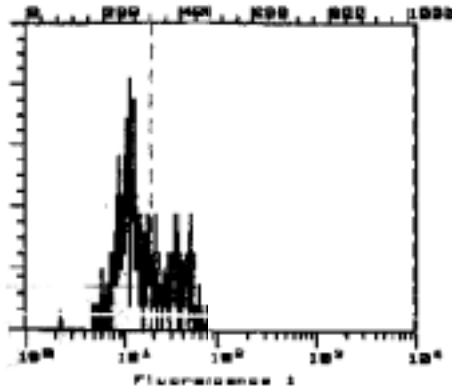


**Abbildung 5** : Dotplot, auf dem zwei Fluoreszenzen gegeneinander aufgetragen werden; hier wurden CD 8 positive – Lymphozyten gegen  $\gamma\delta$ + - Lymphozyten aufgetragen und mittels eines Analysekreuzes in vier Quadranten unterteilt.



**Abbildung 6** : Dotplot, auf dem die CD8 positiven –Zellen mittels eines "Gates" eingegrenzt wurden; hier sind zwei Fluoreszenzen gegeneinander aufgetragen, auf der x – bzw. y – Achse wird die Fluoreszenzintensität dargestellt.





**Abbildung 7** : Histogramm, bei dem die Fluoreszenzintensität (x-Achse) dargestellt wird; in der y-Achse ist die Anzahl der Ereignisse dargestellt; mit dem "Cursor" (gestrichelte Linie) lassen sich die schwach fluoreszierenden von den stark fluoreszierenden Zellen trennen, links davon befinden sich hier die CD11a schwach positiven Zellen und rechts die stark positiven.

Mit Hilfe der Dotplotanalyse wurden die CD3+/CD4+ und der CD3+/CD8+ Zellen, sowie die  $\gamma\delta$ -Lymphozyten ausgewertet. Für die statische Auswertung wurde ein Kreuz in das jeweilige Analysefenster (Abb. 5) eingefügt, das positive und negative Zellpopulationen trennt, und so eine prozentuale Bestimmung der einzelnen Populationen ermöglicht.

LFA-1 (CD11a) positive - und VLA-4 (CD49d) positive – Lymphozyten wurden mit Hilfe eines Histogramms ausgewertet (Abb. 7). Es wurde zuerst unter Zuhilfenahme eines Dotplots (Abb. 6) die CD4 bzw. CD8 positiven Zellen eingegrenzt und dann im Histogramm alle CD4 bzw. CD8 positiven Zellen, die LFA-1 (CD11a) positiv bzw. und VLA-4 (CD49d) positiv sind dargestellt (Abb. 7). Mit Hilfe eines Cursors ließen sich die positiven von den negativen Zellen trennen und so ein Prozentwert ermitteln.

Die erhaltenen Prozentwerte wurden in Exceltabellen eingegeben und so Mittelwerte und Standardabweichung berechnet.

#### 4.4 Untersuchung des Liquor cerebrospinalis

Der Liquor wurde mit Hinblick auf den Gesamteiweißgehalt, Albumin, IgG und Serum/Liquor- Quotient von IgG und Albumin. Albumin und Immunglobulin wurden mit der immunonephelometrischen Methode, mittels einem Beckmann Nephelometer bestimmt (Beckmann, München, Deutschland).

Bei der Immunonephelometrie handelt es sich um eine fotometrische Methode: Die Antigen – haltige Probe und korrespondierendes Antiserum werden in eine Meßküvette gegeben, es bilden sich Antigen – Antikörper – Komplexe aus. Durch diese Küvette geschickte Strahlen eines Lasers werden an den Immunkomplexen gestreut und das Streulicht über ein Linsensystem auf einen Fotodetektor fokussiert. Das vom Streulicht erzeugte elektrische Signal des Fotodetektors ist proportional der Immunkomplexkonzentration.

Die Referenzwerte des Liquoralbumins und der Liquorschrankenfunktion wurden bestimmt mit Hilfe von Werten von 396 Personen mit einer normalen Blut-Liquorschrankenfunktion oder einer reinen Schrankenstörung ohne eine humorale Immunantwort innerhalb des ZNS (Reiber und Felgenhauer, 1987).

#### **4.5 Statistische Methoden**

Bei dieser Arbeit handelt es sich um eine explorative Untersuchung.

Als statistischer Test zum Vergleich der Schizophrenen mit der Kontrollgruppe, sowie zum Vergleich der Gruppe der Schizophrenen unter der Therapie mit Neuroleptika mit der Kontrollgruppe wurde der zweiseitige Student`s t-Test für unverbundene Stichproben eingesetzt, da es sich um kleine Umfänge mit normalverteilten Daten mit gleichen Varianzen handelt.

Mit dem t-Test für verbundene Stichproben wurden die Daten der schizophrenen Patienten ausgewertet, die zweimal, also vor der und unter Behandlung mit Neuroleptika, untersucht wurden.

Beim Vergleich der Daten der Patienten mit Blut-Liquorschrankenstörung mit denen ohne Blut-Liquorschrankenstörung wurde der Mann-Whitney-U-Test verwendet, da die Daten nicht normalverteilt waren und unterschiedliche Varianzen hatten.

## 5 Ergebnisse

Um Auffälligkeiten am Immunsystem von Schizophrenen zu untersuchen, wurde die Expression von verschiedenen Oberflächenmolekülen auf Lymphozyten mittels Durchflußzytometrie von 45 Schizophrenen vor der medikamentösen Behandlung und 41 gesunden Kontrollpersonen gemessen. Bei 20 der 45 schizophrenen Patienten wurde nach der Behandlung mit Neuroleptika erneut die Expression der verschiedenen Oberflächenmoleküle bestimmt, mittels dem t-test für verbundene Stichproben konnte so der Einfluß der Neuroleptika untersucht werden.

Bei 32 der Schizophrenen wurden Liquorproben entnommen und untersucht um u. a. etwaige Blut–Liquorschrankenstörungen aufzudecken.

Die Mittelwerte, der bei der Liquoruntersuchung bestimmten Parameter wie Gesamteiweiß, Albumin, IgG und Serum/Liquor- Quotient von IgG und Albumin lagen im Normbereich.

Bei drei (9%) von 32 Patienten fand sich eine Gesamteiweißhöhung, ein IgG-Anstieg im Liquor zeigte sich bei zwei Patienten (6%).

Eine Blut-Liquorschrankenstörung zeigte sich bei 6 der Patienten (19%).

Die 32 Patienten wurden in zwei Gruppen unterteilt: Patienten mit Blut–Liquorschrankenstörung (n=6; 19%) gegenüber Patienten ohne Blut–Liquorschrankenstörung (n=26; 81%).

### 5.1 Adhäsionsmolekülrezeptoren: LFA-1 (CD11a), VLA-4 (CD49d)

Um mögliche Veränderungen der Population von LFA-1 (CD11a)- und VLA-4 (CD49d) positiven Lymphozyten bei Schizophrenen gegenüber gesunden Kontrollpersonen festzustellen, wurden die mit fluoreszierenden Antikörpern markierten Lymphozyten mittels Durchflußzytometrie analysiert.

Die Auswertung der LFA-1 (CD11a)- positiven Lymphozyten und der VLA-4 (CD49d)- positiven Lymphozyten erfolgte anhand eines Histogramms, wobei für CD4-positive bzw. CD8-positive Lymphozyten ein Gate gesetzt (siehe Kapitel 4.3.3), und dann die Fluoreszenzstärke für diese Zellen gemessen wurde. Mit

Hilfe einer Unterteilung wurde nur der Anteil, der stark fluoreszierenden (LFA-1 bzw. VLA-4 stark expremiert) CD4+ bzw. CD8+ Zellen gemessen.

### 5.1.1 Adhäsionsmolekülrezeptoren: LFA-1 (CD11a), VLA-4 (CD49d) bei Kontrollen, unbehandelten und behandelten Patienten

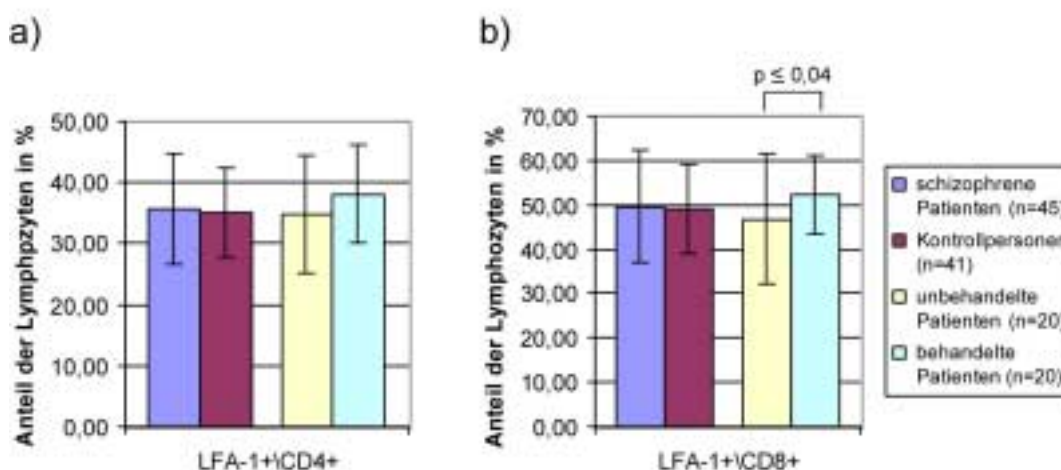
Bei der Expression von LFA-1 auf CD4+ Zellen fand sich kein Unterschied, weder zwischen den Kontrollpersonen und den unbehandelten Patienten noch den behandelten Patienten (Tab.6).

Die Expression von LFA-1 auf CD8+ Zellen zeigte auch keinen signifikanten Unterschied beim Vergleich der Kontrollgruppe, der unbehandelten Schizophrenen und der behandelten Schizophrenen.

Es ließ sich jedoch eine stärkere Expression von LFA-1 auf CD8+ - Zellen, beim Vergleich der schizophrenen Patienten vor der medikamentösen Behandlung und danach (unbehandelt: Mittelwert  $46,7 \pm 14,7$ ; behandelt: Mittelwert  $52,2 \pm 8,9$ ;  $p \leq 0,04$ ) (Tab.6) feststellen.

Lymphozytenpopulationen:		LFA-1+/CD4+	LFA-1+/CD8+
Kontrollen (ko; n = 41)		$35,1 \pm 7,2$	$49,1 \pm 10,0$
schizophrene Patienten (s; n = 45)		$35,7 \pm 8,9$	$49,6 \pm 12,7$
behandelte Patienten (n=20):	Vor der Behandlung (su)	$34,9 \pm 9,6$	$46,7 \pm 14,7^*$
	Nach der Behandlung (sb)	$38,1 \pm 8,1$	$52,2 \pm 8,9$

**Tabelle 6** : Aufgelistet sind die Anteile der LFA-1/CD4-positiven und LFA-1/CD8-positiven Zellen von vier Gruppen mit Mittelwert und Standardabweichung in Prozent. Insgesamt wurden 45 Patienten untersucht, 20 Patienten wurden unter medikamentöser Behandlung erneut untersucht. \*Unterschied zu behandelten Patienten signifikant mit  $p < 0,04$ .



**Diagramm 1:** Dargestellt sind die Anteile der LFA-1-positiven Lymphozyten von a) CD4-positiven und b) CD8-positiven Zellen von vier verschiedenen Gruppen mit Mittelwert und Standardabweichung in Prozent. Insgesamt wurden 45 Patienten untersucht, von denen 20 medikamentös behandelt wurden.

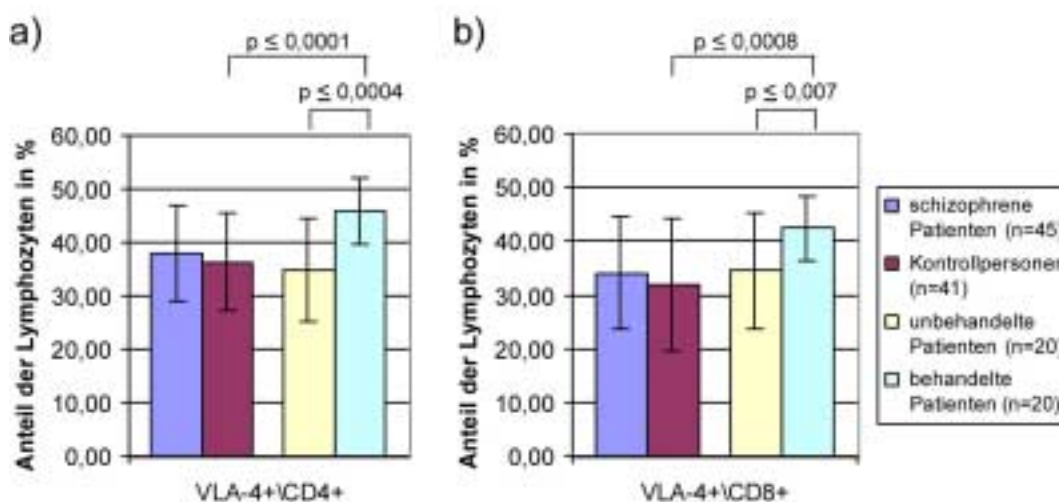
Es ließ sich kein Unterschied bei der Expression von VLA-4 auf CD4+ und CD8+ Zellen zwischen unbehandelten schizophrenen Patienten und gesunden Kontrollpersonen feststellen.

Jedoch zeigte sich bei den medikamentös behandelten schizophrenen Patienten eine signifikant stärkere Expression sowohl von VLA-4 auf CD4+ - Zellen ( $p \leq 0,0001$ ) als auch von VLA-4 auf CD8+ - Zellen ( $p \leq 0,0008$ ) im Vergleich mit den Kontrollpersonen (Tab.7).

Des Weiteren wurde die Expression von VLA-4 auf CD4+ und CD8+ Zellen der unbehandelten und medikamentös behandelten schizophrenen Patienten miteinander verglichen. Dabei ergab sich ein signifikant höherer Wert sowohl bei den VLA-4+/CD4+ Zellen (unbehandelt: Mittelwert  $34,7 \pm 9,7$ ; behandelt: Mittelwert  $46,0 \pm 6,2$ ;  $p \leq 0,0004$ ) als auch bei den VLA-4+/CD8+ Zellen (unbehandelt: Mittelwert  $34,5 \pm 10,7$ ; behandelt: Mittelwert  $42,4 \pm 6,1$ ;  $p \leq 0,007$ ) der behandelten Patienten mit Hilfe des gepaarten t – Tests (Tab.7).

Lymphozytenpopulationen:		VLA-4+/CD4+	VLA-4+/CD8+
Kontrollen (ko; n = 41)		36,3 ± 9,1*	32,0 ± 12,3***
schizophrene Patienten (s; n = 45)		37,9 ± 9,0	34,0 ± 10,5
behandelte Patienten (n=20):	Vor der Behandlung (su)	34,7 ± 9,7**	34,5 ± 10,7****
	Nach der Behandlung (sb)	46,0 ± 6,2	42,4 ± 6,1

**Tabelle 7** : Aufgelistet sind die Anteile der VLA-4/CD4-positiven und VLA-4/CD8-positiven Zellen von vier verschiedenen Gruppen mit Mittelwert und Standardabweichung in Prozent. Insgesamt wurden 45 Patienten untersucht, 20 Patienten wurden unter medikamentöser Behandlung erneut untersucht. \*Unterschied zu behandelten Patienten signifikant mit  $p < 0,0001$ . \*\*Unterschied zu behandelten Patienten signifikant mit  $p < 0,0004$ . \*\*\*Unterschied zu behandelten Patienten signifikant mit  $p < 0,0008$ . \*\*\*\*Unterschied zu behandelten Patienten signifikant mit  $p < 0,007$ .



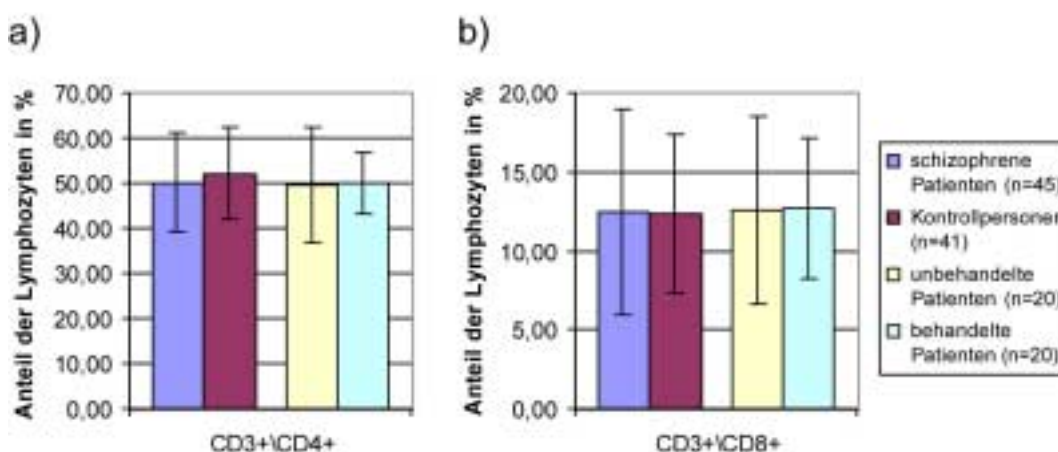
**Diagramm 2** : Dargestellt sind die Anteile der VLA-4-positiven Lymphozyten von a) CD4-positiven und b) CD8-positiven Zellen von vier verschiedenen Gruppen mit Mittelwert und Standardabweichung in Prozent. Insgesamt wurden 45 Patienten untersucht, von denen 20 medikamentös behandelt wurden.

Um auszuschließen, daß Unterschiede in der Expression von VLA-4 und LFA-1 auf CD4+ bzw. auf CD8+ Zellen, auf Grund von Unterschieden in der

Gesamtzahl der CD4+ bzw. der CD8+ Zellen verursacht wurden, wurde die Zellzahl der CD3+/CD4+ und der CD3+/CD8+ Zellen in den verschiedenen Gruppen bestimmt. Es ließ sich kein signifikanter Unterschied feststellen (Tab.8).

Lymphozytenpopulationen:		CD3+/CD4+	CD3+/CD8+
Kontrollen (ko; n = 41)		52,2 ± 10,3	12,3 ± 5,0
schizophrene Patienten (s; n = 45)		50,1 ± 11,0	12,4 ± 6,5
behandelte Patienten (n=20):	Vor der Behandlung (su)	49,8 ± 12,8	12,6 ± 5,9
	Nach der Behandlung (sb)	50,0 ± 6,8	12,7 ± 4,4

**Tabelle 8** : Aufgelistet sind die CD4-positiven- und CD8-positiven T-Zellen von vier verschiedenen Gruppen mit Mittelwert und Standardabweichung in Prozent. Insgesamt wurden 45 Patienten untersucht, 20 Patienten wurden unter medikamentöser Behandlung erneut untersucht.



**Diagramm 3**: Dargestellt sind in a) die Anteile der CD3+/CD4+ Lymphozyten und in b) der CD3+/CD8+ Lymphozyten von vier verschiedenen Gruppen mit Mittelwert und Standardabweichung in Prozent. Insgesamt wurden 45 Patienten untersucht, von denen 20 medikamentös behandelt wurden.

### 5.1.2 Adhäsionsmolekülrezeptoren: LFA-1 (CD11a), VLA-4 (CD49d) bei Patienten mit gestörter Blut-Liquorschranke

Bei 32 der 45 unbehandelten Schizophrenen wurden, da eine medizinische Indikation vorlag, Liquorproben entnommen und untersucht, um einen entzündlichen Prozeß auszuschließen und etwaige Blut-Liquorschrankenstörungen. So war es möglich Auswirkungen einer Blut-Liquorschrankenstörung in Bezug auf die Expression von LFA-1 und VLA-4 auf T-Zellen zu untersuchen.

Die 32 Patienten wurden in zwei Gruppen unterteilt: Patienten mit Blut-Liquorschrankenstörung (n=6; 19%) gegenüber Patienten ohne Blut-Liquorschrankenstörung (n=26; 81%).

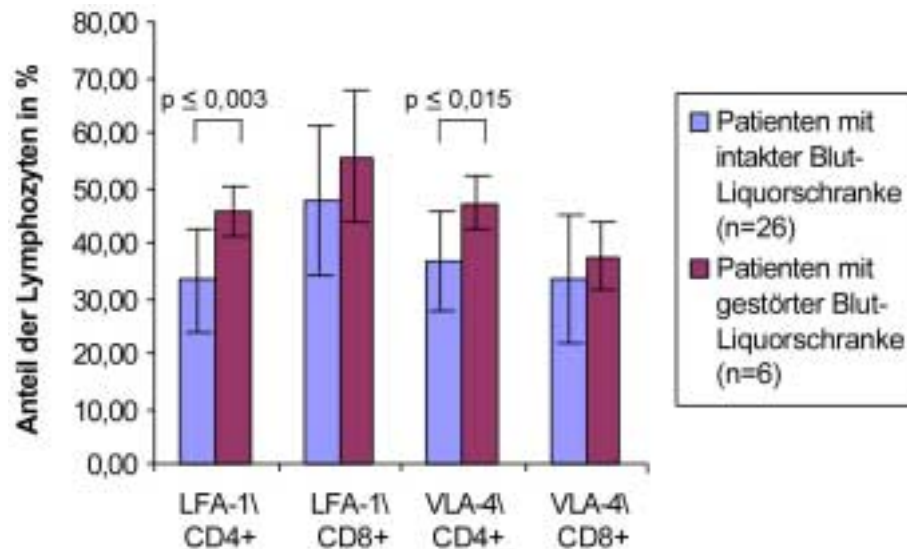
Es fand sich kein Unterschied bei der Expression von VLA-4 und LFA-1 auf den CD8+ Zellen (Tab.9).

Im Gegensatz dazu gab es eine signifikant stärkere Expression von VLA-4 ( $p \leq 0,015$ ) und LFA-1 ( $p \leq 0,003$ ) auf den CD4+ Zellen bei den Patienten mit gestörter Blut-Liquorschranke gegenüber den Patienten mit intakter Blut-Liquorschranke (Tab.9).

Lymphozytenpopulation	Patienten mit intakter Blut-Liquorschranke (n=26)	Patienten mit gestörter Blut-Liquorschranke (n=6)
LFA-1+/CD4+	32,65 ± 9,18*	45,32 ± 4,57
LFA-1+/CD8+	47,19 ± 13,75	55,00 ± 12,01
VLA-4+/CD4+	36,14 ± 9,24 **	46,63 ± 5,00
VLA-4+/CD8+	32,93 ± 11,44	37,04 ± 6,33

**Tabelle 9** : Dargestellt sind die Anteile der LFA-1-positiven und VLA-4-positiven T-Zellen bei Patienten mit intakter bzw. gestörter Blut-Liquorschranke mit Mittelwert und Standardabweichung in Prozent; \*Unterschied zu Patienten mit gestörter Blut-Liquorschranke signifikant mit  $p < 0,003$ . \*\*Unterschied zu Patienten mit gestörter Blut-Liquorschranke signifikant mit  $p < 0,015$ .





**Diagramm 4:** Dargestellt sind die Anteile der LFA-1 und VLA-4-positiven Lymphozyten von CD4-positiven und CD8-positiven Zellen der zwei Gruppen (Patienten mit intakter Blut-Liquorschranke und Patienten mit gestörter Blut-Liquorschranke) mit Mittelwert und Standardabweichung in Prozent.

## 5.2 Der $\gamma\delta$ T-Zellrezeptor

Um mögliche Veränderungen der Population der  $\gamma\delta$ T-Zellrezeptor+ Lymphozyten bei Schizophrenen (unbehandelt und mit Neuroleptika behandelt) gegenüber gesunden Kontrollpersonen festzustellen, wurden die mit fluoreszierenden Antikörpern markierten Lymphozyten mittels Durchflußzytometrie analysiert.

Die Auswertung der  $\gamma\delta$ +Lymphozyten erfolgte anhand eines Dotplots mit Hilfe der Quadrantenanalyse (siehe Kapitel 4.3.3). Die  $\gamma\delta$ T-Zellrezeptor+ Lymphozyten konnten so gut identifiziert und ihr Anteil an der Gesamtpopulation der Lymphozyten bestimmt werden.

### 5.2.1 Der $\gamma\delta$ T-Zellrezeptor bei Kontrollen, unbehandelten und behandelten Patienten

Die Untersuchung der Gesamtzahl der  $\gamma\delta$ +Lymphozyten ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen unbehandelten Patienten (4,3%  $\pm$  3,3%) und Kontrollen (3,4%  $\pm$  2,8%), sowie zwischen behandelten Patienten (3,3%  $\pm$  2,3%) und Kontrollpersonen. Die Differenz zwischen unbehandelten Patienten

und Kontrollen ( $p < 0,19$ ), sowie zwischen behandelten Patienten und Kontrollpersonen ( $p < 0,77$ ) lag unter dem Signifikanzniveau von  $p < 0,05$ .

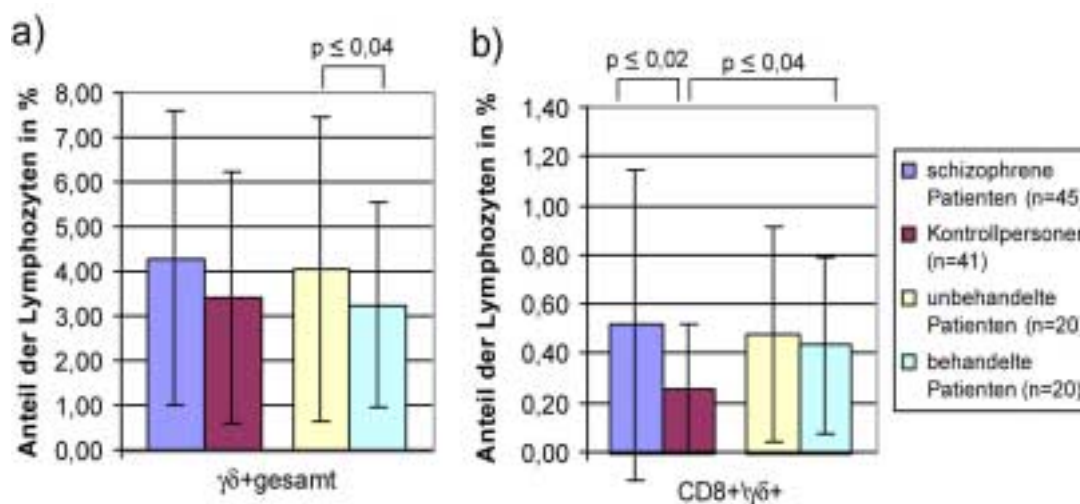
Beim Vergleich der unbehandelten mit den behandelten Schizophrenen ließ sich mit dem gepaarten t-Test eine signifikant niedrigere Zahl der  $\gamma\delta$ -Lymphozyten nach der medikamentösen Behandlung zeigen ( $p < 0,04$ ) (Tab.10).

Bei den  $CD8+/\gamma\delta$ -Zellen zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den unbehandelten Schizophrenen und den gesunden Kontrollpersonen;  $0,51\% \pm 0,63\%$  der Lymphozyten der unbehandelten Patienten waren  $CD8+/\gamma\delta$ , bei den Kontrollen lediglich  $0,26\% \pm 0,26\%$  ( $p \leq 0,02$ ). Auch beim Vergleich der behandelten Patienten ( $0,43\% \pm 0,36\%$ ) und der Kontrollen ( $0,26\% \pm 0,26\%$ ) zeigte sich ein signifikant niedrigerer Wert bei den Kontrollen ( $p \leq 0,04$ ) (Tab.10).

Wurden unbehandelte und behandelten Patienten mit Hilfe des gepaarten t-Test verglichen ließ sich kein signifikanter Unterschied feststellen ( $p < 0,5$ ) (Tab.10). Ein Behandlungseffekt ließ sich nicht zeigen.

Lymphozytenpopulationen:		$\gamma\delta$ gesamt	$CD8+/\gamma\delta$
Kontrollen (ko; n = 41)		$3,4 \pm 2,8$	$0,26 \pm 0,26$
schizophrene Patienten (s; n = 45)		$4,3 \pm 3,3$	$0,51 \pm 0,63^{**}$
behandelte Patienten (n=20):	Vor der Behandlung (su)	$4,0 \pm 3,4^*$	$0,48 \pm 0,44$
	Nach der Behandlung (sb)	$3,3 \pm 2,3$	$0,43 \pm 0,36^{***}$

**Tabelle 10** : Aufgelistet sind die Daten der  $\gamma\delta$ -positiven Lymphozyten und der  $CD8/\gamma\delta$ -positiven Zellen von vier verschiedenen Gruppen mit Mittelwert und Standardabweichung in Prozent. Insgesamt wurden 45 Patienten untersucht, 20 Patienten wurden unter medikamentöser Behandlung erneut untersucht. \*Unterschied zu behandelten Patienten signifikant mit  $p < 0,04$ . \*\*Unterschied zu Kontrollen signifikant mit  $p < 0,02$ . \*\*\*Unterschied zu Kontrollen signifikant mit  $p < 0,04$ .



**Diagramm 5:** Dargestellt sind in a) die Anteile aller  $\gamma\delta$ -positiven Lymphozyten und in b) der  $CD8/\gamma\delta$ -positiven Zellen von vier verschiedenen Gruppen mit Mittelwert und Standardabweichung in Prozent. Insgesamt wurden 45 Patienten untersucht, von denen 20 medikamentös behandelt wurden.

### 5.2.2 Der $\gamma\delta$ T-Zellrezeptor bei Patienten mit gestörter Blut-Liquorschranke

Es konnten mögliche Auswirkungen einer Blut-Liquorschrankenstörung in Bezug auf die Zahl der  $\gamma\delta$ -Lymphozyten zu untersuchen werden, da bei 32 der 45 unbehandelten Schizophrenen Liquorproben entnommen und untersucht wurden, um entzündliche Erkrankungen auszuschließen.

6 der 32 Patienten wiesen eine Blut-Liquor-Schrankenstörung (19%) auf, gegenüber 26 Patienten, denen keine Blut-Liquor-Schrankenstörung (81%) nachgewiesen werden konnte.

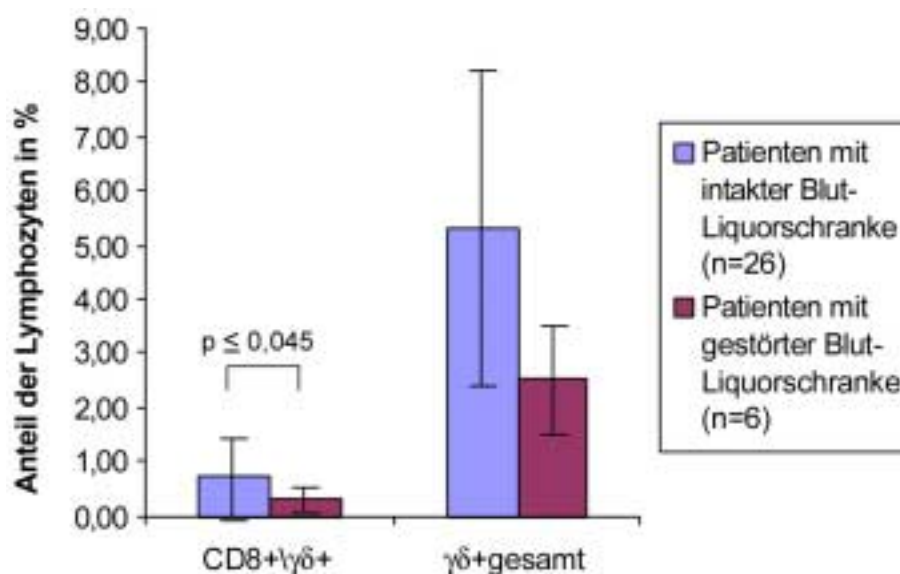
Bei der Untersuchung der Gesamtzahl der  $\gamma\delta$ -Lymphozyten ( $CD8+/\gamma\delta$ -Zellen und  $CD8-/\gamma\delta$ -Zellen) zeigte sich, daß Patienten mit intakter Blut-Liquorschranke (Mittelwert:  $5,24\% \pm 2,93\%$ ) über doppelt soviel  $\gamma\delta$ -Lymphozyten haben wie Patienten mit gestörter Blut-Liquorschranke (Mittelwert:  $2,44\% \pm 1,03\%$ ). Da die Zahl der Patienten mit gestörter Blut-Liquorschranke jedoch so klein ist, läßt sich nur ein Trend hin zur Signifikanz zeigen (Tab.11).

Bei der Analyse der  $CD8+/\gamma\delta$ -Zellen fand sich bei den Patienten mit gestörter Blut-Liquorschranke ( $0,25\% \pm 0,19\%$ ) eine signifikant niedrigere Prozentzahl

als bei Patienten mit intakter Blut-Liquorschranke ( $0,64\% \pm 0,73\%$ ; Mann-Whitney-U Test:  $p < 0,045$ ) (Tab.11).

Lymphozytenpopulation:	$\gamma\delta+$ gesamt	CD8+/ $\gamma\delta+$
<b>Patienten mit gestörter Blut-Liquorschranke (n=6)</b>	2,44 ± 1,03	0,25 ± 0,19
<b>Patienten mit intakter Blut-Liquorschranke (n=26)</b>	5,24 ± 2,93	0,64 ± 0,73 *

**Tabelle 11:** Dargestellt ist die Gesamtzahl der  $\gamma\delta+$ -Zellen und der CD8+/ $\gamma\delta+$ -Zellen bei Patienten mit intakter bzw. gestörter Blut-Liquorschranke mit Mittelwerte und Standardabweichung in Prozent; \*Unterschied zu Patienten mit gestörter Blut-Liquorschranke signifikant mit  $p < 0,045$ .



**Diagramm 6:** Dargestellt sind die Anteile der  $\gamma\delta$ -positiven Lymphozyten und der CD8/ $\gamma\delta$ -positiven Lymphozyten der zwei Gruppen (Patienten mit intakter Blut-Liquorschranke und Patienten mit gestörter Blut-Liquorschranke) mit Mittelwert und Standardabweichung in Prozent.

In den folgenden Tabellen sind die Einzelwerte der untersuchten Personen aufgelistet.

Nr.	LFA-1+\ CD4+	VLA-4+\ CD4+	LFA-1+\ CD8+	VLA-4+\ CD8+	CD3+\ CD4+	CD3+\ CD8+	CD8+\ $\gamma\delta$ +	CD8+\ $\gamma\delta$ +	$\gamma\delta$ +\ gesamt
s001	29,51	33,63	43,65	39,98	65,98	7,29	0,2	1,23	1,43
s003	41,16	45,67	55,78	42,93	47,58	9,72	0,76	7,81	8,57
s005	47,3	52,02	37,34	25,81	42,33	22,3	0,07	3,35	3,42
s006	44,92	41,16	54,52	52,24	41,91	7,88	0,26	1,71	1,97
s007	46,91	41,79	63,08	32,45	48,31	8,32	0,02	1,07	1,09
s008	40,06	38,89	42,08	31,27	62,13	6,54	0,04	1,37	1,41
s009	36,74	48,93	60,8	45,21	46,25	9,8	0,64	5,7	6,34
s010	22,77	25,76	19,81	20,64	45,59	20,37	0,26	2,49	2,75
s011	34,57	45,97	53,01	19,45	37,52	15,09	1,24	10,26	11,5
s013	15,96	18,93	19,54	9,81	33,55	23,22	0,27	1,68	1,95
s014	29	33,21	38,66	34,91	23,5	23,31	0,37	7,11	7,48
s015	31,71	26,61	43,12	16,17	24,48	34,38	1,09	7,24	8,33
s016	31,05	24,89	38,51	28,48	52,21	17,54	0,66	5,72	6,38
s017	32,47	29,13	54,12	28,92	35,77	15,26	0,68	5,76	6,44
s018	31,22	33,59	62,47	20,63	28,58	16,75	0,79	4,53	5,32
s019	47,53	51,55	60,86	44,52	62,8	9,53	0,59	1,29	1,88
s021	28,02	17,18	52,7	28,25	66,9	2,97	0,15	0,56	0,71
s023	33,37	35,98	28,05	31,1	51,76	11,12	0,22	2,85	3,07
s024	36,93	41,94	38	38,12	41,58	13,05	0,29	2,86	3,15
s026	51,61	39,57	63,6	37,23	61,85	9,76	0,22	1,9	2,12
s028	38,41	44,09	39	39,72	51,92	12,68	0,29	3,87	4,16
s029	47,75	48,51	57,74	56,5	44,36	16,52	0,52	3,95	4,47
s032	36,78	40,85	57,9	43,06	66,43	9,64	0,11	0,35	0,46
s033	38,66	43,63	67	37,61	56,08	7,52	1,75	14,15	15,9
s034	46,7	28,19	46	15,54	49,72	19,28	0,39	1,54	1,93
s038	41,86	37,52	60,95	25,97	46,79	12,87	0,78	3,42	4,2
s039	20,66	36,51	53,89	21,42	60,66	7,64	0,57	7,43	8
s041	30,91	26,89	34,84	35,1	65,85	8,23	0,02	0,57	0,59
s042	34,91	26,64	36,67	27,05	47,99	9,95	0,31	11,14	11,45
s044	18,77	33,6	35,22	25,71	50,94	19,41	0,51	2,97	3,48
s045	22,62	40,88	53,13	24,26	42,93	15,24	0,79	6,43	7,22
s046	33,26	36,79	36	39,44	56,9	9,06	0,07	1,64	1,71
s049	22,13	21,25	29,62	24,98	46,5	3,96	0,45	1,71	2,16
s051	24,73	27,47	69,84	20,29	59,43	7,92	3,86	2,28	6,14
s053	29,77	37,94	52,84	46,96	54,58	7,42	0,2	5,24	5,44
s056	46,57	47,44	65,96	44,82	54,75	3,81	0,07	0,66	0,73
s057	37,18	44,09	58,97	37,77	51,38	16,52	0,33	6,57	6,9
s059	36,7	37,6	54,49	37,7	49,81	6,75	0,02	0,4	0,42
s060	42,26	47,4	53,38	38,73	65,93	8,52	0,35	1,36	1,71
s061	40,17	50,73	66,14	42,52	42,88	23,89	0,3	1,65	1,95
s062	42,25	45,1	62,65	46,9	39,68	16,97	1,55	2,97	4,52
s063	53,64	47,41	58,11	41,04	60,9	8,5	0,42	2,81	3,23
s071	40,88	46,24	60,83	45,18	47,02	6,22	0,27	4,08	4,35
s073	37,79	41,07	41,46	40,7	64,97	12,34	0,32	2,98	3,3
s074	27,24	41,83	50,16	44,08	53,47	4,66	0,05	3,16	3,21
<b>Mittelwerte</b>	35,68	37,91	49,61	34,03	50,05	12,44	0,51	3,77	4,29
<b>Standardab- weichung</b>	8,93	8,97	12,68	10,50	10,98	6,48	0,63	3,02	3,29

Tabelle 11 : Daten der 45 unbehandelten Patienten mit Mittelwert und Standardabweichung

Nr.	LFA-1+\ CD4+	VLA-4+\ CD4+	LFA-1+\ CD8+	VLA-4+\ CD8+	CD3+\ CD4+	CD3+\ CD8+	CD8+\ $\gamma\delta$ +	CD8+\ $\gamma\delta$ +	$\gamma\delta$ +\ gesamt
su001	29,51	33,63	43,65	39,98	65,98	7,29	0,2	1,23	1,43
su006	44,92	41,16	54,52	52,24	41,91	7,88	0,26	1,71	1,97
su010	22,77	25,76	19,81	20,64	45,59	20,37	0,26	2,49	2,75
su013	15,96	18,93	19,54	9,81	33,55	23,22	0,27	1,68	1,95
su014	29	33,21	38,66	34,91	23,5	23,31	0,37	7,11	7,48
su016	31,05	24,89	38,51	28,48	52,21	17,54	0,66	5,72	6,38
su017	32,47	29,13	54,12	28,92	35,77	15,26	0,68	5,76	6,44
su018	31,22	33,59	62,47	20,63	28,58	16,75	0,79	4,53	5,32
su021	28,02	17,18	52,7	28,25	66,9	2,97	0,15	0,56	0,71
su023	33,37	35,98	28,05	31,1	51,76	11,12	0,22	2,85	3,07
su026	51,61	39,57	63,6	37,23	61,85	9,76	0,22	1,9	2,12
su029	47,75	48,51	57,74	56,5	44,36	16,52	0,52	3,95	4,47
su033	38,66	43,63	67	37,61	56,08	7,52	1,75	14,15	15,9
su041	30,91	26,89	34,84	35,1	65,85	8,23	0,02	0,57	0,59
su046	33,26	36,79	36	39,44	56,9	9,06	0,07	1,64	1,71
su049	22,13	21,25	29,62	24,98	46,5	3,96	0,45	1,71	2,16
su057	37,18	44,09	58,97	37,77	51,38	16,52	0,33	6,57	6,9
su060	42,26	47,4	53,38	38,73	65,93	8,52	0,35	1,36	1,71
su062	42,25	45,1	62,65	46,9	39,68	16,97	1,55	2,97	4,52
su063	53,64	47,41	58,11	41,04	60,9	8,5	0,42	2,81	3,23
<b>Mittelwerte</b>	34,90	34,71	46,70	34,51	49,76	12,56	0,48	3,56	4,04
<b>Standardab- weichung</b>	9,64	9,67	14,66	10,72	12,78	5,94	0,44	3,10	3,42
Nr.	LFA-1+\ CD4+	VLA-4+\ CD4+	LFA-1+\ CD8+	VLA-4+\ CD8+	CD3+\ CD4+	CD3+\ CD8+	CD8+\ $\gamma\delta$ +	CD8+\ $\gamma\delta$ +	$\gamma\delta$ +\ gesamt
sb001	30,53	43,95	47,89	44,16	55,97	8,31	0,1	1,17	1,27
sb006	42,31	52,17	54,61	37,33	58,03	11,03	0,11	1,32	1,43
sb010	20,64	32,81	34,67	38,21	57,2	15,61	0,16	1,3	1,46
sb013	33,41	43,4	50,13	43,64	52,15	11,76	0,13	1,28	1,41
sb014	20,19	35,98	47,52	36,33	43,23	12,3	0,2	3,91	4,11
sb016	40,46	51,47	54,43	38,03	43,25	15,02	0,98	5,2	6,18
sb017	34,62	42,82	57,23	34,22	31,35	19,01	0,66	5,26	5,92
sb018	38,6	41,57	66,72	41,41	55,4	9,45	1,21	3,67	4,88
sb021	44,23	49,76	69,28	51,42	56,13	5,46	0,25	0,58	0,83
sb023	33,93	37,6	52,71	36,04	45,16	14,41	0,45	3,17	3,62
sb026	43,67	51,16	61,5	54,68	59,42	11,22	0,16	0,85	1,01
sb029	47,52	50,77	49,89	48,79	43,32	8,45	0,36	4,21	4,57
sb033	39,64	43,81	54,93	41,88	46,41	15,04	0,75	8,5	9,25
sb041	46,99	54,42	39,34	45,08	48,92	6,13	0,12	0,9	1,02
sb046	37,44	43,39	41,5	35,67	48,19	13,59	0,14	3,03	3,17
sb049	43	54,59	58,92	42,38	50,72	6,6	0,19	1,17	1,36
sb057	41,36	47	61,73	51,49	50,38	19,09	0,59	5,57	6,16
sb060	30,52	41,15	42,17	33,66	58,46	12,05	0,32	0,61	0,93
sb062	39,88	46,41	54,53	49,59	49,26	20,49	1,24	2,54	3,78
sb063	53	53,8	44,26	43,15	46,9	18,84	0,54	2,02	2,56
<b>Mittelwerte</b>	38,10	45,90	52,20	42,36	49,99	12,69	0,43	2,81	3,25
<b>Standardab- weichung</b>	8,11	6,16	8,87	6,12	6,78	4,41	0,36	2,07	2,29

**Tabelle 12** : Daten der 20 behandelten Patienten vor (su) und nach (sb) der medikamentösen Behandlung mit Mittelwert und Standardabweichung

NR.	LFA-1+\ CD4+	VLA-4+\ CD4+	LFA-1+\ CD8+	VLA-4+\ CD8+	CD3+\ CD4+	CD3+\ CD8+	CD8+\ $\gamma\delta$ +	CD8+\ $\gamma\delta$ +	$\gamma\delta$ +\ gesamt
ko001	33,15	40,11	51,46	45,35	70,13	7,86	0,21	2,7	2,91
ko002	26,19	41,35	45,22	34,51	75,43	6,05	0,09	0,98	1,07
ko003	43,31	29,14	54	10,48	60,66	6,76	0,11	2,53	2,64
ko004	27,1	27,1	27,26	9,59	60,02	17,94	0,51	2,25	2,76
ko005	52,73	47,51	57,76	49,38	41,06	9,41	0,25	2,98	3,23
ko006	40,12	37,99	42,13	25,46	57,83	4,93	0,1	3,45	3,55
ko007	31,39	32,49	54,31	30,92	56,88	10,74	0,23	2,6	2,83
ko008	39,94	25,94	45,27	17,01	48,86	12	0,42	7,23	7,65
ko009	42,9	37,41	53,54	29,89	50,5	11,19	0,04	5,35	5,39
ko010	37,22	31,22	33,17	24,4	50,12	13,38	0	6,88	6,88
ko011	30,7	19,61	52,74	12,99	53,95	11,21	0,09	1,62	1,71
ko012	27,48	16,52	29,93	24,01	65,68	9,21	0,19	1,51	1,7
ko013	26,34	28,41	27,02	21,2	58,97	6,41	0	1,1	1,1
ko014	47,18	44,45	35,08	41,91	54,22	13,69	0,17	4,15	4,32
ko017	32,54	45,37	42,86	26,23	71,25	12,04	0,13	1	1,13
ko018	41,66	28,76	38,02	24,9	49,75	12,64	0,09	3,19	3,28
ko019	30,4	27,64	48,42	23,72	46,14	16,64	0,17	2,49	2,66
ko020	19,13	25,61	38,26	26,07	54,99	10,3	0,04	1,33	1,37
ko021	44,91	48,13	55,5	48,49	50,67	13,02	0,27	3,08	3,35
ko022	36,33	46,12	61,03	49,24	52,2	9,54	0,09	0,84	0,93
ko023	41,96	33,92	50,79	45,79	47,65	11,35	0,33	5,17	5,5
ko024	42,32	32,57	41,53	34,9	49,96	10,5	0,08	1,52	1,6
ko025	34,08	33,37	60,02	33,52	45,04	7,28	0,31	0,66	0,97
ko026	38,99	41,21	70,4	36,62	35,21	21,21	1,15	9,17	10,32
ko027	43,95	53,35	64,26	55,57	46,3	11,63	0,2	0,97	1,17
ko028	34,26	45,76	58	37,67	53,39	6,12	0	0,2	0,2
ko029	28,02	33,21	50,8	32,46	53,15	13,54	0,35	3,38	3,73
ko030	22,55	47,06	43,1	29,37	30,78	22,27	0,14	3,93	4,07
ko031	40,71	30,16	57,59	38,33	50,6	11,73	0,42	1,89	2,31
ko032	31,72	41,31	41,86	45,14	62,17	15,86	0,1	0,82	0,92
ko033	29,31	27,98	46,84	25,73	49,88	8,64	0,22	5,58	5,8
ko035	33,59	21,05	44,6	15,82	66,35	9,5	0,02	1,14	1,16
ko036	23,69	35,87	59,65	25,3	29,48	31,78	0,9	4,84	5,74
ko037	26,03	24,51	53,7	9,38	36,3	11,76	0,24	2,23	2,47
ko038	38,72	34,1	49,97	15,18	47,91	15,91	0,41	3,77	4,18
ko039	41,92	45,44	49,01	42,69	67,83	7,98	0,16	1,3	1,46
ko040	34,35	44,27	49,37	35,89	41,86	18,64	0,62	2,89	3,51
ko041	33,64	46,16	61	42,86	38,7	10	0,71	13,67	14,38
ko043	34,69	48,37	59,35	48,54	51,49	13,04	0,84	6,59	7,43
ko044	36,75	44,88	48,28	48,84	53,94	18,25	0,02	0,71	0,73
ko045	37,88	44,34	58,27	35,26	52,82	12,9	0,11	1,16	1,27
<b>Mittelwerte</b>	35,12	36,34	49,06	31,97	52,20	12,31	0,26	3,14	3,40
<b>Standardab- weichung</b>	7,23	9,12	9,98	12,26	10,28	5,04	0,26	2,64	2,81

Tabelle 13 : Daten der 41 Kontrollpersonen mit Mittelwert und Standardabweichung

Nr. (Pat. ohne Schranken- störung)	LFA-1+\ CD4+	VLA-4+\ CD4+	LFA-1+\ CD8+	VLA-4+\ CD8+	CD8+ $\gamma\delta$ +	CD8- $\gamma\delta$ +	$\gamma\delta$ +gesamt
s001	29,51	33,63	43,65	39,98	0,2	1,23	1,43
s003	41,16	45,67	55,78	42,93	0,76	7,81	8,57
s009	36,74	48,93	60,8	45,21	0,64	5,7	6,34
s010	22,77	25,76	19,81	20,64	0,26	2,49	2,75
s011	34,57	45,97	53,01	19,45	1,24	10,26	11,5
s013	15,96	18,93	19,54	9,81	0,27	1,68	1,95
s014	29	33,21	38,66	34,91	0,37	7,11	7,48
s015	31,71	26,61	43,12	16,17	1,09	7,24	8,33
s016	31,05	24,89	38,51	28,48	0,66	5,72	6,38
s017	32,47	29,13	54,12	28,92	0,68	5,76	6,44
s023	33,37	35,98	28,05	31,1	0,22	2,85	3,07
s029	47,75	48,51	57,74	56,5	0,52	3,95	4,47
s039	20,66	36,51	53,89	21,42	0,57	7,43	8
s041	30,91	26,89	34,84	35,1	0,02	0,57	0,59
s042	34,91	26,64	36,67	27,05	0,31	11,14	11,45
s044	18,77	33,6	35,22	25,71	0,51	2,97	3,48
s045	22,62	40,88	53,13	24,26	0,79	6,43	7,22
s049	22,13	21,25	29,62	24,98	0,45	1,71	2,16
s051	24,73	27,47	69,84	20,29	3,86	2,28	6,14
s053	29,77	37,94	52,84	46,96	0,2	5,24	5,44
s056	46,57	47,44	65,96	44,82	0,07	0,66	0,73
s057	37,18	44,09	58,97	37,77	0,33	6,57	6,9
s062	42,25	45,1	62,65	46,9	1,55	2,97	4,52
s063	53,64	47,41	58,11	41,04	0,42	2,81	3,23
s071	40,88	46,24	60,83	45,18	0,27	4,08	4,35
s073	37,79	41,07	41,46	40,7	0,32	2,98	3,3
<b>Mittelwerte</b>	32,65	36,14	47,19	32,93	0,64	4,60	5,24
<b>Standard- abweichung</b>	9,18	9,24	13,75	11,44	0,73	2,79	2,93
Nr. (Pat. mit Schranken- störung)	LFA-1/ CD4+	VLA-4+\ CD4+	LFA-1+\ CD8+	VLA-4+\ CD8+	CD8+ $\gamma\delta$ +	CD8- $\gamma\delta$ +	$\gamma\delta$ +gesamt
s005	47,3	52,02	37,34	25,81	0,07	3,35	3,42
s007	46,91	41,79	63,08	32,45	0,02	1,07	1,09
s019	47,53	51,55	60,86	44,52	0,59	1,29	1,88
s026	51,61	39,57	63,6	37,23	0,22	1,9	2,12
s028	38,41	44,09	39	39,72	0,29	3,87	4,16
s061	40,17	50,73	66,14	42,52	0,3	1,65	1,95
<b>Mittelwerte</b>	45,32	46,63	55,00	37,04	0,25	2,19	2,44
<b>Standard- abweichung</b>	4,57	5,00	12,01	6,33	0,19	1,05	1,03

**Tabelle 14** : Daten der 32 Patienten, bei denen eine Liquorpunktion vorgenommen wurde mit Mittelwert und Standardabweichung. Zuerst werden die Patienten ohne eine Blut-Liquorschrankenstörung (n=26) aufgelistet, dann die Patienten mit einer Blut-Liquorschrankenstörung (n=6).



## 6 Diskussion

Verschiedene Hypothesen über die Ursachen und die Entstehung der Schizophrenie werden seit vielen Jahren diskutiert, zum einen die Virusinfektionen (Torrey und Peterson, 1976; Yolken und Torrey, 1995), die möglicherweise interuterin Schäden am Gehirn des Fötus verursacht haben (Wright et al., 1993), zum anderen die Autoimmunhypothese (Kirch, 1993), der aber auch eine Virusinfektion als Auslöser zugrunde liegen könnte (Wright und Murray, 1993).

Veränderungen am Immunsystem von Schizophrenen wurden in den letzten Jahren immer wieder beschrieben.

Es wurden z. T. sehr unterschiedliche Ergebnisse veröffentlicht, doch bei der Mehrzahl der Studien wurde Auffälligkeiten am Immunsystem von Schizophrenen beschrieben, wie z.B. Veränderungen am Zytokinsystem (Katila et al., 1994; Barak et al., 1995; Bessler et al., 1995; Sirota et al., 1995), Auffälligkeiten bei Betrachtung der peripheren Immunzellen (Printz et al., 1999; Sperner-Unterweger et al., 1999; Yovel et al., 2000) und Antikörper gegen hirneigene Strukturen (Shinitzky et al., 1991; Henneberg et al., 1994).

Ein Vergleich der verschiedenen Studienergebnisse ist sehr schwierig, was zum einem an den verschiedenen Methoden, z.B bei der Bestimmung der Oberflächenmoleküle, zum anderen an der unterschiedlichen oder fehlenden klinischen Charakterisierung der schizophrenen Patienten liegt.

In der vorliegenden Untersuchung wurden die Lymphozytensubpopulationen über fluoreszenzmarkierte Antikörper mittels Durchflußzytometrie bestimmt. In älteren Studien wurden die fluoreszenzmarkierten Zellen z. T. mit der Fluoreszenzmikroskopie ausgezählt oder der Rosetten-Formations-Technik bestimmt. Mit der Durchflußzytometrie können Lymphozytensubpopulationen genauer voneinander getrennt und wesentlich valider ausgezählt werden.

Die monozytären Zellen wurden aus Vollblut über einen Ficoll–Dichtegradienten isoliert und eingefroren. Durch diese etablierte Methode wurde die Untersuchung einer großen Gruppe von Patienten und Kontrollpersonen unter konstanten Bedingungen möglich.

Den schizophrenen Patienten wurden sowohl medikamentös unbehandelt als auch unter einer Neuroleptikatherapie Blut abgenommen, dies ermöglichte den Einfluß von Neuroleptika auf die untersuchten Parametern festzustellen.

Bei einem Teil der Patienten, bei denen eine medizinische Indikation vorlag wurde zudem noch Liquor cerebrospinalis entnommen und untersucht. Die Ergebnisse der Untersuchung des Liquor cerebrospinalis ermöglichten es, die Patienten in Gruppen zu unterteilen, um den Einfluß von einer gestörten Blut-Liquorschranke auf das Immunsystem zu untersuchen.

## **6.1 Adhäsionsmolekülrezeptoren**

Studien über die Bestimmung von LFA-1 und VLA-4 auf CD4 und CD8 positiven Lymphozyten bei Schizophrenen liegen bisher nicht vor. Es wurden aber Daten veröffentlicht von löslichem ICAM-1 dem Liganden von LFA-1. So war die Serumkonzentration von löslichem ICAM-1 bei einigen Autoimmunerkrankungen, z.B. Multiples Sklerose (Dore-Duffy et al., 1995; Tsukada et al., 1993; Hartung et al., 1993) oder dem systemischen Lupus erythematodes (Tulek et al., 1996) erhöht. Schwarz et. al. fand jedoch bei Schizophrenen erniedrigte Werte von löslichem ICAM-1 (Schwarz et al., 2000).

### **6.1.1 Zunahme der Expression von VLA-4 und LFA-1 auf CD8+ Zellen, sowie VLA-4 auf CD4+ Zellen unter Neuroleptikabehandlung**

Es zeigte sich eine signifikante Zunahme der Expression von VLA-4 auf CD8+ und CD4+ Zellen und von LFA-1 auf CD8+ Zellen während der Behandlung mit Neuroleptika.

Es fand sich jedoch kein Unterschied in den drei Gruppen (Kontrollpersonen, unbehandelte Schizophrene, behandelte Schizophrene) zwischen den CD3+/CD4+ und CD3+/CD8+ Zellen, was dafür spricht, daß die Zunahme von VLA-4 auf CD4+ und CD8+ Zellen und LFA-1 auf CD8+ Zellen, während der Behandlung mit Neuroleptika, nicht auf einem Anstieg der CD4+ oder CD8+ Zellen zurückzuführen ist.

Untersuchungen zeigen, daß atypische Neuroleptika andere Effekte als typische Neuroleptika auf die Zytokinproduktion haben (Maes et al., 1994; Pollmächer et al., 1995). Bei unserer Untersuchung zeigten sich keine

Unterschiede in der Expression der Adhäsionsmolekülrezeptoren, was die Art der Neuroleptika betrifft. Das kann zum einem daran liegen, daß die Effekte auf die Zytokinproduktion sich so auswirken, daß die Veränderungen bei der Expression der Adhäsionsmolekülrezeptoren mit der Durchflußzytometrie nicht meßbar sind, zum anderen ist zu bedenken, daß die Gruppen der untersuchten Personen klein ist. Untersuchungen an größeren Gruppen wären nötig.

So scheint es, daß die Behandlung mit Neuroleptika generell mit einem Anstieg von VLA-4 auf T-Lymphozyten verbunden ist.

In Hinblick auf den Einfluß von Neuroleptika auf das Immunsystem wurden, z.B. erhöhte Blutspiegel von löslichem Interleukin-2 (Müller et al., 1997; Pollmächer et al., 1995), jedoch erniedrigte Blutspiegel von löslichem Interleukin-6 (Maes et al., 1995b; Müller et al., 1997) bei Schizophrenen unter Neuroleptikatherapie beschrieben.

Ob dieser Behandlungseffekt, der auf die Neuroleptika zurückzuführen ist, auch im ursächlichen Zusammenhang mit einer klinischen Besserung der schizophrenen Symptomatik steht, kann man nur spekulieren.

So gibt es Anzeichen für eine defekte Antigenerkennung bzw. Antigenpräsentation bei Schizophrenen (Müller et al., 1991), z. B. war die Immunantwort auf eine Hepatitis B Impfung bei schizophrenen Patienten im Vergleich zu den Kontrollpersonen abgeschwächt (Russo et al., 1994).

VCAM-1 und VLA-4 vermitteln als Adhäsionsmoleküle den Zellkontakt, der zur Antigenerkennung über den TCR nötig ist (Burkly et al., 1991).

Der Anstieg der VLA-4+ Zellen führt möglicherweise zu einer Verbesserung der Antigenerkennung, so daß bestimmte Zellen befähigt werden Antigene besser zu präsentieren oder daß Lymphozyten besser die Antigene erkennen.

### **6.1.2 Stärkere Expression von VLA-4 und LFA-1 auf CD4+ Zellen bei Patienten mit gestörter Blut-Liquorschranke**

Bei 32 der 45 unbehandelten Schizophrenen wurden, da eine medizinische Indikation vorlag, Liquorproben entnommen und untersucht um u. a. etwaige Blut-Liquorschrankenstörungen aufzudecken.

So war es möglich Auswirkungen einer Blut-Liquorschrankenstörung in Bezug auf die Expression von LFA-1 und VLA-4 auf T-Zellen zu untersuchen.

Bei dem Vergleich der Expression von VLA-4 ( $p \leq 0,01$ ) und LFA-1 ( $p \leq 0,003$ ) auf CD4+ Zellen von Patienten mit gestörter Blut-Liquorschranke mit Patienten mit intakter Blut-Liquorschranke ergab sich eine signifikant stärkere Expression bei den Patienten mit gestörter Blut-Liquorschranke. Dies läßt vermuten, daß ein Zusammenhang zwischen Veränderungen dieser Lymphozyten-subpopulation und Veränderungen an der Blut-Liquorschranke besteht.

Das ICAM-1/LFA-1- und VCAM-1/VLA-4-Liganden-System ist an der Adhäsion von Lymphozyten, an der Durchlässigkeit der Blut-Liquorschranke und an der Wanderung der Zellen in das Gewebe beteiligt (de Vries et al., 1994; Fabry et al., 1994). Es scheint, daß bei der Schizophrenie die CD4+ Zellen, sowohl die LFA-1 positiven als auch die VLA-4 positiven, an der Durchlässigkeit der Blut-Liquorschranke beteiligt sind. Bei z. B. der Multiple Sklerose sind auch besonders die CD4+ Zellen an der gesteigerten Durchlässigkeit der Blut-Liquorschranke beteiligt (Chen et al., 1994).

Man weiß, daß bei viralen ZNS Infektionen eine Immunaktivierung im ZNS und eine gesteigerte Kommunikation zwischen ZNS und peripheren Immunsystem einen günstigeren Krankheitsverlauf zeigen (Lewandowski et al., 1994). Vor diesem Hintergrund kann man die gestörte Blut-Liquorschranke und die stärkere Expression von VLA-4 und LFA-1 auf CD4+ Zellen möglicherweise als therapeutischen Effekt ansehen.

## **6.2 Der $\gamma\delta$ T-Zellrezeptor**

### **6.2.1 Erhöhte Zahl der CD8+/ $\gamma\delta$ +Zellen bei unbehandelten Schizophrenen**

Eine signifikante höhere Zahl der CD8+/ $\gamma\delta$ +Zellen zeigte sich bei den unbehandelten schizophrenen Patienten (0,51%) im Vergleich zu den Kontrollpersonen (0,26%). Da es sich, um so eine niedrige Anzahl von CD8+/ $\gamma\delta$ +Zellen handelt, sind die Ergebnisse kritisch zu bewerten. Die niedrige Anzahl von CD8+/ $\gamma\delta$ +Zellen in allen untersuchten Gruppen, stimmt jedoch mit denen in der Literatur beschriebenen Daten überein (Groh et al., 1989). Zudem

gibt es einige Gründe, die dafür sprechen, daß es sich trotz der niedrigen Zahl der CD8+/ $\gamma\delta$ -Zellen um tatsächliche Unterschiede handelt:

Die  $\gamma\delta$ -Zellen können gut mittels FACS Analysen von den anderen Zellgruppen getrennt werden. Der Unterschied zwischen den Patienten und den Kontrollen ist größer als 100% des Mittelwertes. Und auch bei Betrachtung der Gesamtzahl der  $\gamma\delta$ -Zellen zeigte sich eine höhere Anzahl bei den unbehandelten Patienten im Vergleich zu den Kontrollen, die sich nicht allein auf die höhere Zahl der CD8+/ $\gamma\delta$ -Zellen zurückführen läßt, da diese nur ca. 10% der Gesamtzahl der  $\gamma\delta$ -Zellen ausmachen. Nichts desto trotz ist es von Nöten, die Ergebnisse an einer größeren Gruppe von Patienten zu überprüfen. Eine erhöhte Anzahl von allen  $\gamma\delta$ -Zellen wurde auch bei unbehandelten Schizophrenen gegenüber den Kontrollen gefunden, der Unterschied war jedoch nicht signifikant. Die erhöhte Zahl von CD8+/ $\gamma\delta$ -Zellen und die erhöhte Zahl von allen  $\gamma\delta$ -Zellen bei unbehandelten Schizophrenen könnte darauf hindeuten, daß die  $\gamma\delta$ -Zellen, unabhängig davon, ob sie CD8 positiv sind oder nicht, ähnliche Eigenschaften haben. Ähnliches wurde für die Wanderungsfähigkeit der  $\gamma\delta$ -Zellen beschrieben, sie ist bei allen  $\gamma\delta$ -Zellen erhöht, bei den CD8+/ $\gamma\delta$ -Zellen aber noch ausgeprägter (Galea et al., 1994).

Ogleich die Funktion der  $\gamma\delta$ -Lymphozyten noch nicht endgültig geklärt ist, gibt es Vermutungen, daß sie Teil eines früh wirksamen Abwehrsystems sind, die eindringende Keime wie Mykobakterien oder Viren abwehren, bevor die spezifische Immunantwort einsetzt (Raulet, 1989; Young and Elliott, 1989). Das könnte auch erklären, warum es im Laufe der Behandlung (die Erkrankung befindet sich in einem fortgeschrittenen Stadium) der schizophrenen Patienten zu einem Absinken der  $\gamma\delta$ -Zellen kommt (Gesamtzahl der  $\gamma\delta$ -Lymphozyten ist bei den Patienten vor der Behandlung signifikant erhöht gegenüber der Zahl nach der Behandlung).

Auch die defekte Antigenerkennung und -präsentation, die bei Schizophrenen beschrieben wurde (Müller et al., 1991; Russo et al., 1994), könnte erklären, warum es zu der höheren Zahl der CD8+/ $\gamma\delta$ -Lymphozyten bei den unbehandelten Patienten kommt.

Im Falle eines entzündlichen Prozesses im ZNS sind es so die  $\gamma\delta$ -Zellen, die zuerst die Keime abwehren. Wie in in-vitro Studien gezeigt wurde, können  $\gamma\delta$ -Zellen auch ohne MHC-Antigenpräsentation aktiviert werden (Schild et al., 1994), also bei einer defekten Antigenpräsentation könnten sie trotzdem Keime abwehren.

Die Zahl der  $\gamma\delta$ -Zellen ist bei den behandelten Patienten niedriger, das könnte so interpretiert werden, daß andere Zellen des Immunsystems, die eine intakte Antigenpräsentation benötigen die Abwehr übernehmen.

Eine Verbesserung der Antigenerkennung und -präsentation könnte möglicherweise in Zusammenhang mit einer klinischen Verbesserung der schizophrenen Patienten unter Neuroleptikatherapie stehen.

Eine andere Erklärung für die höhere Zahl der  $CD8^+/\gamma\delta^+$ -Zellen bei den unbehandelten Schizophrenen wäre, daß  $CD8^+/\gamma\delta^+$ -Zellen ZNS-Strukturen von Schizophrenen angreifen. Bei verschiedenen Krankheiten, auch ZNS-Erkrankungen wie MS wurde  $CD8^+/\gamma\delta^+$ -Zellen beschrieben, die zytotoxisch wirken (Freedman et al., 1991; Hohlfeld und Engel, 1992);  $\gamma\delta$ -Zellen wurden auch in Hirngewebe von Schizophrenen gefunden (Frenzel et al., 1995). Speziell bei Multiple Sklerose im akuten Stadium der Erkrankung wurden erhöhte  $\gamma\delta$ -Zellen im Liquor gefunden (Shimonkevitz et al., 1993). Auch hier wurde die erhöhte Zahl der  $CD8^+/\gamma\delta^+$ -Zellen bei den unbehandelten Schizophrenen, also im akuten Stadium beobachtet.

Es wurde eine spezielle Affinität von  $\gamma\delta$ -Zellen zu 70 kD Hitzeschock-Proteine in ZNS-Läsionen bei Multiple Sklerose beschrieben (Battistini et al., 1995).

Auch bei Schizophrenen wurde ein erhöhter Antikörpertiter gegen 70 kD Hitzeschock-Proteine beobachtet, besonders bei Patienten, die früh nach Einsetzen der Krankheit untersucht wurden (Schwarz et al., 1999).

Das Absinken der  $CD8^+/\gamma\delta^+$ -Zellen während der Behandlung könnte demnach Zeichen der Besserung sein.

### 6.2.2 Erniedrigte CD8+/ $\gamma\delta$ -Zellen bei Patienten mit Blut-Liquorschrankenstörung

Bei 32 der 45 unbehandelten Schizophrenen wurden, da eine medizinische Indikation vorlag, Liquorproben entnommen und untersucht um u. a. etwaige Blut-Liquorschrankenstörungen aufzudecken. So war es möglich Auswirkungen einer Blut-Liquorschrankenstörung in Bezug auf die Zahl der  $\gamma\delta$ -Lymphozyten zu untersuchen.

Bei der Untersuchung der schizophrenen Patienten mit gestörter Blut-Liquorschranke zeigte sich, daß sich dort weniger CD8+/ $\gamma\delta$ -Zellen im Blut befanden.

$\gamma\delta$ -Lymphozyten können aus dem Blut ins Hirngewebe einwandern. Es zeigte sich auch, daß CD8+ Zellen im Gegensatz zu den CD4+ Zellen eine größere Durchwanderungskapazität haben (Pietschmann et al., 1992) und daß  $\gamma\delta$ -Lymphozyten besser das Endothel durchwandern als T-Lymphozyten die den  $\alpha\beta$ -Rezeptor tragen (Galea et al., 1994). Die Ansammlung von  $\gamma\delta$ -Lymphozyten im Gewebe könnte somit Folge der Lymphozytenwanderung sein. Und so könnte im Falle einer Blut-Liquorschrankenstörung das Einwandern anderer immunkompetenter Zellen erleichtert sein, weshalb möglicherweise weniger CD8+/ $\gamma\delta$ -Zellen gebildet werden. Zudem unter der Annahme, daß die  $\gamma\delta$ -Lymphozyten Teil einer frühen Abwehr gegen eindringende Keime sind, wäre es plausibel, daß sie in dem Stadium, indem eine Schrankenstörung vorliegt, d.h. die Krankheit befindet sich im fortgeschrittenem Stadium, von Zellen abgelöst werden, die einer spezifischeren Immunantwort fähig sind.

Diese Vermutung würde auch zu dem Befund passen, daß bei unbehandelten Schizophrenen eine höhere Zahl von CD8+/ $\gamma\delta$ -Zellen im Blut gemessen wurden, hier befand sich die Erkrankung noch am Anfang.

### 6.3 Ausblick

All diese Ergebnisse unterstützen die Hypothese, daß Veränderungen im Immunsystem, sei sie durch einen Virus oder andere Erreger bedingt oder durch einen autoimmunen Prozeß ausgelöst, bei Schizophrenen bei der Entstehung bzw. dem Krankheitsverlauf eine Rolle spielen.

Die signifikante Zunahme der Expression von VLA-4 auf CD8+ und CD4+ Zellen und von LFA-1 auf CD8+ Zellen während der Behandlung mit Neuroleptika, die erhöhte Zahl der CD8+/ $\gamma\delta$ -Zellen bei unbehandelten Schizophrenen, die erniedrigte Zahl der CD8+/ $\gamma\delta$ -Zellen bei Patienten mit Blut-Liquorschrankenstörung und die stärkere Expression von VLA-4 und LFA-1 auf CD4+ Zellen bei Patienten mit gestörter Blut-Liquorschranke spiegeln Veränderungen im Immunsystem Schizophrener wider, die auf Behandlungseffekte, möglicherweise aber auch auf Krankheitseffekte zurückzuführen sind.

So werden auch neue Erkenntnisse auf dem Gebiet der Immunologie speziell der Psychoneuroimmunologie helfen können, Zusammenhänge besser zu verstehen.

Um noch spezifischere Aussagen treffen zu können, müßten Untersuchungen an größeren Gruppen vorgenommen werden, damit die wahrscheinlich heterogene Gruppe der Schizophrenen in Untergruppen aufgeteilt werden kann, um statistisch relevante große Gruppen zu erhalten.

Sollten sich auch in den größeren Gruppen die in dieser Arbeit gezeigten Tendenzen bestätigen, könnte man in Zukunft neue Wege bei der Diagnostik und der Therapie von Schizophrenen gehen.



## 7 Zusammenfassung

Verschiedene Studien haben bei etwa einem Drittel der Schizophrenen, oft in chronischen Fällen oder in Fällen, wo die Therapie keinen guten Erfolg zeigte, Zeichen eines Autoimmunprozesses am peripheren Immunsystem beschrieben. So können z. B. CD8+ Zellen, die ins ZNS einwandern und dort möglicherweise mit ZNS-Zellen reagieren, die Entstehung von Hitzeschock Proteinen induzieren als ein Zeichen eines Zellstresses, was oft bei Autoimmunprozessen der Fall ist. Autoantikörper gegen Hitzeschock Proteine wurden bei einem Drittel der Schizophrenen gefunden. Das läßt vermuten, daß auf der einen Seite die Kommunikation zwischen ZNS und peripheren Immunsystem gestört ist, auf der anderen Seite ein Regulationmechanismus zwischen ZNS und peripheren Immunsystem fehlt.

Um mögliche Veränderungen am Immunsystem von Schizophrenen zu finden wurde in der vorliegenden Untersuchung die Lymphozyten von schizophrenen Patienten und Kontrollpersonen untersucht. Es wurde die Expression von VLA-4 (CD49d) und LFA-1 (CD11a) auf CD4+ und CD8+ Lymphozyten gemessen und die Anzahl der  $\gamma\delta$ TCR+ T-Lymphozyten bestimmt.

VLA-4 (CD49d) und LFA-1 (CD11a) sind Adhäsionsmolekülrezeptoren, die bei der Adhäsion an antigenpräsentierende Zellen, an abzutötende Zielzellen und an Endothelzellen eine Rolle spielen. Somit sind sie interessant für die Schizophrenieforschung, da bei Schizophrenen eine gestörte Immunabwehr diskutiert wird.

Auch eine Autoimmunerkrankung oder Virusinfektion werden als Ursache für eine Schizophrenie diskutiert, deshalb ist der  $\gamma\delta$ TCR, der in den letzten Jahren mit Autoimmunerkrankungen und Virusinfektionen in Zusammenhang gebracht wurde, untersucht worden.

Die verschiedenen Lymphozytensubpopulationen wurden über fluoreszenzmarkierte Antikörper mittels Durchflußzytometrie analysiert.

Die Lymphozyten wurden sowohl bei zunächst medikamentös unbehandelten schizophrenen Patienten als auch bei behandelten untersucht und mit denen von gesunden Kontrollpersonen verglichen. Bei einem Teil der Patienten, bei denen eine medizinische Indikation vorlag, wurden Liquoruntersuchungen

vorgenommen, so konnten Veränderungen an der Blut-Liquorschranke festgestellt werden.

Es zeigte sich eine signifikante Zunahme der Expression von VLA-4 auf CD8+ und CD4+ Zellen und von LFA-1 auf CD8+ Zellen während der Behandlung mit Neuroleptika.

Bei dem Vergleich der Expression von VLA-4 und LFA-1 auf CD4+ Zellen von Patienten mit gestörter Blut-Liquorschranke mit Patienten mit intakter Blut-Liquorschranke ergab sich eine signifikant höhere Expression bei den Patienten mit gestörter Blut-Liquorschranke.

Eine signifikant höhere Zahl der CD8+/ $\gamma\delta$ -Zellen zeigte sich bei den unbehandelten schizophrenen Patienten im Vergleich mit den Kontrollpersonen. Bei der Untersuchung der schizophrenen Patienten mit gestörter Blut-Liquorschranke zeigte sich, daß sich dort weniger CD8+/ $\gamma\delta$ -Zellen im Blut befanden.

All diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß sowohl immunregulatorische Mechanismen als auch Interaktion zwischen ZNS und peripheren Immunsystem bei der Schizophrenie bzw. einem Teil der Schizophrenen eine Rolle spielen.

## 8 Literaturverzeichnis

- American Psychiatric Association(APA) (1987). Diagnostic and statistical manual of mental disorders, Third Edition-Revised (Washington DC: American Psychiatric Press).
- American Psychiatric Association(APA) (1990). Structured clinical interview for DMS-III-R (Washington DC: American Psychiatric Press).
- Barak, V., Barak, Y., Levine, J., Nisman, B., and Roisman, I. (1995). Changes in interleukin-1 beta and soluble interleukin-2 receptor levels in CSF and serum of schizophrenic patients. *J.Basic.Clin.Physiol.Pharmacol.* 6, 61-69.
- Battistini, L., Salvetti, M., Ristori, G., Falcone, M., Raine, C.S., and Brosnan, C.F. (1995). Gamma delta T cell receptor analysis supports a role for HSP 70 selection of lymphocytes in multiple sclerosis lesions. *Mol Med* 1, 554-562.
- Bergstresser, P.R., Cruz, P.D.J., and Takashima, A. (1993). Dendritic epidermal T cells: lessons from mice for humans. *J Invest Dermatol* 100, 80S-83S.
- Bessler, H., Levental, Z., Karp, L., Modai, I., Djaldetti, M., and Weizman, A. (1995). Cytokine production in drug-free and neuroleptic-treated schizophrenic patients. *Biol.Psychiatry* 38, 297-302.
- Bos, J.D., Teunissen, M.B., Cairo, I., Krieg, S.R., Kapsenberg, M.L., Das, P.K., and Borst, J. (1990). T-cell receptor gamma delta bearing cells in normal human skin. *J Invest Dermatol* 94, 37-42.

- Boyum, A. Separation of lymphocytes, granulocytes, and monocytes from human blood using iodinated density gradient media. 1984. *Methods in Enzymology: Immunochemical Techniques*, edited by di Sabato, G., Langone, J.J. and van Vunakis, H. Academic Press, Orlando, San Diego, New York, 88-102, 1984.
- Bruce, L.C. and Peebles, A.M.S. (1903). Clinical and experimental observations on catatonia. *J Ment Sc* 49, 614-628.
- Burkly, L.C., Jakubowski, A., Newman, B.M., Rosa, M.D., Chi-Rosso, G., and Lobb, R.R. (1991). Signaling by vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) through VLA-4 promotes CD3-dependent T cell proliferation. *Eur J Immunol* 21, 2871-2875.
- Carlsson, A. and Linquist, M. (1963). Effect of chlorpromazine and haloperidole on formation of 3-methoxytyramine and normetanophrine in mouse brain. *Acta Pharmacologic* 20, 140-144.
- Chen, Y., Kuchroo, V.K., Inobe, J., Hafler, D.A., and Weiner, H.L. (1994). Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis. *Science* 265, 1237-1240.
- Chien, Y.H., Jores, R., and Crowley, M.P. (1996). Recognition by gamma/delta T cells. *Annu Rev Immunol* 14, 511-532.
- Dameshok, W. (1930). White blood cells in dementia praecox and dementia paralytica. *Arch. Neurol. Psychiatry* 20, 94-119.
- de Vries, H.E., Moor, A.C., Blom-Roosemalen, M.C., de Boer, A.G., Breimer, D.D., van Berkel, T.J., and Kuiper, J. (1994). Lymphocyte adhesion to brain capillary endothelial cells in vitro. *J Neuroimmunol* 52, 1-8.
- DeLisi, L.E., Weber, R.J., and Pert, C.B. (1985). Are there antibodies against brain in sera from schizophrenic patients? Review and prospectus. *Biol Psychiatry* 20, 110-115.

- Dore-Duffy, P., Newman, W., Balabanov, R., Lisak, R.P., Mainolfi, E., Rothlein, R., and Peterson, M. (1995). Circulating, soluble adhesion proteins in cerebrospinal fluid and serum of patients with multiple sclerosis: correlation with clinical activity. *Ann Neurol* 37, 55-62.
- Fabry, Z., Raine, C.S., and Hart, M.N. (1994). Nervous tissue as an immune compartment: the dialect of the immune response in the CNS. *Immunol Today* 15, 218-224.
- Fabry, Z., Waldschmidt, M.M., Hendrickson, D., Keiner, J., Love-Homan, L., Takei, F., and Hart, M.N. (1992). Adhesion molecules on murine brain microvascular endothelial cells: expression and regulation of ICAM-1 and Lgp 55. *J Neuroimmunol* 36, 1-11.
- Fessel, W.J. (1963). The antibrain factors in psychiatric patients' sera. *Arch Gen Psychiatry* 8, 614-621.
- Freedman, M.S., Ruijs, T.C., Selin, L.K., and Antel, J.P. (1991). Peripheral blood gamma-delta T cells lyse fresh human brain-derived oligodendrocytes [see comments]. *Ann Neurol* 30, 794-800.
- Frenzel, K.H., Müller, N., Heidmann, D., Hampel, H., Kretzschmar, H.A., Penning, R., and Ackenheil, M. (1995). Expression of T cell receptor gamma delta antigens in human brain tissue. *Neuroimmunomodulation* 2, 115-120.
- Galea, P., Brezinschek, R., Lipsky, P.E., and Oppenheimer-Marks, N. (1994). Phenotypic characterization of CD4-/alpha beta TCR+ and gamma delta TCR+ T cells with a transendothelial migratory capacity. *J Immunol* 153, 529-542.
- Ganguli, R., Brar, J.S., Chengappa, K.N., Yang, Z.W., Nimgaonkar, V.L., and Rabin, B.S. (1993). Autoimmunity in schizophrenia: a review of recent findings. *Ann.Med.* 25, 489-496.

- Ganguli, R. and Rabin, B.S. (1993). CD5 positive B lymphocytes in schizophrenia: no alteration in numbers or percentage as compared with control subjects. *Psychiatry Res.* 48, 69-78.
- Ganguli, R., Rabin, B.S., Kelly, R.H., Lyte, M., and Ragu, U. (1987). Clinical and laboratory evidence of autoimmunity in acute schizophrenia. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 496, 676-685.
- Groh, V., Porcelli, S., Fabbi, M., Lanier, L.L., Picker, L.J., Anderson, T., Warnke, R.A., Bhan, A.K., Strominger, J.L., and Brenner, M.B. (1989). Human lymphocytes bearing T cell receptor gamma/delta are phenotypically diverse and evenly distributed throughout the lymphoid system. *J Exp Med* 169, 1277-1294.
- Hartung, H.P., Michels, M., Reiners, K., Seeldrayers, P., Archelos, J.J., and Toyka, K.V. (1993). Soluble ICAM-1 serum levels in multiple sclerosis and viral encephalitis. *Neurology* 43, 2331-2335.
- Hayday, A. and Geng, L. (1997). Gamma delta cells regulate autoimmunity. *Curr Opin Immunol* 9, 884-889.
- Heath, R.G. (1969). Schizophrenia: evidence of a pathologic immune mechanism. *Proc.Annu.Meet.Am.Psychopathol.Assoc.* 58, 234-252.
- Henneberg, A., Riedl, B., Dumke, H.O., and Kornhuber, H.H. (1990). T-lymphocyte subpopulations in schizophrenic patients. *Eur.Arch.Psychiatry Neurol.Sci.* 239, 283-284.
- Henneberg, A.E., Horter, S., and Ruffert, S. (1994). Increased prevalence of anti-brain antibodies in the sera from schizophrenic patients. *Schizophr.Res.* 14, 15-22.
- Hery, C., Sebire, G., Peudenier, S., and Tardieu, M. (1995). Adhesion to human neurons and astrocytes of monocytes: the role of interaction of CR3 and ICAM-1 and modulation by cytokines. *J Neuroimmunol* 57, 101-109.

- Hogg, N. and Landis, R.C. (1993). Adhesion molecules in cell interactions. *Curr Opin Immunol* 5, 383-390.
- Hohlfeld, R. and Engel, A.G. (1992). The role of gamma-delta T lymphocytes in inflammatory muscle disease. *Chem Immunol* 53, 75-85.
- Hornberg, M., Arolt, V., Wilke, I., Kruse, A., and Kirchner, H. (1995). Production of interferons and lymphokines in leukocyte cultures of patients with schizophrenia. *Schizophr.Res.* 15, 237-242.
- Hynes, R.O. (1992). Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 69, 11-25.
- Katila, H., Hurme, M., Wahlbeck, K., Appelberg, B., and Rimon, R. (1994). Plasma and cerebrospinal fluid interleukin-1 beta and interleukin-6 in hospitalized schizophrenic patients. *Neuropsychobiology* 30, 20-23.
- Keystone, E.C., Rittershaus, C., Wood, N., Snow, K.M., Flatow, J., Purvis, J.C., Poplonski, L., and Kung, P.C. (1991). Elevation of a gamma delta T cell subset in peripheral blood and synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Immunol* 84, 78-82.
- Kilidireas, K., Latov, N., Strauss, D.H., Gorig, A.D., Hashim, G.A., Gorman, J.M., and Sadiq, S.A. (1992). Antibodies to the human 60 kDa heat-shock protein in patients with schizophrenia. *Lancet* 340, 569-572.
- Kirch, D.G. (1993). Infection and autoimmunity as etiologic factors in schizophrenia: a review and reappraisal. *Schizophr.Bull.* 19, 355-370.
- Kirch, D.G., Alexander, R.C., Suddath, R.L., Papadopoulos, N.M., Kaufmann, C.A., Daniel, D.G., and Wyatt, R.J. (1992). Blood-CSF barrier permeability and central nervous system immunoglobulin G in schizophrenia. *J.Neural Transm.Gen.Sect.* 89, 219-232.

- Knight, J.G. (1982). Dopamine-receptor-stimulating autoantibodies: a possible cause of schizophrenia. *Lancet* 2, 1073-1076.
- Krüger, K.W. (1984). Lupus erythematodes und Zentralesnervensystem. *Nervenarzt* 55, 165-172.
- Kurtz, G. and Müller, N. (1994). The antiphospholipid syndrome and psychosis [letter]. *Am.J.Psychiatry* 151, 1841-1842.
- Lehmann-Facius, H. (1939). Serologisch-analytische Versuche mit Liquores und Seren von Schizophrenen. *Allg Z Psychiatrie* 110, 232-243.
- Lewandowski, G., Hobbs, M.V., and Bloom, F.E. (1994). Alteration of intracerebral cytokine production in mice infected with herpes simplex virus types 1 and 2. *J Neuroimmunol* 55, 23-34.
- Lifson, J.D., Sasaki, D.T., and Engelman, E.G. (1986). Utility of formaldehyde fixation for flow cytometry and inactivation of the AIDS associated retrovirus. *J Immunol Meth* 86, 143
- Maes, M., Bosmans, E., Calabrese, J., Smith, R., and Meltzer, H.Y. (1995b). Interleukin-2 and interleukin-6 in schizophrenia and mania: effects of neuroleptics and mood stabilizers. *J.Psychiatr.Res.* 29, 141-152.
- Maes, M., Meltzer, H.Y., and Bosmans, E. (1994). Immune-inflammatory markers in schizophrenia: comparison to normal controls and effects of clozapine. *Acta Psychiatr.Scand.* 89, 346-351.
- Maes, M., Meltzer, H.Y., Buckley, P., and Bosmans, E. (1995a). Plasma-soluble interleukin-2 and transferrin receptor in schizophrenia and major depression. *Eur.Arch.Psychiatry Clin.Neurosci.* 244, 325-329.



- Martins, E.B., Graham, A.K., Chapman, R.W., and Fleming, K.A. (1996). Elevation of gamma delta T lymphocytes in peripheral blood and livers of patients with primary sclerosing cholangitis and other autoimmune liver diseases. *Hepatology* 23, 988-993.
- McAllister, C.G., Rapaport, M.H., Pickar, D., Podruchny, T.A., Christison, G., Alphas, L.D., and Paul, S.M. (1989). Increased numbers of CD5+ B lymphocytes in schizophrenic patients. *Arch.Gen.Psychiatry* 46, 890-894.
- Möller, H.J., Laux, G., and Deister, A. (1996). *Psychiatrie* (Stuttgart: Hippokrates Verlag).
- Müller, N. and Ackenheil, M. (1995). Immunoglobulin and albumin content of cerebrospinal fluid in schizophrenic patients: relationship to negative symptomatology. *Schizophr.Res.* 14, 223-228.
- Müller, N. and Ackenheil, M. (1998). Psychoneuroimmunology and the cytokine action in the CNS: implications for psychiatric disorders. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 22, 1-33.
- Müller, N., Ackenheil, M., Hofschuster, E., Mempel, W., and Eckstein, R. (1991). Cellular immunity in schizophrenic patients before and during neuroleptic treatment. *Psychiatry Res.* 37, 147-160.
- Müller, N., Empl, M., Riedel, M., Schwarz, M., and Ackenheil, M. (1997). Neuroleptic treatment increases soluble IL-2 receptors and decreases soluble IL-6 receptors in schizophrenia. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci JID - 9103030* 247, 308-313.
- Müller, N., Gizycki Nienhaus, B., Botschev, C., and Meurer, M. (1993b). Cerebral involvement of scleroderma presenting as schizophrenia- like psychosis [letter]. *Schizophr.Res.* 10, 179-181.

- Müller, N., Hofschuster, E., Ackenheil, M., and Eckstein, R. (1993a). T-cells and psychopathology in schizophrenia: relationship to the outcome of neuroleptic therapy. *Acta Psychiatr.Scand.* 87, 66-71.
- Noy, S., Achiron, A., and Laor, N. (1994). Schizophrenia and autoimmunity--a possible etiological mechanism? *Neuropsychobiology* 30, 157-159.
- Nyland, H., Naess, A., and Lunde, H. (1980). Lymphocyte subpopulations in peripheral blood from schizophrenic patients. *Acta Psychiatr.Scand.* 61, 313-318.
- Pandey, R.S., Gupta, A.K., and Chaturvedi, U.C. (1981). Autoimmune model of schizophrenia with special reference to antibrain antibodies. *Biol.Psychiatry* 16, 1123-1136.
- Pennisi, E. (1996). Teetering on the brink of danger [news; comment] [see comments]. *Science* 271, 1665-1667.
- Pietschmann, P., Cush, J.J., Lipsky, P.E., and Oppenheimer-Marks, N. (1992). Identification of subsets of human T cells capable of enhanced transendothelial migration. *J Immunol* 149, 1170-1178.
- Pollmächer, T., Hinze-Selch, D., Mullington, J., and Holsboer, F. (1995). Clozapine-induced increase in plasma levels of soluble interleukin-2 receptors [letter]. *Arch Gen Psychiatry* 52, 877-878.
- Printz, D.J., Strauss, D.H., Goetz, R., Sadiq, S., Malaspina, D., Krolewski, J., and Gorman, J.M. (1999). Elevation of CD5+ B lymphocytes in schizophrenia. *Biol Psychiatry JID - 0213264* 46, 110-118.
- Rapaport, M.H., Doran, A.R., Nelson, D.L., McAllister, C., Magliozzi, J.R., and Paul, S.M. (1991a). Haloperidol and soluble interleukin-2 receptors [letter]. *Biol Psychiatry* 30, 1063-1064.

- Rapaport, M.H., McAllister, C.G., Kim, Y.S., Han, J.H., Pickar, D., Nelson, D.L., Kirch, D.G., and Paul, S.M. (1994). Increased serum soluble interleukin-2 receptors in Caucasian and Korean schizophrenic patients. *Biol.Psychiatry* 35, 767-771.
- Rapaport, M.H., McAllister, C.G., Kirch, D.G., and Pickar, D. (1991b). The effects of typical and atypical neuroleptics on mitogen- induced T lymphocyte responsiveness. *Biol.Psychiatry* 29, 715-717.
- Raps, A., Abramovich, Y., and Assael, M.e.al. (1986). Relation between schizophrenic-like psychosis and Sjörgen-syndrom (SS). *Isr.J.Psychiatry Relat.Sci.* 23, 321-324.
- Raulet, D.H. (1989). Immunology. Antigens for gamma/delta T cells [news]. *Nature* 339, 342-343.
- Reiber, H. and Felgenhauer, K. (1987). Protein transfer at the blood cerebrospinal fluid barrier and the quantitation of the humoral immune response within the central nervous system. *Clin Chim Acta* 163, 319-328.
- Russo, R., Ciminale, M., Ditommaso, S., Siliquini, R., Zotti, C., and Ruggenini, A.M. (1994). Hepatitis B vaccination in psychiatric patients [letter]. *Lancet* 343, 356-356.
- Schild, H., Mavaddat, N., Litzengerger, C., Ehrich, E.W., Davis, M.M., Bluestone, J.A., Matis, L., Draper, R.K., and Chien, Y.H. (1994). The nature of major histocompatibility complex recognition by gamma delta T cells. *Cell* 76, 29-37.
- Schwarz, M.J., Ackenheil, M., Riedel, M., and Müller, N. (1998). Blood-cerebrospinal fluid barrier impairment as indicator for an immune process in schizophrenia. *Neurosci Lett* 253, 201-203.

- Schwarz, M.J., Riedel, M., Ackenheil, M., and Müller, N. (2000). Decreased levels of soluble intercellular adhesion molecule-1 (sICAM-1) in unmedicated and medicated schizophrenic patients. *Biol Psychiatry* 47, 29-33.
- Schwarz, M.J., Riedel, M., Gruber, R., Ackenheil, M., and Müller, N. (1999). Antibodies to heat shock proteins in schizophrenic patients: implications for the mechanism of the disease. *Am J Psychiatry* 156, 1103-1104.
- Shimonkevitz, R., Colburn, C., Burnham, J.A., Murray, R.S., and Kotzin, B.L. (1993). Clonal expansions of activated gamma/delta T cells in recent-onset multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 923-927.
- Shinitzky, M., Deckmann, M., Kessler, A., Sirota, P., Rabbs, A., and Elizur, A. (1991). Platelet autoantibodies in dementia and schizophrenia. Possible implication for mental disorders. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 621, 205-217.
- Shintani, F., Kanba, S., Maruo, N., Nakaki, T., Nibuya, M., Suzuki, E., Kinoshita, N., and Yagi, G. (1991). Serum interleukin-6 in schizophrenic patients. *Life Sci.* 49, 661-664.
- Sirota, P., Schild, K., Elizur, A., Djaldetti, M., and Fishman, P. (1995). Increased interleukin-1 and interleukin-3 like activity in schizophrenic patients. *Prog.Neuropsychopharmacol.Biol.Psychiatry* 19, 75-83.
- Sperner-Unterweger, B., Whitworth, A., Kemmler, G., Hilbe, W., Thaler, J., Weiss, G., and Fleischhacker, W.W. (1999). T-cell subsets in schizophrenia: a comparison between drug-naive first episode patients and chronic schizophrenic patients. *Schizophr Res JID - 8804207* 38, 61-70.

- Stinissen, P., Vandevyver, C., Medaer, R., Vandegaer, L., Nies, J., Tuyls, L., Hafler, D.A., Raus, J., and Zhang, J. (1995). Increased frequency of gamma delta T cells in cerebrospinal fluid and peripheral blood of patients with multiple sclerosis. Reactivity, cytotoxicity, and T cell receptor V gene rearrangements. *J Immunol* 154, 4883-4894.
- Torrey, E.F. and Peterson, M.R. (1976). The viral hypothesis of schizophrenia. *Schizophr.Bull.* 2, 136-146.
- Tsuang, M.T. and Faraone, S.V. (1995). The case for heterogeneity in the etiology of schizophrenia. *Schizophr Res* 17, 161-175.
- Tsukada, N., Miyagi, K., Matsuda, M., and Yanagisawa, N. (1993). Increased levels of circulating intercellular adhesion molecule-1 in multiple sclerosis and human T-lymphotropic virus type I-associated myelopathy. *Ann Neurol* 33, 646-649.
- Tulek, N., Aydintug, O., Ozoran, K., Tutkak, H., Duzgun, N., Duman, M., and Tokgoz, G. (1996). Soluble intercellular adhesion molecule-1 (sICAM-1) in patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Rheumatol* 15, 47-50.
- van de Stolpe, A. and van der Saag, P.T. (1996). Intercellular adhesion molecule-1. *J Mol Med* 74, 13-33.
- Villemain, F., Chatenoud, L., Galinowski, A., Homo Delarche, F., Ginestet, D., Loo, H., Zarifian, E., and Bach, J.F. (1989). Aberrant T cell-mediated immunity in untreated schizophrenic patients: deficient interleukin-2 production. *Am.J.Psychiatry* 146, 609-616.
- Wen, L., Peakman, M., Mieli-Vergani, G., and Vergani, D. (1992). Elevation of activated gamma delta T cell receptor bearing T lymphocytes in patients with autoimmune chronic liver disease. *Clin Exp Immunol* 89, 78-82.

- Wright, P., Gill, M., and Murray, R.M. (1993). Schizophrenia: genetics and the maternal immune response to viral infection. *Am.J.Med.Genet.* 48, 40-46.
- Wright, P. and Murray, R.M. (1993). Schizophrenia: prenatal influenza and autoimmunity. *Ann.Med.* 25, 497-502.
- Wyatt, R.J., Alexander, R.C., Egan, M.F., and Kirch, D.G. (1988). Schizophrenia, just the facts. What do we know, how well do we know it? *Schizophren Res* 1, 3-18.
- Yolken, R.H. and Torrey, E.F. (1995). Viruses, schizophrenia, and bipolar disorder. *Clin.Microbiol.Rev.* 8, 131-145.
- Young, R.A. and Elliott, T.J. (1989). Stress proteins, infection, and immune surveillance. *Cell* 59, 5-8.
- Yovel, G., Sirota, P., Mazei, D., Shakhar, G., Rosenne, E., and Ben-Eliyahu, S. (2000). Higher natural killer cell activity in schizophrenic patients: the impact of serum factors, medication, and smoking. *Brain Behav Immun JID - 8800478* 14, 153-169.

## 9 Lebenslauf

12. April 1970                      Miriam Anna Hadjamu  
geboren in Wuppertal

### Ausbildung

1989	Abitur am Leibniz - Gymnasium, Remscheid
'89 bis '90	Jurastudium an der westfälische Wilhelms- Universität Münster
'90 bis '91	Freiwilliges soziales Jahr, Malteser Krankenhaus Bonn
'91 bis '98	Medizinstudiums an der LMU München Juni 1998 3. Staatsexamen für Medizin
April '98	Geburt meiner ersten Tochter
seit Juni '98	Erziehungsurlaub
Juli '01	Geburt meiner zweiten Tochter

### Veröffentlichungen

1998	Schizophrenia Research: Increased frequency of CD8 positive gamma/delta T-lymphocytes (CD8+ gamma/delta+) in unmedicated schizophrenic patients: relation to impairment of the blood-brain barrier and HLA-DPA*02011 [letter]
1999	The American Journal of Psychiatry: Increase in expression of adhesion molecule receptors on T helper cells during antipsychotic treatment and relationship to blood-brain barrier permeability in schizophrenia

### **Danksagung**

Herzlich bedanken möchte ich mich bei Prof. Müller für die freundliche Überlassung des Themas und die Betreuung während der gesamten Arbeit, trotz vollem Terminkalender fand er immer Zeit Teile der Arbeit durchzusprechen.

Für die Hilfe bei der praktischen Ausführung der Arbeit möchte ich mich bei Dr. Gruber und Jürgen Primbs bedanken, die mir bei der Laborarbeit hilfreiche Unterstützung gaben, sowie bei Prof. Ackenheil und Prof. Riethmüller für die Möglichkeit den praktischen Teil der Arbeit an Ihren Instituten durchzuführen.