

Veränderungen von CD4⁺CD25^{hi}-regulatorischen T-Zellen unter antidepressiver Therapie

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Dr. med.

an der Medizinischen Fakultät

der Universität Leipzig

eingereicht von:

Saša Milenović

geboren am 28.08.1976 in Meerbusch

angefertigt an der:

Claussen-Simon-Stiftungsprofessur für Neurobiologie affektiver Störungen innerhalb der
Klinik und Poliklinik für Psychiatrie und Psychotherapie der Universität Leipzig,

der Klinik für Psychiatrie, Psychotherapie und Psychosomatik der RWTH Aachen

und

dem Institut für Immunologie der RWTH Aachen

Betreuer:

Prof. Dr. med. Hubertus Himmerich

Beschluß über die Verleihung des Doktorgrades vom: 24.02.2015

Bibliographische Zusammenfassung

Milenović, Saša

Veränderungen von CD4⁺CD25^{hi}-regulatorischen T-Zellen unter antidepressiver Therapie

Universität Leipzig, Monographische Dissertation

83 Seiten, 211 Literaturstellen, 5 Abbildungen, 1 Tabelle

Referat:

Regulatorische T-Zellen (Tregs, CD4⁺CD25^{hi}-Tregs) haben u. a. die Aufgabe, die Immunantwort sowie die Zytokinfreisetzung zu steuern, um die Immuntoleranz gegenüber körpereigenen Antigenen aufrecht zu erhalten. Es wurde beschrieben, dass depressive Patienten eine erniedrigte Konzentration von Tregs aufweisen. Da es Hinweise darauf gibt, dass Zytokine wie Interleukin (IL)-1 β , IL-6 und Interferon (IFN)- α eine Rolle in der Pathophysiologie der Depression spielen, und dass sich die Konzentrationen dieser Zytokine während antidepressiver Therapie ändern, untersuchten wir Veränderungen der Produktion von IL-1 β , IL-6 und IFN- α und Veränderungen der Konzentration von CD4⁺CD25^{hi}-Tregs während antidepressiver Therapie.

Wir gewannen dazu das Blut von 16 Patienten mit depressiver Störung in der ersten und sechsten Woche nach stationärer Aufnahme, indem wir die Plasmakonzentrationen von IL-1 β bestimmten. Ferner wurde die Produktion von IL-1 β , IL-6 und IFN- α in einem Vollblut-Assay unter immunologischer Stimulation mit Lipopolysaccharid (LPS) oder Newcastle Disease Virus (NDV) in-vitro gemessen. Die Lymphozyten wurden differenziert und CD4⁺CD25^{hi}-Tregs mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Der psychopathologische Status wurde mit der Hamilton-Depressionsskala (HAMD-21) erfasst.

Der HAMD-21-Score, die IL-1 β -Plasmakonzentrationen sowie die LPS-induzierte IL1- β - und IL-6-Produktion waren nach sechs Wochen antidepressiver Behandlung signifikant gegenüber der Baseline erniedrigt. Dagegen stieg der Anteil der CD4⁺CD25^{hi}-Tregs unter den Lymphozyten von 2,74% \pm 0,88 (Mittelwert \pm Standardabweichung) auf 3,54% \pm 1,21 signifikant ($p = 0,007$) an. Es fand sich keine signifikante Änderung der NDV-induzierten IFN- α -Produktion.

Der Anstieg der CD4⁺CD25^{hi}-Tregs während antidepressiver Therapie könnte mit dem Abfall der Zytokinproduktion und der psychopathologischen Verbesserung der Patienten in einem kausalen Zusammenhang stehen.

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

AAM	Alternativ aktivierte Makrophagen
Abb.	Abbildung
ANOVA	Varianzanalyse
ASS	Acetylsalicylsäure
BDI	Beck-Depressionsinventar
BDNF	Brain Derived Neurotrophic Factor
CD	Cluster of Differentiation
COX	Cyclooxygenase
CRH	Corticotropin Releasing Hormone
DGPPN	Deutsche Gesellschaft für Psychiatrie, Psychotherapie, Psychosomatik und Neurologie
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNT	Doppelt negative T-Zellen
EP1	Prostaglandin-E-Rezeptor 1
EPO	Erythropoetin
EK	Ethikkommission
EKT	Elektrokrampftherapie
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
FACS	Fluorescence-activated Cell Sorting
fMRT	Funktionelle Magnet-Resonanz-Tomographie
Foxp3	Forkhead-Box-Protein p3
FSC	Forward Scatter
FST	Forced Swim Test
GAF	Global Assessment of Functioning Score
HAMD	Hamilton-Depressionsskala

Abkürzungsverzeichnis

HAU	Haemagglutination Unit
hi	high
HIF-1	Hypoxie-induzierter Faktor
HPA-Achse	Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse
HSV-1	Herpes-Simplex-Virus Typ 1
HT	Hydroxy-Tryptophan
ICD-10	International Classification of Diseases
IDO	Indolamin-2,3-Dioxygenase
IFN- α	Interferon-alpha
IFN- γ	Interferon-gamma
IL	Interleukin
IP-10	Interferon-gamma-induziertes Protein-10
IPEX	Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked Syndrome
iTregs	induzierte T-regulatorische Zellen
IQR	Interquartile Range
KHK	Koronare Herzkrankheit
LPS	Lipopolysaccharid
1-MT	1-Methyl-L-Tryptophase
mM	Millimol
mRNA	Massenger-Ribonukleinsäure
MS	Multiple Sklerose
NDV	Newcastle Disease Virus
NKT	Natürliche Killer T-Zellen
NSAID	Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs
nTregs	naive T-regulatorische Zellen
PMT	Photomultiplier
PGE2	Prostaglandin E2

Abkürzungsverzeichnis

PIF	Prolaktin-inhibierender Faktor
PTSD	Posttraumatic Stress Disorder
RKI	Robert Koch-Institut
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RWTH	Rheinisch-Westfälische Technische Hochschule (Aachen)
SD	Standardabweichung
sIL-2R	Löslicher IL-2-Rezeptor
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
SSC	Side Scatter
SSRI	Selektiver Serotonin-Rückaufnahmehemmer
SNRI	Selektiver Noradrenalin-Rückaufnahmehemmer
STAR*D	Sequenced Treatment Alternatives to Relieve Depression
sTNF-R	Löslicher TNF- α Rezeptor
Tab.	Tabelle
TCR	T-Zell-Rezeptor
TDO	Tryptophan-2,3-Dioxygenase
TGF- β	Transforming Growth Factor- β
Th1	T-Helferzellen Typ 1
Th2	T-Helferzellen Typ 2
Th17	T-Helferzellen Typ 17
TNF- α	Tumornekrosefaktor-alpha
Tregs	Regulatorische T-Lymphozyten
U	Units
WHO	World Health Organization
ZNS	Zentralnervensystem

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	4
Inhaltsverzeichnis	7
1. Einführung.....	9
1.1 Begriffsdefinition und Diagnosekriterien der Depression	9
1.2 Epidemiologische Bedeutung der Depression.....	12
1.3 Neuroimmunologische Aspekte bei unipolarer Depression.....	13
1.3.1 Immunsystem: Zellen und Zytokine	14
1.3.1.1 Tregs.....	15
1.3.2 Molekulare Effekte von Zytokinen	18
1.3.3 Immunologische Befunde bei Depressionen.....	21
1.3.4 Bedeutung der Zytokine für den Therapieverlauf.....	23
1.3.5 Zusammenhang von Zytokinen mit einzelnen depressiven Symptomen.....	24
1.3.6 Zytokine als mögliche Prädiktoren für den Therapieerfolg	25
1.3.7 Immunologische Veränderungen unter antidepressiver Behandlung.....	25
1.3.8 Exkurs: Multiple Sklerose und Depression.....	26
1.3.9 Antidepressive Effekte von Immunmodulatoren	28
1.3.10 Experimente und Messmethoden	29
1.3.10.1. Messung von Zytokinkonzentrationen	29
1.3.10.1a Vollbluttest	30
1.3.10.1b Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)	30
1.3.10.2 Identifizierung, Differenzierung und Quantifizierung von T-Zellen mittels Durchflusszytometrie	31
2. Aufgabenstellung	34
3. Materialien und Methoden	35
3.1 Versuchspersonen.....	35
3.2 Studiendurchführung.....	35
3.3 Zytokinbestimmung und Zellquantifizierung.....	36
3.4 Statistische Analyse.....	37
4. Ergebnisse	39
5. Diskussion	44
5.1 Zusammenfassung der Ergebnisse	44
5.2 Bedeutung der Ergebnisse.....	44
5.3 Mögliche Erklärungen für die erhaltenen Ergebnisse	45
5.4 Limitationen der Untersuchung.....	47
5.5. Limitationen der Zytokinhypothese für die Depression.....	47
6. Zusammenfassung.....	49

7. Literaturverzeichnis.....	50
8. Anlagen	74
9. Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit	80
10. Lebenslauf und wissenschaftlicher Werdegang	81
10.1 Lebenslauf	81
10.2 Publikationen.....	82
11. Danksagung	83

1. Einführung

1.1 Begriffsdefinition und Diagnosekriterien der Depression

Die depressive Erkrankung gehört zu den häufigsten affektiven Störungen und weist neben der depressiven Verstimmung mit Verlust von Interesse und Freude Veränderungen der Psychomotorik sowie verschiedene körperliche Funktionsstörungen als Symptomatik auf. Beim Auftreten mehrerer Krankheitsphasen wird von einer rezidivierenden depressiven Störung gesprochen. Zu den weiteren Beschreibungen gehören die Ausprägung des Schweregrades, das Vorhandensein „somatisch-endogener Symptome“ oder psychotische Merkmale sowie der Remissionsgrad (Dilling et al. 2005).

Die drei Kernsymptome einer depressiven Episode nach der International Classification of Diseases – 10 (ICD-10) sind gedrückte Stimmung, Anhedonie sowie Antriebsminderung. Die Stimmung reicht je nach Schweregrad von einer leichten depressiven Herabgestimmtheit bis hin zu einer schweren Gefühllosigkeit. Dabei können Tagesschwankungen auftreten mit den typischerweise auftretenden Morgentiefs. Die Anhedonie ist gekennzeichnet durch eine verminderte Fähigkeit, Freude an positiven Dingen zu empfinden. Der Antrieb ist in der Regel vermindert und gehemmt, so dass der Betroffene interesselos und entscheidungsarm wirkt (Dilling et al. 2005).

Die sieben Zusatzsymptome der Depression nach ICD-10 sind:

- Aufmerksamkeits- und Konzentrationsdefizite
- Vermindertem Selbstwertgefühl und Selbstvertrauen
- Schuldgefühle und Gefühle von Wertlosigkeit
- Negative und pessimistische Zukunftsgedanken
- Suizidalität
- Schlafstörungen
- Verminderter Appetit

Bestehen über einen Zeitraum von mindestens zwei Wochen

- Zwei der Hauptsymptome sowie zwei weitere Zusatzsymptome, dann spricht man von einer leichten,
- Drei bis vier Zusatzsymptome von einer mittelschweren und bei

1. Einführung

- Drei Hauptsymptomen und mehr als vier Zusatzsymptomen von einer schweren depressiven Episode (Dilling et al. 2005).

Psychotische Symptome werden nur der schweren depressiven Episode zugeordnet und bestehen häufig aus einem (synthymen) Wahn mit nihilistischem, Versündigungs- oder Verarmungsinhalt. Psychomotorische Hemmung bzw. ein Stupor können alltägliche Aktivitäten unmöglich machen und Lebensgefahr durch Suizidalität sowie mangelnde Flüssigkeits- und Nahrungsaufnahme verursachen.

Eine Sonderform der Depression stellt die atypische Depression dar, die ein früheres Manifestationsalter aufweist, bei Frauen häufiger vorkommt und bei der folgende Symptome im Vordergrund stehen:

- Hyperphagie
- Gewichtszunahme
- Hypersomnie
- Leichte Kränkbarkeit bei interpersoneller Zurückweisung (Dilling et al. 2005).

Vom somatischen Syndrom nach ICD-10 spricht man, wenn mindestens vier der folgenden acht Merkmale vorhanden sind:

- Deutlicher Verlust an Freuden und Interessen
- Mangelnde Fähigkeit, emotional auf Ereignisse zu reagieren
- Frühmorgendliches Erwachen (zwei Stunden vor gewünschter Zeit)
- Morgentief
- Objektive Hinweise auf ausgeprägte psychomotorische Hemmung/Agitiertheit
- Deutlicher Appetitverlust
- Gewichtsverlust (5% im vergangenen Monat)
- Deutlicher Libidoverlust.

Aufgrund der Phänomenologie lassen sich weitere Unterformen der Depression beschreiben. Die „gehemmte“ Depression ist durch eine Reduktion von Psychomotorik und Aktivität gekennzeichnet und kann mit Stupor eine Extremform annehmen. Dagegen ist die „ängstlich-agitierte“ Depression von einer Getriebenheit, unproduktivem Handeln und Jammern gekennzeichnet. Bei der „larvierten“ Depression stehen vielfältige funktionelle Beschwerden im Vordergrund und spielen in der ärztlichen Praxis eine besondere Rolle.

1. Einführung

Unipolare depressive Erkrankungen neigen zur Spontanbesserung. Die mittlere Dauer einer unbehandelten Depression beträgt etwa sechs bis zwölf Monate (Lavori et al. 1984). Dabei liegt die Dauer eines Zyklus (Zeitspanne zwischen Beginn einer Phase und Beginn der nächstfolgenden) bei vier bis fünf Jahren (Zis und Goodwin 1979; Angst 1980; Laux 1986). Nach einer ersten depressiven Episode liegt die Rezidivwahrscheinlichkeit bei 50%, nach einer zweiten Episode bei 80% und nach einer dritten bei 90% (Goodwin und Jamison 1990). Maj et al. fanden 1992 eine Rezidivwahrscheinlichkeit von 76% nach sechs Monaten, 63% nach einem Jahr und 25% innerhalb von 5 Jahren. Surtees und Barkley beschrieben 1994 Rezidivraten von 35% innerhalb von zwei Jahren und 60% innerhalb von 12 Jahren. Bei einem andauernden Verlauf von mindestens zwei Jahren spricht man von einer chronischen depressiven Episode, die bei 15-30% der Patienten auftritt (Angst 1980; Laux 1986; Keller et al. 1992). Als Risikofaktor für Chronifizierung wurden eine über zwei Jahre dauernde Episodendauer, fehlende Remission innerhalb von 5 Jahren sowie ein Global Assessment of Functioning (GAF)-Score von unter 61 mit Ersterkrankungsalter über 50 Jahren beschrieben (Angst et al. 1996). Im höheren Alter dauern depressive Episoden häufig länger und neigen zu einem chronifizierten Verlauf (Alexopoulos 1996; Cole und Bellavance 1997). Dabei nehmen etwa 25% binnen 10 Jahren einen bipolaren Verlauf an.

Für die Diagnose einer rezidivierenden depressiven Episode werden nach ICD-10 zwei depressive Episoden mit mindestens zwei Wochen Dauer gefordert, die nach einem symptomfreien Intervall von mindestens zwei Monaten auftreten.

Zur Diagnosestellung einer unipolaren Depression ist in der Anamnese eine hypomane oder manische Symptomatik ausgeschlossen, die beschriebene depressive Symptomatik ist nicht durch Konsum psychotroper Substanzen induziert worden, und es liegt keine hirnorganische Erkrankung vor. Eine Remission bedeutet die Wiederherstellung des prämorbidem Niveaus mit Symptomfreiheit für sechs Monate nach Ende der depressiven Episode. Von einem Rückfall in die Depression spricht man, wenn die depressive Symptomatik innerhalb von vier bis sechs Monaten nach der Remission auftritt.

Eine Sonderform stellt die Dysthymia dar. Dabei besteht die depressive Symptomatik konstant über einem Zeitraum von mindestens zwei Jahren, wobei dazwischen die symptomfreien Intervalle nicht länger als einige Wochen andauern. Die Kriterien für eine rezidivierende leichte Depression sollen allerdings nicht erfüllt werden.

1. Einführung

1.2 Epidemiologische Bedeutung der Depression

Die WHO schätzt die Zahl weltweit an depressiven Störungen erkrankten Menschen auf etwa 350 Millionen. Dieser Schätzung liegt eine Datenerhebung in 17 Ländern zugrunde. In diesen Ländern hatte eine von 20 Personen im Jahr zuvor eine depressive Episode. Aufgrund des Manifestationsalters in jungen Jahren sowie der rezidivierenden Verlaufsform gehört diese häufigste affektive Erkrankung zu den weltweit führenden Ursachen einer Erwerbsunfähigkeit bzw. Invalidisierung bei beiden Geschlechtern (WHO 2012). Lebenszeitprävalenzraten rangieren zwischen 3% (Japan) und etwa 17% (USA), liegen somit etwa bei 8-12% im Mittel weltweit (Wittchen und Jacobi 2005). In Deutschland beträgt die Prävalenz etwa 12% (5-6 Mio. Menschen, in Europa insgesamt 20 Mio.), davon manifestiert sich in 50% der Fälle die Depression vor dem 30. Lebensjahr, die Erstmanifestation nach dem 65. Lebensjahr ist selten und beträgt etwa 10% (Berger 2009). In allen Altersgruppen sind Frauen mit 14,2% etwa doppelt so häufig wie Männer mit 7,6% betroffen, dabei fallen die Unterschiede in jüngeren Altersgruppen deutlich geringer aus. Das höchste Erkrankungsrisiko haben Frauen zwischen 40 und 65 Lebensjahren, ferner zeigen diese häufiger einen chronischen Verlauf mit 6% vs. 5% bei Männern (Wittchen und Jacobi 2005). Während das Erkrankungsrisiko für Kinder unter 14 Jahren mit 2-3% noch relativ niedrig liegt, ist bei Kindern und Jugendlichen zwischen 15 und 17 Jahren mit einer ähnlich hohen Querschnittsprävalenz im Vergleich zu den Erwachsenen zu rechnen (Wittchen 1998). Studien zur Analyse der ersten Erkrankungsphase zeigten, dass die Manifestation prinzipiell in jedem Lebensalter möglich ist, findet aber zwischen 15 und 30 Jahren am häufigsten statt. Dabei liegt das mittlere Manifestationsalter für Erwachsene zwischen 25 und 30 Jahren, was deutlich später im Vergleich zur Manifestation einer bipolaren Störung ist (15-25 Jahren) (Jacobi 2005). Depressive Störungen treten überzufällig häufig mit anderen psychischen und somatischen Erkrankungen auf. In 60% bei einer depressiven Episode sowie in 80% bei einer Dysthymie treten weitere psychische Erkrankungen auf (Paykel et al. 2005). Dabei sind in erster Linie diverse Formen der Angsterkrankungen, somatoforme Störungen und Suchterkrankungen zu nennen. Obwohl eine erhöhte Depressionsprävalenz bei einer Vielzahl von körperlichen und neurologischen Erkrankungen vorliegt, bleibt es weiter unklar, ob Depressionen Risikofaktoren für somatische Grunderkrankungen (KHK, Diabetes mellitus, Apoplex, Demenz) sind oder umgekehrt.

Etwa 1 Million weltweit sterben jährlich durch Suizid, was umgerechnet 3000 Fälle täglich beträgt; auf jeden erfolgreichen Suizid kommen statistisch gesehen etwa 20 Suizidversuche (WHO 2012). Schätzungsweise werden 65 bis 90% aller Suizide durch psychische

1. Einführung

Erkrankungen verursacht, dabei am häufigsten durch eine Depression (Krug 2002). Umgekehrt gilt, dass etwa 3-4% der depressiven Menschen durch Suizid sterben (Wolfersdorf 2008). Im Jahr 2008 wurden in Deutschland 9.745 Suizide registriert, dabei war der Anteil an männlichen Suizidenten dreimal so hoch wie der der Frauen (7.039 vs. 2.412). Seit den 1990er Jahren ist ein Rückgang der Suizidrate in Deutschland zu verzeichnen, allerdings erfolgt dieser unterschiedlich ausgeprägt in den einzelnen Altersgruppen. Bei Betrachtung des Alters fällt ein erhöhtes Risiko für Suizidgedanken und Suizidversuche bei depressiven Kindern und Jugendlichen auf. Bis zum 29. Lebensjahr ist der Suizid die zweithäufigste Todesursache nach dem Unfalltod (Gesundheitsbericht des Bundes 2010).

Die Streuung der epidemiologischen Daten liegt insbesondere an mangelnden standardisierten diagnostischen Screenings in den einzelnen Ländern weltweit. Trotz kultureller Unterschiede und unterschiedlich verfügbarer medizinischer Möglichkeiten zur Diagnostik und Therapie von Depressionen, können in allen Ländern der Welt die Symptome der depressiven Episode als solche beschrieben und identifiziert werden. Allerdings sind die Behandlungsmöglichkeiten nur 25% der Betroffenen zugänglich (WHO 2012). Einer weiteren WHO-Studie zur Folge entstehen „treatment gaps“ mit einer mittleren Rate von 50% unbehandelter Menschen (Kohn 2004), in einigen Ländern sind sogar weniger als 10% der Menschen in psychiatrischer Behandlung, und wenn Therapie erhalten wird, ist sie häufig inadäquat. Auf der Suche nach den Ursachen niedriger Therapieraten fanden sich eine Reihe von Faktoren, die vornehmlich durch die existierenden Gesundheitssysteme, die bestehenden finanziellen Barrieren und das mangelnde Wissen über Depressionen bei Patienten und Ärzten ausgelöst werden, und nicht etwa durch den individuellen Krankheitsverlauf selbst (Simon et al. 2004). Ein weiteres ernst zu nehmendes Problem ist in einigen Ländern die Anzahl des fachlich qualifizierten Personals. Man schätzt die Anzahl aller Psychiater in Äthiopien auf etwa 26 bei ca. 80 Millionen Einwohnern. Im Vergleich dazu kommt in Deutschland auf etwa 17.000 Einwohnern ein Nervenarzt (DGPPN 1999).

1.3 Neuroimmunologische Aspekte bei unipolarer Depression

Obwohl effektive Antidepressiva seit der Entdeckung von Imipramin 1956 durch Roland Kuhn zur Verfügung stehen (Kuhn 1958; Steinberg und Himmerich 2012), sprechen nur etwa die Hälfte aller depressiven Patienten auf die erstverschriebenen Antidepressiva an. Ein innovativer Ansatz könnte die Immunmodulation sein.

1. Einführung

Bereits seit der Antike wurde das gemeinsame Auftreten von psychiatrischen und somatischen Symptomen beobachtet, denen, wie man viele Jahrhunderte später herausfand, Veränderungen des Immunsystems zugrunde liegen. Zu Beginn des 20. Jahrhunderts behandelte der österreichische Psychiater Wagner-Jauregg erfolgreich Patienten mit Neuroleues im Stadium der progressiven Paralyse mit Impfstoffen, die Malariaerreger enthielten. Er beobachtete außerdem, dass insbesondere psychotische und depressive Patienten in der Akutphase ihrer Erkrankung remittierten, wenn ein fieberhafter Infekt bei ihnen auftrat (Himmerich et al. 2012). Die dahinter mutmaßlich verborgenen Pathomechanismen blieben für lange Zeit unbekannt. Die Erforschung der Rolle der Zytokine, das sind Botenstoffe des Immunsystems, bei depressiven Störungen hat entscheidende Beiträge zum Verständnis des Zusammenhangs zwischen der depressiven Erkrankung und dem Immunsystem geliefert, und sie könnte nicht nur zur Entwicklung neuer Medikamente beitragen, sondern auch weitere Erkenntnisse über den Krankheitsverlauf hervorbringen und die Entschlüsselung pathophysiologischer Mechanismen beschleunigen. Zytokine könnten als zukünftige Biomarker fungieren und Therapieresponse, Krankheitsschwere, Suizidrisiko und sogar Krankheitsrezidive vorhersagen, lange bevor die ersten Symptome auftreten. Letztlich könnten Zytokine zur neuen Klassifikation depressiver Erkrankungen führen. Beispielsweise postulieren Rothermundt et al. (2001) Unterschiede in immunologischen Befunden bei melancholischer und nicht-melancholischer Depression, die auf Veränderungen der Immunzellzahl und Zytokinkonzentrationen im Blut basieren.

1.3.1 Immunsystem: Zellen und Zytokine

Das Immunsystem, das in ein angeborenes und ein erworbenes System eingeteilt werden kann, besteht aus einem komplexen Zusammenspiel zwischen Immunzellen, Gewebszellen und Botenstoffen, den Zytokinen.

Zytokine sind von aktivierten Immunzellen, wie z. B. den Monozyten, Lymphozyten, Granulozyten oder Eosinophilen, produzierte Peptide mit niedermolekularem Gewicht oder Glykoproteinmediatoren, die auch u. a. von Endothel- und Epithelzellen sowie von Fibroblasten synthetisiert werden. Als Signalstoffe üben sie über spezifische Rezeptoren zwischen den Zielzellen vielfache Effekte aus. Dabei spielen Zytokine eine wichtige Rolle im Kommunikationssystem des neuroendokrinoimmunologischen Netzwerks.

Pro-inflammatorische, also Entzündungsvorgänge fördernde Zytokine scheinen bei Patienten mit depressiven Störungen vermehrt produziert zu werden (Dantzer 2009; Müller und

1. Einführung

Schwarz 2007). Außerdem soll eine Imbalance zwischen T-Helfer-Zellen (Th) vom Typ 1 (Th1) und Typ 2 (Th2) zu Ungunsten von Th2-Zellen vorhanden sein (Dantzer 2009). Die Th1-Immunantwort ist durch die Ausschüttung der Th1-Zytokine Interferon (IFN)- α und Interleukin (IL)-2 charakterisiert. Andere pro-inflammatorische Zytokine wie IL-1 β , IL-6 und Tumornekrosefaktor (TNF)- α werden überwiegend von Monozyten und Makrophagen sezerniert. Zytokine binden an spezifische Immunzell-Rezeptoren und führen zur weiteren Ausschüttung pro- und anti-inflammatorischer Zytokine. Beispielsweise stimuliert IFN- γ die Th1-Antwort und unterdrückt die Freisetzung der Th2- Zytokine, wie z. B. IL-4 und IL-10.

Andere vor einigen Jahren entdeckte Immunkomponenten sind regulatorische T-Lymphozyten (Tregs) und Th-Zellen vom Typ 17 (Th17). Tregs exprimieren spezifische Zelloberflächenmoleküle, sogenannte cluster of differentiation (CD)4⁺ und CD25⁺, anhand derer sie identifiziert werden können. Sie gehören zu einer hochspezialisierten Subpopulation von T-Zellen und unterdrücken u. a. inflammatorische und autoimmune Prozesse (Maloy et al. 2001, Vignali et al. 2008), indem sie vermutlich die Proliferation von T-Effektorzellen inhibieren sowie die dazugehörige Zytokinbildung (Suri-Payer et al. 1998; Piccirillo et al. 2001; Li et al. 2007; weiteres auch im Kapitel 1.3.3).

1.3.1.1 Tregs

Erstmalig wurden Tregs in den frühen 1970er Jahren beschrieben und als Suppressor-T-Zellen bezeichnet (Gershon et al. 1971, 1972). Nach zahlreichen, erfolglosen Bemühungen, diese Zellen zu isolieren, konnten Sakaguchi et al. 1995 nachweisen, dass die IL-2-Rezeptor- α -Kette (CD25) einen potentiellen phänotypischen Marker für Tregs darstellt (Sakaguchi et al. 1995). Dies war der Anstoß weiterer Treg-Forschung. Mittlerweile unterteilt man diverse Subpopulationen von Tregs nach der Expression von Oberflächenmolekülen, nach der Zytokinproduktion und deren Interaktion bei Immunprozessen (s. **Abbildung 1**). Natürlich vorkommende und aus dem Thymus stammende CD4⁺CD25⁺-Tregs stellen eine T-Zellpopulation mit immunsuppressiven Eigenschaften dar, welche etwa 5-10% der Gesamt-CD4⁺-T-Zellen im peripheren Blut ausmacht (Sakaguchi 2000, 2005).

Neben der Expression von CD25 besitzen diese Zellen eine große Anzahl weiterer Marker, aber keiner von ihnen ist für eine hundertprozentig spezifische Erkennung von Tregs geeignet, da sie auch von anderen aktivierten T-Zellpopulationen sowie Antigen-präsentierenden Zellen exprimiert werden können. Mehrere Studien konnten den transcription factor forkhead box P3

1. Einführung

(Foxp3) als einen spezifischen intrazellulären Marker für die Tregs identifizieren (Hori et al. 2003, Fontenot et al. 2005).

Zusätzlich ist Foxp3 ein wichtiger Transkriptionsfaktor bei der Entwicklung und Reifung der CD4⁺CD25⁺-Tregs. Ein Funktionsverlust durch Foxp3-Mutation bewirkt sowohl bei Mäusen als auch bei Menschen schwere autoimmune Erkrankungen (Wildin et al. 2002, 2005), wie „scurfy mice“ (ein lymphoproliferatives Syndrom mit Multiorganinflammation und -Versagen) und IPEX (immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked)-Syndrom beim Menschen. Die wichtige Rolle von Foxp3 wurde in weiteren Studien bestätigt, bei denen eine extope Foxp3-Expression in T-Zellen zu einer Generierung von Zellen mit einem regulatorischen Phänotyp und suppressiver Funktion führte (Hori et al. 2003, Fontenot et al. 2003). Zusätzlich konnte nachgewiesen werden, dass Foxp3 im Prinzip wie ein supprimierender Transkriptionsfaktor an IL-2- sowie an anderen Zytokin-Genen wirkt (z.B. IL-4 und IFN- γ), mit der Folge, dass die entsprechende Zelle keine Immunstimulation ausübt (Rudensky et al. 2006; Betelli et al. 2005; Wu et al. 2006). Diese Befunde konnten auch in humanen Studien bei aktivierten T-Zellen bestätigt werden (Wang et al. 2007). In unserer Studie untersuchten wir Tregs ohne Rücksicht auf den Foxp3-Status der Zellen, weil es kontroverse Ergebnisse bezüglich muriner und humaner Tregs gibt. Beispielsweise fand man heraus, dass der Transkriptionsfaktor Foxp3 bei Mäusen essentiell ist, während es bei Menschen unterschiedliche Ergebnisse bezüglich Tregs gibt, seitdem Morgan et al. (2005) beschrieben haben, dass Foxp3 auch in anderen T-Zellen exprimiert wird. Stattdessen wählten wir den Weg, CD4⁺-Zellen, die gleichzeitig CD25 exprimieren (CD4⁺CD25⁺-Tregs), und CD4⁺-Zellen, die gleichzeitig CD25 hoch exprimieren (CD4⁺CD25^{hi}-Tregs), zu bestimmen, um möglichst spezifisch Tregs zu messen.

Ob CD4⁺CD25⁺-Tregs eine separate Zelllinie darstellen oder aus T-Stammzellen in der Peripherie generiert werden, bleibt Gegenstand der wissenschaftlichen Diskussion. Die sogenannten Hassall'schen Körperchen im Thymusepithel scheinen eine gewichtige Rolle in der Generierung von Tregs zu besitzen (Liu et al. 2007; Watanabe et al. 2005). Neonatale Mäuse, die einer Thymektomie unterzogen werden, entwickeln spontan Autoimmunerkrankungen (Shih et al. 2004; Bagavent et al. 2002). Dabei ist erwähnenswert, dass die Funktion des Thymus auf die Zeit vor der Pubertät des Menschen beschränkt ist, Tregs aber ein Leben lang persistieren, was die Annahme bestärkt, dass Tregs aus einem aus dem Thymus emmigrierten Zellpool selbsterneuender und langlebiger omnipotenter Zellen stammt, einer Art CD4⁺CD25⁺Foxp3-T-Gedächtniszellen (Vukmanovic-Stejic et al. 2006).

1. Einführung

Tregs besitzen die Fähigkeit, die Differenzierung von naiven T-Zellen zu Th1, Th2 oder Th17-Zellen und deren Effektorfunktionen zu unterdrücken. Durch diese Eigenschaft sind sie maßgeblich an der Erhaltung der Selbsttoleranz beteiligt (Sakaguchi und Powrie 2007). Tregs bewahren den Organismus vor Autoimmunerkrankungen (Kim et al. 2007; Suri-Payer und Fritzsching 2006), Allergien (Romagnani 2006) und sind in der Lage, Transplantatabstoßungen zu vermeiden (Sakaguchi et al. 2001). Sie haben aber auch die Fähigkeit, durch ihre immunsuppressive Funktion schützende Immunantworten gegen Infektionen und Tumore zu unterdrücken (Bacchetta et al. 2007; Bopp et al. 2007).

Mittlerweile können Tregs in Untergruppen eingeteilt und ihre Differenzierung verstanden werden. Auch wenn dies für das Verständnis dieser Arbeit nicht notwendig ist, soll im Folgenden ein kleiner Einblick in die vorliegenden Erkenntnisse gegeben werden. Tregs verlassen als natürliche Tregs (nTregs), die eine funktionell aktive und differenzierte T-Zellpopulation darstellen, den Thymus (Seddon und Mason 2000; Itoh et al. 1999). Diese nTregs sind schon auf ihre immunsuppressive Funktion spezialisiert, bevor sie mit einem spezifischen Antigen in Kontakt kommen. Das unterscheidet nTregs von anderen Treg-Typen, wie zum Beispiel Treg1 (CD4⁺ regulatorische T-Zellen vom Typ1)- und Th3 (T-Helferzellen Typ3)-Zellen, welche sich unter bestimmten Umständen in der Peripherie aus naiven CD4⁺ T-Zellen entwickeln. Diese Tregs werden im Gegensatz zu den nTregs als induzierte Tregs (iTregs) bezeichnet (Chen et al. 2003; Apostolou und von Boehmer 2004). Die Klassifikation der iTregs basiert auf die Expressierung unterschiedlicher suppressiver Zytokine. Treg1 beispielsweise bilden hohe IL-10-Konzentrationen und moderat auch IL-5, IFN- γ sowie Transforming Growth Factor beta (TGF- β). Sie bilden allerdings kein IL-2 und IL-4 (Roncarolo et al. 2006, 2001). Th3-Zellen exprimieren insbesondere TGF- β (Weiner et al. 2001; Faria et al. 2006). Beide Arten der iTregs, in deren Generierung andere Tregs involviert sind, vermögen gleichermaßen Th1- und Th2-gesteuerte Immunantworten zu hemmen.

Alle Tregs benötigen für ihre suppressive Wirkung T-Zellrezeptoren (TCR). Dabei scheint die hemmende Aktivität Antigen-nonspezifisch zu sein (Sakaguchi et al. 1995). Die exakten Mechanismen, in denen Tregs T-Effektorzellen hemmen, sind unklar. Ergebnisse zahlreicher in vitro- und in vivo-Studien an Mäusen und Menschen sind häufig widersprüchlich.

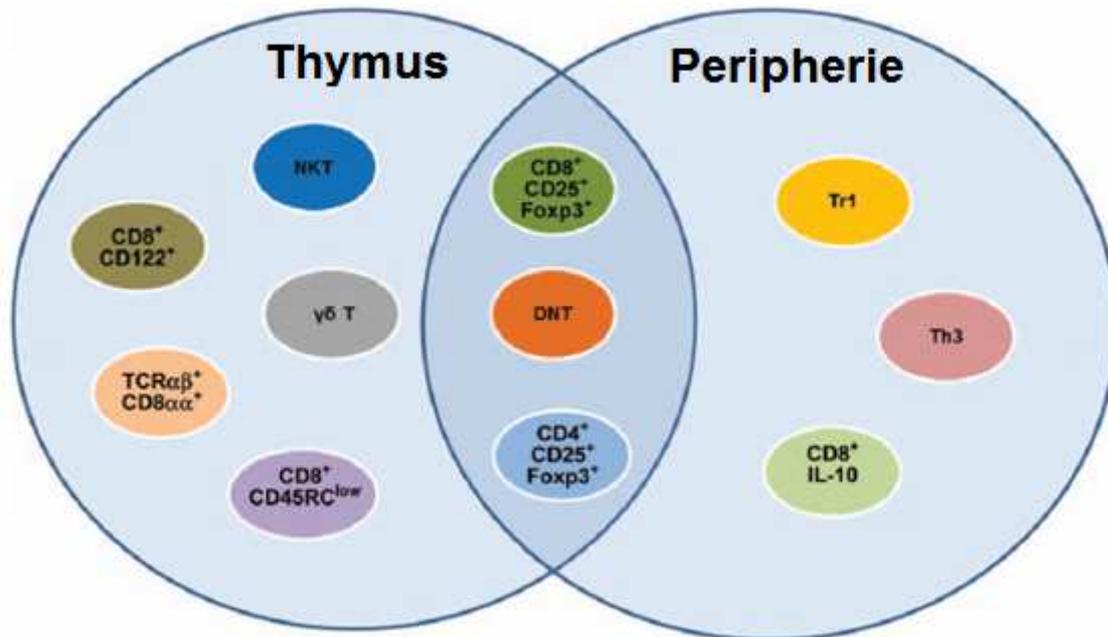


Abbildung 1. Die wichtigsten Subpopulationen von Tregs, die bisher in der Literatur beschrieben wurden. Der Thymus bildet naive Tregs (nTregs), die CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Tregs, Natürliche Killer T-Zellen (NKT-Zellen), γδ-T-Zellen, doppelt negative T-Zellen (DNT), CD8⁺CD45RC^{low} Tregs, CD8⁺CD122⁺ Tregs und die TCRαβ⁺CD8αα⁺ Tregs. Nach Antigenstimulation unter spezifischem immunologischem Milieu wurden verschiedene induzierte Tregs (iTregs) identifiziert: IL-10 bildende CD4⁺ (regulatorische T-Zellen vom Typ1; Treg1/Tr1) und CD8⁺ (CD8⁺IL-10) iTregs, TGF-β bildende Th3 Zellen, CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ iTregs sowie eine spezifische DNT-Zellgruppe. Die Abbildung ist modifiziert nach Shalev et al. (2012).

Th17-Zellen sezernieren große Mengen von IL-17, aber auch IL-6, TNF-α und TGF-β und haben eine wichtige Rolle bei Autoimmunerkrankungen und in der Förderung pro-inflammatorischer Prozesse (Peck und Mallins 2009). Sie haben also eine gegenüber den Tregs antagonistische Wirkung.

1.3.2 Molekulare Effekte von Zytokinen

Im Blut produzierte Zytokine können in das zentrale Nervensystem (ZNS) gelangen und dort ihre Effekte hervorrufen. Außerdem werden im ZNS selbst Zytokine von Mikrogliazellen und Astrozyten Zytokine produziert (Dantzer 2009).

In den periventrikulären Organen können Zytokine direkt in das ZNS eintreten, da dort die Blut-Hirn-Schranke physiologischerweise fehlt. In anderen Hirnregionen können Zytokine

1. Einführung

über parazelluläre und transmembranöse Diffusion oder über aktive Transportmechanismen in das Hirngewebe einwandern (Banks 2001). Bei entzündlichen Prozessen oder bei Hypoxie kann die Blut-Hirn-Schranke für Zytokine und Zellen des Immunsystems durchlässig werden, so dass auch dort eine Diffusion in das Gehirn möglich wird. Dies wird in erster Linie durch den Growth Factor Hypoxia Inducible Factor (HIF)-1 aus den Astrozyten ermöglicht (Argaw et al. 2012). Dieser Aspekt könnte eine wichtige Rolle bei Post-Stroke-Depressionen spielen, die häufig mit Hypoxie in Ischämiearealen einhergeht. Erhöhte HIF-1-Konzentrationen wurden interessanterweise auch nach Elektrokrampftherapie (EKT)-Anwendung gemessen, aber in diesem spezifischen Fall wird eine protektive Wirkung angenommen, da HIF-1 die Erythropoetin (EPO)-Gene aktiviert und mit einem antidepressivem Effekt durch EKT korreliert (Girgenti et al. 2009). Es ist derzeit noch unklar, ob und welche andere Botenstoffsysteme und Transporter involviert sind. Die Transmission der durch Zytokine vermittelten Information über afferente Nerven ist in erster Linie für den Vagusnerv belegt. IL-1-Rezeptoren sind in seiner peripheren Nervenscheide lokalisiert. Dieser Signalweg scheint bei der Entwicklung des Krankheitsgefühls wichtig zu sein, wie z. B. die experimentelle Vagotomie bei Nagetieren gezeigt hat. Wenn Lipopolysaccharide intraperitoneal injiziert werden, tritt das Krankheitsverhalten (sickness behavior) bei vagotomierten Tieren nicht auf, obwohl das Immunsystem funktionsfähig ist (Bluthé et al. 1994, 1996). In diesem Zusammenhang ist das sickness behavior ein Syndrom, das aus Müdigkeit, Appetitlosigkeit, eingeschränkter Konzentrationsfähigkeit und Hyperalgesie besteht, wie es während infektiösen Erkrankungen auftritt. Diese Symptomkonstellation ähnelt den Symptomen einer depressiven Erkrankung. Man nimmt an, dass das Krankheitsgefühl durch die pro-inflammatorischen Zytokine, dabei insbesondere durch IL-1 β getriggert wird (Dantzer 2009).

Für das Verständnis, wie Zytokine in die Pathophysiologie der Depression eingreifen könnten, sind ihre Effekte auf den Metabolismus der Monoamine Dopamin, Noradrenalin und Serotonin wichtig (Berthold-Losleben und Himmerich 2008; Capuron und Miller 2011; Himmerich et al. 2009). Sie können die Expression von Serotonin-Transportproteinen verändern (Ramamoorthy et al. 1995), für den Metabolismus von Monoaminen wichtige Enzyme wie die Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO) stimulieren (Müller und Schwarz 2007) sowie die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse (HPA-Achse) aktivieren (Antonioli et al. 2012). Zytokine können auch neurotoxisch wirken und zu einem Nervenzellverlust führen. Diese Hypothese leitet sich von Experimenten und Beobachtungen ab (Merill 1992) und spielt nicht nur eine besondere Rolle bei der Depression. Bei Narkolepsiepatienten vermutet man

1. Einführung

beispielsweise einen TNF- α -induzierten Orexin-Neuronenverlust (Berthold-Losleben und Himmerich 2008; Sheldrick und Himmerich 2010). Bei depressiven Patienten fanden sich gehäuft eine Abnahme in der Nervenzelldichte und von Volumen und Funktionalität des präfrontalen Cortex, des Cingulums, des limbischen Systems inklusive Hippocampus und Amygdala sowie der Basalganglien (Fuchs und Flügge 2005). Man hypothesiert, dass dies die Konsequenz der bei Depressiven erhöhten Einwirkung pro-inflammatorischer Zytokin-Signalwege sein könnte. IL-1 β und TNF- α verursachen beispielsweise eine Hochregulation der Serotonin-Wiederaufnahme-Transporter durch vermehrte Genexpression (Malynn et al. 2013; Ramamoorthy et al. 1995). IL-1 β und IFN- γ stimulieren dieIDO, ein Enzym, welches Tryptophan zu Kynurenin metabolisiert. Da Tryptophan eine Vorstufe von Serotonin und Melatonin ist, resultiert aus derIDO-Stimulation eine verminderte Synthese dieser beiden Transmitter und eine vermehrte Bildung der neurotoxischen Metabolite Kynurenin und Quinolinsäure (Müller und Schwarz 2007). Die Tryptophan-2,3-Dioxygenase (TDO), das hepatische Isoenzym derIDO, metabolisiert einen Großteil von Tryptophan und kann durch erhöhte Glucocorticoid-Konzentrationen stimuliert werden. Diesen Vorgang findet man u. a. bei akutem und chronischem Stress (Antonioli et al. 2012). Eine erhöhte Aktivität der HPA-Achse ist bislang der konsistenteste neurobiologische Befund bei der Depression. Die Zytokine IL-1 β , IL-6 und TNF- α stimulieren die HPA-Achse (Besedovsky et al. 1991) und könnten so bei Depressiven zur Überaktivierung der HPA-Achse beitragen. Auch akuter Stress vermag die HPA-Aktivität zu erhöhen. Chronischer Stress verursacht einen konstant erhöhten Sympathikotonus und insbesondere einen konstanten Vagotonus. Es konnte experimentell gezeigt werden, dass elektrische Vagusstimulation die zerebrale IL-1 β -Produktion aktivierte (Dantzer 2009). Auch eine zentral oder intravenös applizierte IL-1 β -Gabe führt zu einer erhöhten CRH-Sekretion und einer erhöhten HPA-Aktivität (Besedovsky et al. 1991; Ericsson et al. 1994).

In einer Studie mit Nagetieren wurde die antidepressive Wirksamkeit von Fluoxetin und einem CRH-Antagonisten in einem chronischem Stress-Modell verglichen und es fand sich eine ähnliche antidepressive Wirksamkeit bei beiden Substanzen (Surget et al. 2009). Interessanterweise fanden Bano et al. dass die Antidepressiva Moclobemid, Tianeptin, Sertralin, Citalopram, Fluoxetin und JohanneskrautIDO inhibieren (Bano et al. 1999, 2010), also den gegenteiligen Effekt zeigen, wie ihn die pro-inflammatorischen Zytokine IL-1 β und IFN- γ haben. Zusätzlich zu ihren Wirkungen hinsichtlich der Serotonin-Rückaufnahme könnten Antidepressiva also auch über einen anti-inflammatorischen Mechanismus antidepressiv wirken.

1. Einführung

Die IDO und ihre Isoenzyme können außerdem durch Prolaktin und Glukokortikoide (Kawaguchi et al. 2008) stimuliert werden. Die vermehrte postpartale Prolaktinausschüttung könnte über diesen Mechanismus für die erhöhte Depressionsanfälligkeit verantwortlich sein. Dopamin, der Prolaktin-inhibierende Faktor (PIF) im Hypothalamus, ist postpartal reduziert, was zu einem erhöhtem Prolaktinspiegel und indirekt zu einer Hyperaktivität der TDO führen kann.

Dieser Sachverhalt könnte darüber hinaus die gemeinsame Koinzidenz der Depression bei etwa 30% der Morbus Parkinson-Patienten erklären (Slaughter et al. 2001). Der Dopaminagonist Bromocriptin verstärkt die Depression bei Patienten mit Hyperprolaktinämie (Mattox et al. 1986; Waehrens und Gerlach 1981).

Zusammengefasst könnten pro-inflammatorische Zytokine wie TNF- α und IL-1 β in die Pathophysiologie der Depression impliziert sein. Die vermuteten Mechanismen beinhalten die Aktivierung der Monoamin-Wiederaufnahme sowie die Stimulation der IDO, der TDO und der HPA-Achse.

1.3.3 Immunologische Befunde bei Depressionen

Mehrere Studien fokussierten sich auf den Zusammenhang zwischen Zytokinen und der depressiven Störung. Bei Patienten wurden meistens die Zytokinkonzentrationen im Serum bestimmt, einige Forschungsgruppen untersuchten die Zytokinkonzentration im Liquor (Martinez et al. 2012), und nur wenige untersuchten post-mortem Hirngewebe (Pandey et al. 2011; Tonelli et al. 2008). Zusammengefasst fand sich die Konzentration der pro-inflammatorischen Zytokine meist erhöht, die der anti-inflammatorischen Zytokine erniedrigt oder normal. Ferner waren die Zytokinkonzentrationen während des Therapieverlaufs Änderungen unterworfen und korrelierten teilweise mit dem Ausmaß der Verbesserung der Stimmung. Dabei zeigten sich Unterschiede bezüglich der Zytokinkonzentrationen bei suizidalen und nicht-suizidalen Patienten sowie bei Patienten mit der Erstmanifestation bzw. bei rezidivierenden depressiven Episoden. IL-6 (Su et al. 2009; Eller et al. 2009), IL-1 β (Maes et al. 1995; Thomas et al. 2005) und TNF- α (Berthold-Losleben und Himmerich 2008; Pennix et al. 2003) waren erhöht bei depressiven Patienten. In einer Studie von Himmerich et al. (2008) mit 62 akut an Depression erkrankten Patienten und 568 Kontrollprobanden zeigten sich die Plasmakonzentrationen von TNF- α und seinen löslichen Rezeptoren sTNF-R p55 und sTNF-R p75 signifikant bei den Patienten erhöht. Nach experimenteller Stimulation der

1. Einführung

Lymphozyten aus Patientenblut produzierten die Lymphozyten signifikant mehr pro-inflammatorische Zytokine als die Lymphozyten von Kontrollprobanden (Heiser et al. 2008; Kim et al. 2007). Die Plasmakonzentrationen des Th1-Zytokins IL-2 und sein löslicher Rezeptor sIL2-R zeigten sich bei depressiven Patienten ebenfalls erhöht (Eller et al. 2009). Die Untersuchung von Hirngewebe bei Suizidopfern ergab erhöhte Konzentrationen von IL-1 β , IL-6 und TNF- α (Pandey et al. 2011), IL-4 war insbesondere erhöht bei Frauen und IL-13 bei Männern (Tonelli et al. 2008). Obwohl einige Untersucher im Liquor depressiver Patienten keine Veränderung der Zytokinkonzentrationen fanden (Carpenter et al. 2004), fanden andere erhöhte IL-6-Konzentrationen (Lindquist et al. 2009; Palhagen et al. 2010; Sasayama et al. 2013). Lindquist et al. (2009) untersuchten ferner Patienten mit stattgehabten Suizidversuchen und fanden ebenfalls erhöhte Liquorkonzentrationen von TNF- α . Dabei waren Liquor- und Plasma-Zytokin-Konzentrationen nicht assoziiert. Es wurden auch andere Substanzen im Liquor erforscht, u. a. Oxytocin (Jokinen et al. 2012), Kynurenin und seine Metabolite (Lindquist et al. 2009) sowie Chemokine (Janelidze et al. 2012). Dabei wurde festgestellt, dass die Konzentrationen im Liquor und Plasma voneinander unabhängig sind, was entweder auf die Funktion der Blut-Hirn-Schranke beruhen könnte oder an der Schwierigkeit, die sehr niedrigen Zytokinkonzentrationen im Liquor zu messen.

Li et al (2010) untersuchten die Expression der Tregs und deren Zytokinbildung sowie die Expression der 5-Hydroxy-Tryptophan (5-HT)_{1a}-Rezeptoren bei 27 Patienten mit erstmanifester, nicht vorbehandelter unipolarer Depression und verglichen diese mit 27 gesunden Kontrollprobanden. Während die Gesamtzahl der T-Lymphozyten in beiden Studiengruppen ähnlich hoch war, war die Th1/Th2-Ratio der Patienten im peripheren Blut erhöht und die CD4⁺ CD25⁺-Tregs-Zahl erniedrigt (s. **Abbildung 2**).

Dieser Untersuchungsbefund von Li et al. war für uns ein weiterer Grund, zu untersuchen, ob nach erfolgreicher, sechswöchiger antidepressiver Behandlung bei Patienten mit unipolarer Depression die Konzentration von Tregs ansteigt.

Sowohl die 5-HT_{1a}-Rezeptor-Expression als auch deren Konzentration im peripheren Blut zeigten sich in der Patientenkohorte von Li ebenfalls erniedrigt. Die Konzentrationen von IL-2 fanden sich bei den Patienten deutlich erhöht und die von IL-10 sowie TGF- β ₁ signifikant erniedrigt.

Somit konnte ein immunologisches Ungleichgewicht bei unipolarer Depression nicht nur auf Zytokinebene beobachtet werden, sondern auch, wie zuvor mehrfach postuliert (Myint et al. 2005; Li et al. 2010), in Form eines veränderten Th1/Th2-Verhältnisses zu Gunsten der Th1-Population und in einer Abnahme sowohl der absoluten CD4⁺CD25⁺- Treg-Zahl als auch

1. Einführung

deren prozentualen Anteils an peripheren Lymphozyten dokumentiert werden. Zusammengefaßt bedeutet dies, dass möglicherweise ein hinsichtlich des pro-inflammatorischen Schenkels überaktiviertes Immunsystem bei depressiven Patienten vorliegt.

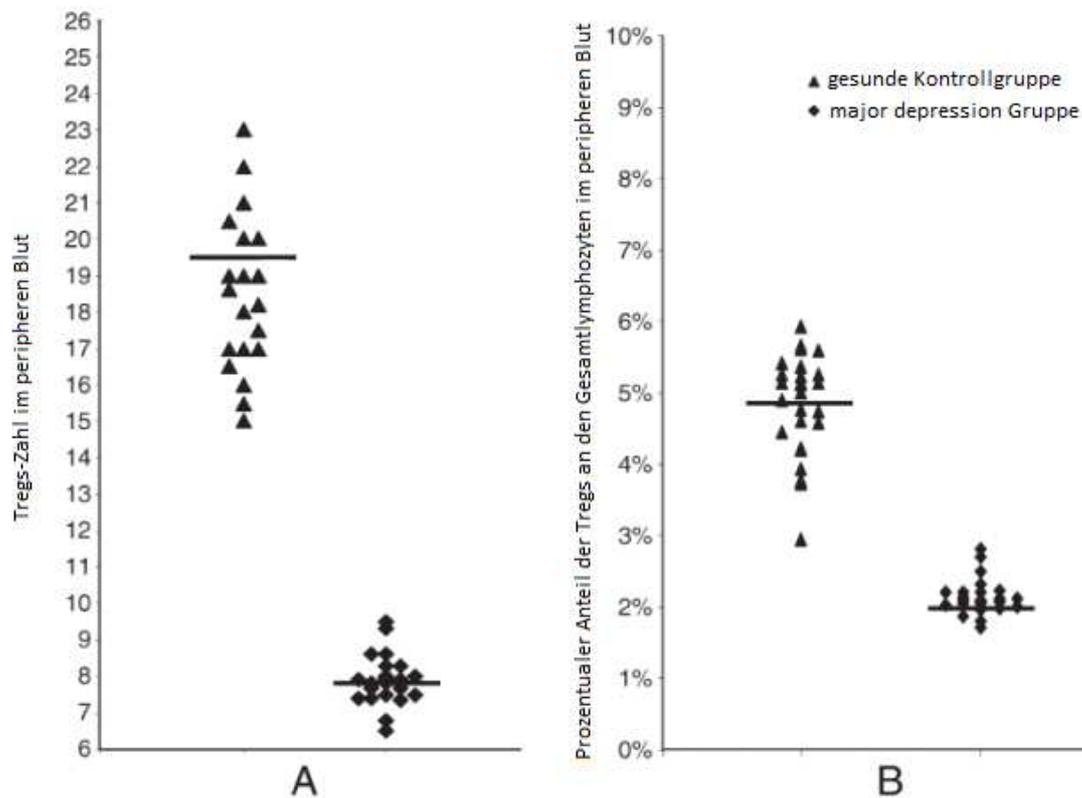


Abbildung 2. $CD4^+CD25^+$ -Tregs -Anzahl im Serum bei depressiven Patienten und gesunden Kontrollen. (A) Die Tregs-Zahl war bei Patienten mit unipolarer Depression deutlich kleiner im Vergleich zu den Kontrollpersonen. (B) Der prozentuale Anteil der $CD4^+CD25^+$ -Tregs von der Gesamtlymphozytenzahl im Serum zeigte sich bei den Patienten ebenfalls signifikant erniedrigt im Vergleich zu den Gesunden. Die Abbildung ist modifiziert nach Li et al. (2010).

1.3.4 Bedeutung der Zytokine für den Therapieverlauf

Es ist bisher zu wenig über die Bedeutung der Zytokine als Biomarker bei depressiven Störungen geforscht worden, um diese als Prädiktoren über Krankheitsverlauf und Therapieresponse evidenzbasiert nutzen zu können. Es mehren sich aber die Anzeichen dafür, dass sich Zytokinaktivitäten im Krankheitsverlauf ändern und mit der Krankheitsschwere korrelieren. Studien zu sIL-2R zeigten einen Konzentrationsabfall bei remittierenden Patienten, die unter einer depressiven Episode gelitten hatten, im Gegensatz zu Patienten mit

1. Einführung

rezidivierenden depressiven Episoden, wo sIL-2R und TNF- α erhöht waren (Eller et al. 2009). In anderen Studien war ein Abfall von TNF- α -Konzentrationen während der Behandlungsphase mit einer höheren Therapieansprechrates korreliert (Lanquillon et al. 2000), und eine Erhöhung von IL-6 war mit einer schlechten Therapieansprechrates assoziiert (Maes et al. 1997). Daher könnten pharmakologische Studien mit Antidepressiva zukünftig von der Messung der Zytokin Konzentrationsänderung bezüglich der Vorhersage des Therapieverlaufs profitieren (Lotrich 2012). Bei depressiven Patienten mit zusätzlicher posttraumatischer Belastungsstörung wurde gefunden, dass ihre nächtlichen IL-6-Konzentrationen signifikant erhöht sind (Gill et al. 2010). Der physiologische Abfall von IL-6 nachts erfolgte in deutlich reduziertem Ausmaß bei Patienten mit einer Depression oder bei Patienten mit hohem Stressniveau, wenn sie keine zusätzliche Diagnose einer posttraumatischen Belastungsstörung aufwiesen (Rief et al. 2010). Eine erhöhte IL-18-Konzentration eine Woche nach stattgehabtem ischämischen Hirninfarkt könnte auf eine post-stroke Depression hinweisen (Yang et al. 2010). Einige somatische Erkrankungen haben die Depression als häufige Begleiterkrankung, wie z. B. die Multiple Sklerose. Wenn sich bestimmte Zytokine als Biomarker für das Erkrankungsrisiko einer Depression etablieren würden, könnte der prophylaktische Einsatz von Antidepressiva bei entsprechender Konstellation im Zytokinsekretionsmuster indiziert sein.

1.3.5 Zusammenhang von Zytokinen mit einzelnen depressiven Symptomen

In vielen Studien zeigte sich nicht nur ein Zusammenhang einer depressiven Episode mit der Aktivierung v. a. pro-inflammatorischer Zytokine und ein Rückgang dieser Überaktivierung bei Besserung der depressiven Symptomatik. Auch einzelne depressive Symptome scheinen mit bestimmten Zytokinen assoziiert zu sein.

Beispielsweise zeigt sich eine positive Korrelation zwischen sIL-2R-Plasmakonzentrationen und Antriebsminderung. TNF- α korrelierte mit erhöhter Suizidalität und Antriebsminderung (Eller et al. 2009). Erhöhte IL-1 β -Konzentrationen waren in einer Untersuchung mit sozialem Rückzug und Appetitlosigkeit assoziiert, sehr hohe IL-1 β -Konzentrationen mit erhöhter Suizidalität. Die IL-1 β -Konzentrationen korrelierten außerdem mit dem Schweregrad der Depression, kognitiven Defizite und Mikrogliose (Dantzer 2009; Thomas et al. 2005). Erhardt et al. (2013) fanden erhöhte Liquor-Konzentrationen von Chinolinsäure, aber nicht mit Kynureninsäure bei Patienten mit Suizidalität. Dies zeigt, dass neben derIDO wahrscheinlich

1. Einführung

noch weitere Enzymsysteme durch die Veränderungen im Zytokinsystem in ihrer Aktivität modifiziert werden könnten.

1.3.6 Zytokine als mögliche Prädiktoren für den Therapieerfolg

Baune et al. beschrieben eine Assoziation zwischen bestimmten IL-1-Polymorphismen und Therapieresistenz bei Depression (Baune et al. 2010). Auch erhöhte IL-6 und TNF- α -Konzentrationen scheinen mit einer Therapieresistenz bezüglich selektiver Serotonin- (SSRI) und Noradrenalin-Wiederaufnahmehemmer (SNRI) assoziiert zu sein (Yoshimura et al. 2009). Die Aktivität des sIL-2R scheint sich bei Therapierespondern und –non-respondern in unterschiedlicher Weise zu ändern (Eller et al. 2008). Die Expression von Serotonin-Rezeptoren auf Lymphozyten könnte die Vorhersage der Therapieansprechrate bei Antidepressiva mitbestimmen (Rivera-Baltanas et al. 2012).

1.3.7 Immunologische Veränderungen unter antidepressiver Behandlung

Antidepressiva haben nicht nur einen Einfluss auf die Regulation der Neurotransmitter (Schildkraut 1965), sondern sie könnten auch über immunsuppressive und anti-inflammatorische Wege auf die depressive Störung einwirken. In-vitro konnte beispielsweise gezeigt werden, dass trizyklische Antidepressiva die IFN- γ -Bildung reduzieren (Himmerich et al. 2010b). Eine nicht-medikamentöse Behandlungsform stellt die Elektrokonvulsionstherapie (EKT) dar, bisher sind die genauen Wirkmechanismen aber noch nicht vollständig verstanden. Während der Konvulsion tritt für eine kurze Zeit eine zerebrale Hypoxie auf, die zu einer vermehrten Freisetzung von Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF) führt. Außerdem scheint die EKT einen modulierenden Einfluss auf die HPA-Achse sowie die Zytokinfreisetzung zu haben (Belanoff et al. 2002; Fluitman et al. 2011). Wie zuvor erwähnt, ist HIF-1 nach EKT-Anwendung ebenfalls erhöht (Girgenti et al. 2009), außerdem könnte es zu einer Funktionsminderung der Blut-Hirn-Schranke kommen, so dass Zytokine verstärkt in das ZNS eintreten könnten (Argaw et al. 2012). Ferner gibt es Beobachtungen über den Einfluss von Schlafentzug auf das Immunsystem mit unterschiedlichen Effekten bei vollständigem bzw. partialem Schlafentzug (Domingues et al. 2010; Vgontzas et al. 2004). Es kommt zu einem Akutanstieg pro-inflammatorischer Zytokine, welcher zeitlich aber wahrscheinlich nicht kausal mit einem akuten antidepressiven Effekt assoziiert ist. Dagegen führt ein chronischer Schlafentzug bei Schichtarbeitern zu einer depressiven Erkrankung, die

1. Einführung

ebenfalls auf eine erhöhte Bildung pro-inflammatorischer Zytokine zurückzuführen sein soll (Khosro et al. 2011; Nakata et al. 2004). Im Zusammenhang mit der Schlaf-Wach-Regulation ist es erwähnenswert, dass Müdigkeit ein depressives Symptom darstellt, welches wiederholt nachgewiesen mit einer erhöhten pro-inflammatorischer Zytokinbildung korreliert (Weschenfelder et al. 2012). Insgesamt ist also die Befundlage uneinheitlich, und sowohl Erhöhungen als auch Minderungen der Konzentration pro-inflammatorischer Zytokine wurden mit der globalen Besserung als auch mit der Besserung bestimmter depressiver Symptome sowie mit bestimmten antidepressiven Therapien in Verbindung gebracht.

1.3.8 Exkurs: Multiple Sklerose und Depression

Die Komorbidität der Depression und Multiplen Sklerose (MS) ist ein gut untersuchtes Beispiel für das gemeinsame Auftreten neuroimmunologischer Gehirnerkrankungen und depressiver Symptomatik, auch wenn die Pathogenese der Depression bei MS noch nicht vollständig geklärt ist. Deswegen soll hier exemplarisch erläutert werden, inwieweit die Depression über Zytokine vermittelt als Folgeerkrankung oder als Symptom einer MS auftreten könnte.

Es ist immer noch unklar, in welchem Ausmaß die Depression als reaktiv auf die Einschränkung und Behinderung durch die MS-Erkrankung selbst zurückzuführen ist (McIvor et al. 1984; Surridge 1969), oder direkt durch hirnorganische Läsionen entsteht (Foley et al. 1992; Joffe et al. 1987). Am ehesten scheint die Ätiopathogenese von Depressionen bei MS-Patienten multifaktoriell bedingt zu sein: Eine Überaktivierung der HPA-Achse, die neuroinflammatorische Reaktion, die nachfolgende Neurodegeneration spezifischer Hirnareale für die Affektregulation und der Verlust kognitiver Ressourcen führen möglicherweise zusammen zum Verlust von Bewältigungsstrategien bezüglich stressreicher Lebensereignisse und der Erkrankung selbst zur Depression. Hinzu kommen als weitere pathogenetische Faktoren der Depressionsentstehung bei MS-Patienten die genetische Suszeptibilität und immunmodulatorische Medikamente der MS-Therapie (Schumann et al. 2012). Kognitive Beeinträchtigung wie Aufmerksamkeits- und Konzentrationsdefizite und Ängstlichkeit treten in bis zu 70% der MS-Patienten auf (Chiaravalloti und Deluca 2008). Es kommt zu einem *circulus vitiosus*, bei dem die Ausarbeitung und Realisierung von psychotherapeutischen Coping-Strategien aufgrund kognitiver Einschränkung schwierig werden kann. Daher ist es erforderlich, die Ätiologie depressiver Störungen bei MS-Patienten, insbesondere das Einwirken neuroimmunologischer Prozesse, besser zu verstehen, um neue

1. Einführung

Therapieansätze zu entwickeln. Einen wichtigen Aspekt der gegenwärtigen Theorie zur Pathogenese der MS stellen die Th17-Zellen dar (Tzartos et al. 2008), die Gegenspieler der Tregs. IL-17 kann die Th1-Antwort stimulieren und bildet ein pro-inflammatorisches Milieu im Gehirn. Der Einfluss des Immunsystems auf die Entwicklung depressiver Störungen ist auch wegen dem Einsatz immunmodulatorischer Präparate in der MS-Therapie substantiell (Goldman Consensus Group 2005). Diese können einerseits zu einer Besserung, aber auch zu einer Exazerbation und Auslösung depressiver Symptomatik führen.

Wichtig zum Verständnis des Auftretens von Depressionen bei MS ist auch die Lokalisation entzündlicher Hirnläsionen. Aus fMRT-Studien ist bekannt, dass bei MS-Patienten mit affektiven Symptomen häufig bestimmte Hirnregionen betroffen sind, die auch im Allgemeinen mit dem Auftreten affektiver Symptome assoziiert sind (Lichtblau et al. 2012; Schumann et al. 2012).

In der klinischen Praxis scheint es überraschend, wie wenig diagnostische Beachtung Depressionen bei MS-Patienten trotz dieses Wissens erhalten. Bis zu 65% der MS-Patienten mit Depression erhalten keine antidepressive Medikation (Mohr et al. 2006), dabei beträgt die Lebenszeitprävalenz der Depression bei MS etwa 50% (Feinstein et al. 2004). Mehrere Studien mit depressiven MS-Patienten fanden positive Therapieresponse-Raten mit niedrigen Nebenwirkungsraten für diverse antidepressive Substanzgruppen, in erster Linie Trizyklika und Paroxetin (Koch et al. 2011), Sertralin (Scott et al. 1995) und Fluoxetin (Benedetti et al. 2004). Die Hochregulation von Tregs wirkt sich auf die MS-Behandlung selbst positiv aus, möglicherweise mit dem zusätzlichem Nutzen der Affektstabilisierung (Schumann et al. 2012), zumal bei verschiedenen Autoimmunerkrankungen ein Mangel oder Defekt der Tregs nachgewiesen wurde (Loser und Beisert 2007). Aufgrund anti-inflammatorischer Eigenschaften von Trizyklika könnte deren Einsatz bei Autoimmunerkrankungen wie MS eine besondere Bedeutung zukommen (Himmerich et al. 2010). Glatirameracetat (Copaxone®) wird bei der schubförmigen MS-Form eingesetzt und besitzt durch BDNF-Erhöhung und Stimulation der Neurogenese sowie anti-inflammatorische Eigenschaften möglicherweise ein antidepressives Potenzial (Tsai 2007). Beim pro-inflammatorischen Interferon- β wird dagegen als Nebenwirkung die Triggerung von affektiven Störungen berichtet (Feinstein 2000), insbesondere wenn in der Vorgeschichte bereits eine depressive Episode vor Einsatz des Medikaments bekannt sind (Feinstein et al. 2000). Kortisonstoßbehandlungen bei MS-Schüben sind ebenfalls mit dem Auftreten depressiver Symptome assoziiert (Patten et al. 1995). Interessanterweise fanden ergänzende Studien eine positive Auswirkung von Antidepressiva auf den Verlauf der MS-Erkrankung, beispielsweise

1. Einführung

ein neuroprotektiver Effekt für Fluoxetin (Mostert et al. 2008). Escitalopram könnte eine Option für die Prävention stressbedingter MS-Schübe bei Frauen sein (Mitsonis et al. 2010). Auch in experimentellen MS-Modellen der Maus verbesserten Sertralin (Taler et al. 2011), der MAO-Hemmer Phenelzin (Musgrave et al. 2011) und Venlafaxin (Vollmar et al. 2009) das funktionelle Outcome bzw. klinische Symptome. Abgesehen von medikamentösen Behandlungsformen der Depression bei MS erwies sich die Psychotherapie als ebenfalls effektiv (Goldman Consensus Group 2005; Mohr et al. 2001 und 2005).

1.3.9 Antidepressive Effekte von Immunmodulatoren

Studien zur Augmentation antidepressiver Medikation mit anti-inflammatorischen Substanzen zeigten bemerkenswerte Resultate. Die Kombination von Fluoxetin und dem Cyclooxygenase-2(COX-2)-Inhibitor Celecoxib führte zu signifikant größerer Verbesserung auf der Hamilton-Depressionsskala (HAMD) im Vergleich zur Monotherapie mit Fluoxetin (Akhondzadeh et al. 2009). Celecoxib als add-on-Therapie mit Sertralin verminderte die IL-6-Konzentration im Blut (Abbasi et al. 2012). Effektiv zeigte sich Celecoxib auch in Kombination mit Reboxetin (Müller et al. 2006). Bei SSRI-Nonrespondern führte die Kombination mit ASS zu einem schnelleren Therapieansprechen (Mendlewicz et al. 2006). Coxibe modifizieren Prostaglandinkonzentrationen durch Hemmung der Cyclooxygenase. Die direkte Blockade spezifischer Prostaglandinrezeptoren könnte eine Alternative zu Coxiben sein. EP1, ein Subtyp des Prostaglandin E2 (PGE2)-Rezeptors, ist in der Aktivierung der Mikroglia involviert und beeinflusst die Sezernierung von TNF- α und IL-6. EP1-Inhibitoren agieren selektiv und könnten besser verträglich sein als traditionelle COX-Inhibitoren (Li et al. 2012). Im Gegensatz dazu beobachtete man eine verminderte Therapieresponse in der Kombination von Citalopram und NSAID in Nagerstudien und in einer großen klinischen Population (STAR*D, Warner-Schmidt et al. 2011). Rezeptoren für das Zytokin EPO findet man nicht nur im Knochenmark, sondern u. a. auch im ZNS mit der höchsten Konzentration im Plexus Choroideus und Corpus striatum (Girgenti et al. 2009). Die Einnahme von EPO weist antidepressive Effekte im forcierten Schwimmtest bei Ratten auf, was a. e. über vermehrte BDNF-Expression vermittelt wird. Die kontinuierliche Blockade vonIDO durch 1-Methyl-L-Tryptophase (1-MT) minderte experimentell depressives Verhalten sowie Körpergewichtsabnahme bei Mäusen (Kiank et al. 2010).

Psoriasispatienten haben ein hohes Risiko, an einer Depression zu erkranken. Unter der Behandlung mit Etanercept, einem TNF- α -Antagonisten, zeigte sich jedoch in einer

1. Einführung

Untersuchung von Tying et al. eine 50%-ige Reduktion der HAMD- sowie BDI-Scores innerhalb von 12 Wochen (Tying et al. 2006). Dieser Befund war unabhängig von den Verbesserungen der Psoriasis-Symptomatik. Die Medikation zur Behandlung der Grunderkrankung scheint also die Zytokineffekte zu antagonisieren und so die depressive Symptomatik zu verbessern.

Die Schlüsselfrage mit Hinsicht auf die Patienten, die nicht vor dem Hintergrund einer entzündlichen Erkrankung eine Depression entwickeln, aber lautet, ob auch diese somatisch gesunden depressiven Patienten von einer Zytokinantagonisierung profitieren würden. In dieser Hinsicht untersuchten Krügel et al. die Effekte von Etanercept in einem Tiermodell von chronisch mildem Stress bei männlichen Wistar Ratten. Dabei reduzierte Etanercept signifikant die depressionsähnlichen Effekte, was sich in einer verminderten Immobilisationszeit und einer Intensivierung der Kletteraktivität im forcierten Schwimmtest (FST) zeigte, die ähnlich dem antidepressiven Effekt von Imipramin waren (Krügel et al. 2013).

1.3.10 Experimente und Messmethoden

In der vorliegenden Arbeit wurden Zytokinkonzentrationen gemessen, Vollbluttests durchgeführt und die Konzentration der Tregs bestimmt. Auf wesentliche Aspekte dieser Methoden soll im Folgenden eingegangen werden.

1.3.10.1. Messung von Zytokinkonzentrationen

In der Zytokindiagnostik unterscheidet man u. a.:

- Zytokinbestimmung im Plasma oder Serum (z. B. die Bestimmung der Konzentrationen von TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10, IFN- γ , Interferon-gamma-induziertes Protein-10 (IP-10), TGF- β , IL-31).
- Zytokinkonzentrationsbestimmung nach in-vitro Stimulation von Immunzellen, oder von Vollblut, das neben den zellulären Blutbestandteilen auch nicht-zelluläre Elemente des Blutes enthält. In in-vitro Stimulationsmethoden werden die Zellen oder das Vollblut immunologisch zur Zytokinproduktion angeregt. Anschließend misst man die Zytokinproduktion im Überstand.

1. Einführung

Zu den in der vorliegenden Arbeit angewendeten Methoden sollen an dieser Stelle einige Spezifika Erwähnung finden.

1.3.10.1a Vollbluttest

Vollbluttests sind geeignet, um die stimulierte Zytokinproduktion in-vitro zu messen. Dabei wird Blut entnommen, kultiviert und immunologisch stimuliert. Dadurch, dass die Blutzellen nicht isoliert, sondern zusammen mit den nicht-zellulären Blutbestandteilen kultiviert werden, behalten sie ihre physiologische Umgebung mit Bindungsproteinen und Inhibitoren auch in-vitro bei. So können die synergistischen sowie antagonistischen in-vivo-Zellinteraktionen realitätsnah reproduziert werden. (Kirchner et al. 1982). Zur Stimulation kann beispielsweise Lipopolysaccharid (LPS) verwendet werden, welches die Produktion pro-inflammatorischer Zytokine wie IL-1, IL-6, und TNF- α anregt. Die sezernierten Zytokine können im Zellüberstand mittels Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) gemessen werden. Dadurch dass die Zytokinproduktion im Vollbluttest immunologisch stimuliert wird, sollten die Konzentrationen der Zytokine in einem gut messbaren Bereich liegen.

1.3.10.1b Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Zur Konzentrationsmessung von Biomolekülen (z. B. Hormonen, Zytokinen, Tumormarker, Viren, Pharmaka) werden in der medizinischen Diagnostik und Forschung bevorzugt Immunoassays verwendet. Der Einsatzbereich reicht bis in die Umwelt- und Lebensmittelanalytik hinein. Das Prinzip basiert dabei auf einer Antigen-Antikörper-Reaktion im Sinne einer Gleichgewichtsreaktion, die dem Massenwirkungsgesetz unterliegt. Die Geschwindigkeit, mit der sich das Reaktionsgleichgewicht einstellt, ist entscheidend von der Temperatur abhängig. Immunkomplexe bilden sich beispielsweise unter Raumtemperatur schneller als im Kühlschrank.

Es werden grundsätzlich zwei Assaykonzepte unterschieden. Der kompetitive Assay beruht auf der Konkurrenz zwischen markiertem und unmarkiertem Antigen um die Antigenbindungsstellen. Beim Sandwich-Assay werden zwei antigenspezifische Antikörper verwendet, von denen einer markiert ist und insgesamt eine sehr sensitive Methode darstellt.

Der ELISA fand seine Anfänge in den frühen 70er Jahre, in denen parallel zwei Arbeitsgruppen in Frankreich (Avrameas und Guilbert 1971) und Schweden (Engvall und Perlman 1971) diese Methode beschrieben haben. Dabei stellt ein Enzym die Markerfunktion

1. Einführung

dar und die Antigenkonzentration wird anhand des Substratumsatzes bestimmt. Entweder wird der Antikörper oder das Antigen an einer festen Phase adsorbiert und die Trennung des freien vom gebundenen Antigen kann durch alleinige Waschung zeit- und kostensparend vollzogen werden.

Der erste Schritt eines ELISA besteht im sogenannten coaten. Dabei wird der Antikörper oder das Antigen an die feste Phase, meist eine Mikrotiterplatte aus Polystyrol, in der Regel durch Adsorption gebunden. Um durch Waschung den Verlust von Antigen-Antikörper-Komplexen gering wie möglich zu halten, können Antikörper bzw. Antigen kovalent an die Mikrotiterplatte gekoppelt werden. Ein weiteres Problem beim ELISA sind die unspezifisch adsorbierten enzymmarkierten Antikörper- bzw. Antigenmoleküle. Diese Hintergrundaktivität kann durch das Abblocken freier Proteinbindestellen reduziert werden. Zwischen den einzelnen Inkubationsschritten erfolgen Waschprozeduren.

Eine hohe Enzymaktivität sowie die Verfügbarkeit der leicht zu detektierenden Substrate sind eine Grundvoraussetzung für einen ELISA-Marker. Unter den typischen Assaytemperaturen sollte die Struktur und Funktion des Enzyms über einen längeren Zeitraum gewährleistet werden, ferner sollte es sich leicht an Antikörper bzw. Antigen koppeln lassen. Die Enzymaktivität kann anschließend durch kolorimetrisch, fluorimetrisch oder luminometrisch nachweisbare Substrate bestimmt werden.

1.3.10.2 Identifizierung, Differenzierung und Quantifizierung von T-Zellen mittels Durchflusszytometrie

Die fluoreszenzbasierte Durchflusszytometrie wurde erstmalig 1968 von Wolfgang Göhde entwickelt und als Patent angemeldet (Patent DE1815352: Flow-through chamber for photometers to measure and count particles in a dispersion medium. Angemeldet am 18. Dezember 1968, Erfinder: Wolfgang Dittrich, Wolfgang Göhde). Während der Terminus Durchflusszytometrie (engl. "flow cytometry") auf der "5th American Engineering Foundation Conference on Automated Cytology" in Pensacola (Florida) im Jahr 1976 als Standardbegriff für die Technologie definiert wurde, stellt der Begriff „FACS“ ein eingetragenes Warenzeichen von Becton Dickinson dar. Er wird allerdings im Laborjargon häufig als Bezeichnung für alle Zellsortierungen anhand von Fluoreszenz verwendet.

Das Prinzip der Durchflusszytometrie ermöglicht eine flexible quantitative Messung sowie molekulare Charakterisierung intakter Zellen. Der hydrodynamische Transport von Zellen

1. Einführung

und deren optische Messung nach spezifischen Färbungen stellen hierbei die Grundlagen der Analyse der Zellen dar.

Initial erfolgt eine Markierung der Zellen mit Antikörpern, die gegen spezifische Zellstrukturen gerichtet sind und die mit einem Fluoreszenzfarbstoff (direkte Markierung) oder mit einem fluoreszenzgekoppelten Sekundärantikörper (indirekte Markierung) gekoppelt werden.

Die markierte Suspension von Zellen (Durchmesser 0,2 und 20 μm) wird durch einen Hüllstrom verdünnt und anschließend fokussiert in einer Sequenz von Einzelzellen im rechten Winkel an einer Lichtquelle mit einer Geschwindigkeit bis 300ml/min vorbeigeführt. Für die Analyse seltener Zellen oder bei hohem Probendurchsatz können einige Geräte Zählraten bis zu 50 000 Zellen/s erreichen.

Der eigentliche Messpunkt befindet sich am gemeinsamen Fokus des Probenstroms und der monochromatischen Lichtquelle (Laser). Die dabei entstehende Streuung des Anregungslichts und die Anregung von fluoreszenten Markern stellen die simultane Analyse von physikalischen und molekularen Eigenschaften der Zellen dar. Als physikalische Messgrößen werden die Lichtstreuung der Zellen in einem engen Winkel zum Laserlicht als Vorwärtsstreulicht (forward scatter; FSC) und die Lichtstreuung im Winkel von 90° als Seitwärtsstreulicht (side scatter; SSC) detektiert (siehe **Abbildung 3**). Das je nach Gerät ab etwa 0,5–1 μm Größe der Zellen auflösbare FSC stellt nur ein ungefähres Maß für die Zellgröße dar, da es genau genommen eher von der Zellform abhängt und nicht stetig mit der Größe zunimmt. SSC dagegen wird von der komplexen Mehrfachstreuung durch intrazelluläre Kompartimente und somit von der Binnenstruktur der Zellen bestimmt. Damit können Zellgröße und Granularität gleichzeitig mit Fluoreszenzsignalen detektiert werden, deren Helligkeit von der Färbung, z.B. der Menge gebundener Antikörper, dem nukleären DNA-Gehalt oder den biochemischen Eigenschaften der Zelle abhängt. Eine exaktere Zellgrößenbestimmung stellt die von Coulter eingeführte Methode dar, in der die Änderung des elektrischen Widerstands bei Durchtritt der Zellen durch einen Messkanal analysiert werden. Die gleichermaßen in alle Richtungen emittierten Fluoreszenzsignale werden ebenfalls im Winkel von 90° detektiert. Sogenannte Farbteilerspiegel und Bandpassfilter ermöglichen die optische Trennung der Emissionsspektren der verschiedenen eingesetzten Farbstoffe. Deren Lichtsignale werden dann über Photomultiplier (PMT) detektiert, die das Licht in elektrische Signale umwandeln. Die Detektoren werden mit zunehmendem spektralen Abstand vom Anregungslicht aufsteigend nummeriert (FL1, FL2, FL3. . .). Bei Anregung mit dem blau-grünen Licht eines 488-nm-Argon-Laserserkennt beispielsweise der FL1-Detektor

1. Einführung

grünes Licht, der FL2-Detektor oranges Licht und der FL3-Detektor rotes Licht. Die entsprechenden Lichtsignale werden quantifiziert und in einer multiparametrischen Messung für jede Zelle einzeln in einen Datenspeicher geschrieben. Von der Messung unabhängig werden die gespeicherten Messdaten in einem zweiten Schritt ausgewertet. Somit ist eine korrelierte Untersuchung der Messparameter für verschiedene Populationen oder Gruppen von Zellen unter verschiedenen Fragestellungen mit statistischer Auswertung unter flexiblen Bedingungen möglich. Die Eichung oder Kalibration von Fluoreszenzsignalen und damit eine quantitative Analyse der molekularen Eigenschaften der Zellen basiert auf dem beschriebenen stabilen Messaufbau.

Es können absolute Zellzahlen bestimmt werden sowie diverse funktionelle Untersuchungen und Lymphozytentypisierungen bis hin zu DNA- und Zellzyklusanalysen durchgeführt werden.

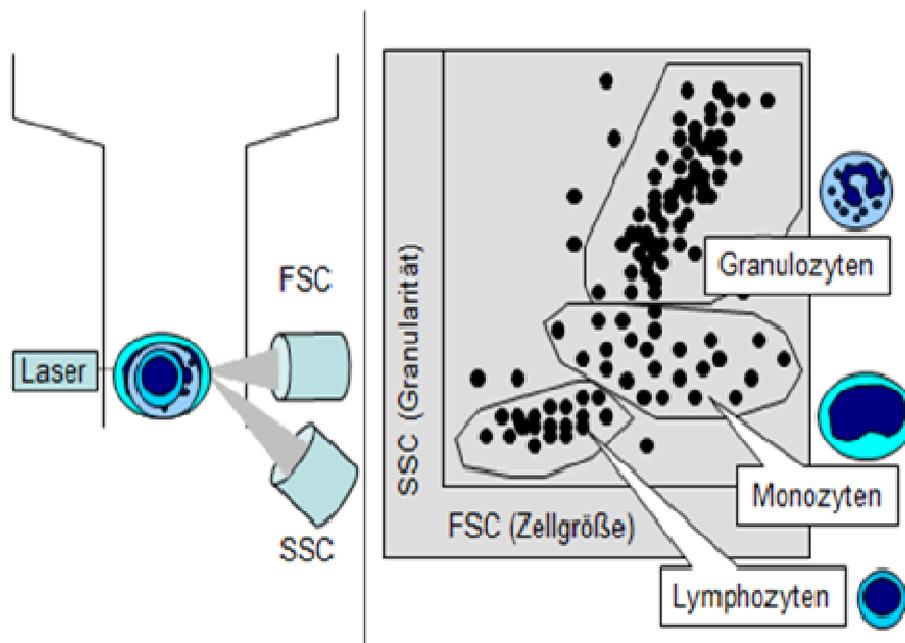


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Durchflusszytometrie.

2. Aufgabenstellung

2. Aufgabenstellung

In der für diese Arbeit durchgeführten Studie wurde untersucht, ob sich die Plasmakonzentration von IL-1 β und die stimulierte Zytokinproduktion von IL-1 β , IL-6 und IFN- α sowie die Anzahl der CD4⁺CD25⁺-Zellen bzw. CD4⁺CD25^{hi}-Tregs bei depressiven Patienten innerhalb von 6 Wochen antidepressiver Therapie änderte. Hierfür wurden im Plasma die IL-1 β -Konzentrationen, in stimulierten Blutproben von 16 Patienten die Zytokinkonzentrationen von IL-1 β , IL-6 und IFN- α mittels ELISA gemessen und eine Zellquantifizierung mit Hilfe der Durchflusszytometrie zur Bestimmung von Tregs durchgeführt.

3. Materialien und Methoden

3. Materialien und Methoden

3.1 Versuchspersonen

Insgesamt wurden 16 Patienten (5 männlich, 11 weiblich) mit einer depressiven Episode in die Studie eingeschlossen. Die Patienten wurden der Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie der Universitätsklinik Aachen von ambulanten Behandlern eingewiesen. Das mittlere Alter betrug $42 \pm 8,2$ Jahre (Mittelwert \pm SD). Initial wurden 19 Patienten eingeschlossen, zwei Patienten lehnten die standardisierte psychopathologische Erhebung ab und ein weiterer Patient wurde aus der Studie ausgeschlossen, weil die depressive Episode in der standardisierten Diagnostik nicht verifiziert werden konnte. Nach ausführlicher Beschreibung des Forschungsprojekts unterzeichneten alle Patienten die Einverständniserklärung über ihre Teilnahme an der Studie, die von der unabhängigen Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der RWTH Universität Aachen bewilligt worden war (EK002/08).

Alle in die Studie eingeschlossenen Patienten litten zum Zeitpunkt der stationären, teilstationären oder ambulanten Aufnahme in der Klinik an einer depressiven Episode. Die individuelle Diagnose nach ICD-10-Kriterien variierte innerhalb des Spektrums affektiver Erkrankungen (F32 oder F33). Substanzmittelabhängigkeit sowie somatische Erkrankungen, wie z. B. endokrine Störungen und Demenzerkrankungen, die möglicherweise depressive Symptome hervorrufen können, wurden zuvor ausgeschlossen. Körperliche Untersuchung, Anamneseerhebung und Routinelaborkontrollen wiesen keine Anzeichen einer akuten oder chronischen Entzündung bzw. Infektion auf. Autoimmune, kardiologische, pulmologische, endokrinologische und hämatologische Erkrankungen wurden ebenfalls ausgeschlossen. Die Studie verfolgte ein naturalistisches Design, insbesondere erhielten die Patienten unterschiedliche antidepressive Präparate, die durch die ärztlichen Behandler bestimmt wurden. Dabei wurde die individuelle Dosierung nach Wirkspiegelkontrollen und klinischer Beurteilung angepasst.

3.2 Studiendurchführung

Blutabnahmen erfolgten bei den in die Studie eingeschlossenen Patienten in der ersten Woche sowie nach 6 Wochen Behandlung. Der psychopathologische Befund wurde mit der Hamilton-Depressionsskala-21 (HAMD-21) (Hamilton, 1960) und mit dem Beck-

3. Materialien und Methoden

Depressionsinventar (BDI) (Beck et al. 1961) am Tag der Blutentnahme dokumentiert. Der HAMD-21-Score zum Baselinezeitpunkt war $16,87 \pm 6,16$. Im Blut wurden Plasmakonzentrationen von IL-1 β bestimmt. Außerdem wurde ein Vollbluttest wie zuvor beschrieben durchgeführt (Kirchner et al. 1982; Seidel et al. 1996). Ein bis zwei Stunden nach der Blutabnahme wurde das Blut kultiviert. Die Teströhrchen (5ml, Greiner, Nürtingen, Deutschland) wurden mit 900 μ l Roswell Park Memorial Institute (RPMI), 1640 L-Glutamin (2mM) und Penicillin/Streptomycin- (100 U/100 μ g/ml) (Cambrex, Verviers, Belgien) Ergänzungslösung abgefüllt. Anschließend wurden 100 μ l Blut in jeden Ansatz injiziert. Für die Induktion der IL-1 β - und IL-6-Produktion wurde Endotoxin (LPS, Sigma-Aldrich, München, Deutschland, 250 ng/ml), für die Stimulation der IFN- α -Bildung wurde das Newcastle Disease Virus (NDV) verwendet, das freundlicherweise von Prof. R. Zawatzky aus dem Tumorforschungszentrum Heidelberg zur Verfügung gestellt worden war (80 HAU/ml). Alle Röhrchen wurden versiegelt und unter 5% CO₂-Atmosphäre mit 37°C für 24 Stunden inkubiert. Die zellfreien Überstände wurden nach der Inkubation bei -70°C gelagert.

3.3 Zytokinbestimmung und Zellquantifizierung

Für die Quantifizierung von IL-1 β , IL-6 und IFN- α wurden zur Analyse Antikörperpaare (BD Bioscience) verwendet. Die Resultate wurden mit einem Magellan-ELISA-Plattenleser (Tecan, Crailsheim, Deutschland) gemessen. Die minimalen messbaren Konzentrationen von IL-1 β , IL-6 und IFN- α lagen bei 3,9 pg/ml, 4,6 pg/ml respektive 7,9 pg/ml. Wir verwendeten die Multiparameter Flow Cytometry (FACS Calibur, BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland), um die Lymphozyten zu unterscheiden und die CD4⁺CD25⁺-Zellen sowie die CD4⁺CD25^{hi}-Tregs zu identifizieren. Die Expression wurde mit monoklonalen Antikörpern anti-CD4-FITC und anti-CD25-PE (BD Bioscience) nachgewiesen. Die Zellfraktionen konnten über zweidimensionale Plots im Forward- und Side-Scatter unterschieden werden. Tregs wurden über ein Gating auf CD4⁺CD25⁺ und auf CD4⁺CD25^{hi} identifiziert (s. **Abbildung 4** für weitere Details).

3. Materialien und Methoden

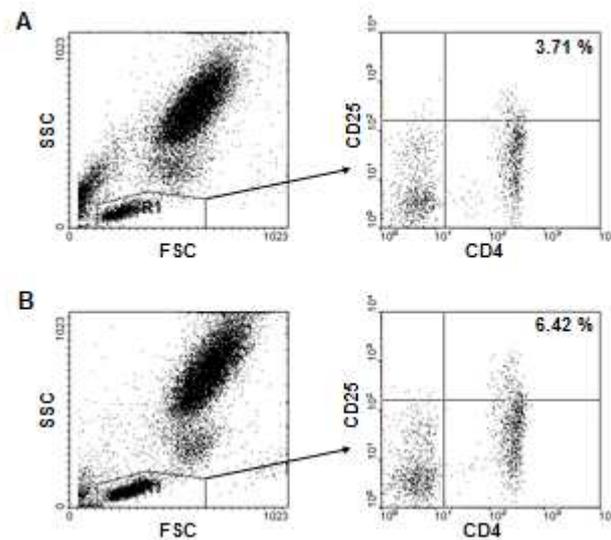


Abbildung 4. Beispiel für das Ergebnis einer Durchflusszytometrie zur Identifizierung von $CD4^+CD25^{hi}$ -Tregs bei einem Patienten vor (A) und nach abgeschlossener antidepressiver Behandlung (B). Unterschiedliche Zellfraktionen konnten in einem zwei-dimensionalen Plot (siehe linke Bildhälfte) vom forward scatter (FSC: proportional zur Zellgröße) und side scatter (SSC: proportional zur Zellgranularität) differenziert werden: Lymphozyten (eingerahmt), Monozyten (rechts über den Lymphozyten) und Granulozyten (große Punktvolke im rechten oberen Quadranten). Durch Gating auf $CD4^+CD25^{hi}$ wurden Tregs identifiziert (siehe rechte Bildhälfte). Zu Therapiebeginn betrug der Anteil der $CD4^+CD25^{hi}$ Tregs 3,71% der Lymphozyten und nach Therapieabschluß 6,42%.

3.4 Statistische Analyse

Der Lilliefors-Test auf Normalverteilung (Dallal und Wilkinson 1986) zeigte keine signifikante Abweichung von der Normalität-Annahme für $CD4^+CD25^+$ und $CD4^+CD25^{hi}$ zu Beginn der Therapie sowie am Ende der Behandlung (all $p > 0,35$). Um Unterschiede in

3. Materialien und Methoden

CD4⁺CD25⁺- und CD4⁺CD25^{hi}-Zellen zu testen, erfolgte eine Testung für multivariate Messwiederholung mittels ANOVA. Um mögliche Einflussfaktoren der beobachteten Änderungen zu untersuchen, wurden Korrelationen und T-Tests für Geschlecht, Alter, Krankheitsschwere, Grad der Verbesserung sowie die spezifische Medikation berechnet. Ein nicht korrigierter p-Wert < 0,05 wurde als statistisch signifikant angenommen. Die Unterschiede zwischen Beginn und Ende der Behandlung in stimulierten IL-1, IL-6 und IFN- α -Konzentrationen sowie Lymphozytenfraktion wurden mit dem nicht-parametrischen Wilcoxon-Test untersucht, da diese Parameter nicht alle normalverteilt waren. Alle Analysen wurden mit Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) 16.0 und R (R Development Core Team 2008) durchgeführt.

4. Ergebnisse

Vom Baselinezeitpunkt zum Ende der Behandlung zeigte sich eine Verbesserung des mittleren HAMD-21-Scores von $16,87 \pm 6,16$ (Standardabweichung; SD) auf $7,69 \pm 6,04$ (SD). Bei 15 von 16 Patienten waren die HAMD-21-Scores nach der Behandlung niedriger, bei einem Patienten stieg der HAMD-21-Score im Beobachtungszeitraum von sechs Wochen von 15 auf 16. Durchschnittlich waren die Scores um $9,2 \pm 6,2$ (SD) Punkte reduziert bzw. um $55\% \pm 8$ (SD). Zu Beginn der Therapie waren die IL-1 β -Konzentrationen im Serum bei 10 von 16 Patienten unter dem nachweisbaren Bereich, während alle 16 Patienten am Ende der Behandlung keine nachweisbaren IL-1 β -Konzentrationen mehr aufwiesen. Dieser Befund war statistisch signifikant (Fisher's exakter Test: $p = 0,018$). Bei den 6 Patienten mit messbaren IL-1 β -Konzentrationen zur Baseline variierten die Konzentrationen zwischen 7.12 pg/ml und 60,87 pg/ml (Mittelwert: 31,29). Dabei unterschieden sich diese Patienten nicht von den übrigen 11 bezüglich der Krankheitsschwere, der Baseline-Konzentrationen von CD4⁺CD25⁺ und CD4⁺CD25^{hi} bzw. im Ausmaß von deren Veränderungen. Stimulierte IL-1 β -Konzentrationen waren am Ende der Behandlung signifikant kleiner (Median [interquartile range IQR]: 896,00 pg/ml [414,25 – 1824,25] vs. 684,00 pg/ml [321,25 – 1733,75]). Stimulierte IL-1 β -Konzentrationen korrelierten nicht mit dem Alter, der Lymphozytenfraktion oder dem HAMD score (Spearman's Rho, $p > 0,10$). Es lag eine positive Assoziation zwischen stimulierten IL-1 β -Konzentrationen und den BDI-Scores zum Baseline-Zeitpunkt vor ($\rho = 0,59$, $p = 0,015$). Stimulierte IL-6-level waren ebenfalls am Ende der Behandlung signifikant niedriger (Median [IQR]: 6411,50 pg/ml [4177,00 – 7651,00] vs. 224,50 pg/ml [8,00 – 494,25]). Eine Zusammenfassung aller Veränderungen der Zytokinproduktion ist in **Tabelle 1** zusammengefasst.

4. Ergebnisse

Tabelle 1. Änderungen der Depressionsschwere, der Zytokinkonzentrationen und Fraktionen der CD4⁺CD25 und CD4⁺CD25^{hi} Zellen (n = 16).

	Therapiebeginn	Therapieende	
	Mittelwert ± SD (Range)	Mittelwert ± SD (Range)	t-Test, p
HAMD-21	16,87 ± 6,16 (8-28)	7,69 ± 6,04 (0-17)	t(15) = 6,1, p < 0,001
IL-1β Serumkonzentration unter der Meßgrenze	n = 10 (62,5%)	n = 16 (100%)	Fisher's exakter Test: p = 0,018
IL-1β Konzentration im Vollbluttest	1141,62 pg/ml ± 850,53	947,94 pg/ml ± 685,72	Z = -1,965, p = 0,049
IL-6 Konzentration im Vollbluttest	6439,88 pg/ml ± 3259,18	5490,88 pg/ml ± 2425,69	Z = -2,068, p = 0,039
IFN-α Konzentration im Vollbluttest	668,44 pg/ml ± 659,31	357,38 pg/ml ± 435,42	Z = -1,590, p = 0,112
Lymphozytenfraktion	22,41 % ± 8,58	23,74 % ± 7,84	Z = -0,517, p = 0,605
Veränderungen in CD4 ⁺ CD25 ⁺ - und CD4 ⁺ CD25 ^{hi} -Zellen			F(2,14) = 7,5, p = 0,006
CD4 ⁺ CD25 ⁺	29,61 % ± 7,14	31,95 % ± 7,61	F(1,15) = 14,5, p = 0,002
CD4 ⁺ CD25 ^{hi}	2,74 % ± 0,88	3,54 % ± 1,21	F(1,15) = 9,8, p = 0,007

4. Ergebnisse

Der multivariate F-Test zeigte eine signifikante Gesamtveränderung der CD4⁺CD25⁺ und CD4⁺CD25^{hi}-Zellen zwischen Anfang und Ende der Behandlung ($p = < 0,05$). Die anschließenden univariaten Vergleiche zeigten, dass die Proportionen von CD4⁺CD25⁺ sowie CD4⁺CD25^{hi}-Zellen zum Ende der Behandlung angestiegen sind (s. Tabelle 1). Der durchschnittliche Anstieg betrug $2,33\% \pm 2,45$ (SD) für CD4⁺CD25⁺ und $0,81\% \pm 1,03$ (SD) für CD4⁺CD25^{hi}. Prozentual betrug der Anstieg bezogen auf die Baseline-Werte 8% für CD4 und 36% für CD4⁺CD25^{hi}. Es gab keine Veränderung der Lymphozytenfraktion (Median [IQR]: 21,03% [16,23-27,90] vs. 24,28% [16,75-28,79]). Weder das Alter noch die Absolutwertänderung bzw. die relative Veränderung im HAMD-21-Score korrelierte signifikant mit den Baselinewerten oder den Änderungen innerhalb der CD4⁺CD25⁺- bzw. CD4⁺CD25^{hi}-Tregs. Dabei korrelierte die Depressionsschwere zu Beginn der Therapie signifikant mit den absoluten Anstiegen der CD4⁺CD25^{hi}-Tregs-Konzentrationen ($r = 0,635$, $p = 0,008$). Entsprechend fanden wir zwar bei Patienten mit moderater bis schwerer Depression (HAMD-1-Scores > 21 , $n = 5$) im Vergleich zu Patienten mit milder Depression (HAMD-1-Scores < 22 , $n = 11$) bezüglich der Baselinekonzentrationen von CD4⁺CD25⁺ und CD4⁺CD25^{hi}-Tregs keine signifikante Unterschiede. Aber der Anstieg der CD4⁺CD25^{hi}-Konzentrationen zum Ende der Behandlung war bei Patienten mit schwerer Depression signifikant höher ($0,41\% \pm 0,85$ vs. $1,67\% \pm 0,89\%$; $t(14) = 2,7$, $p = 0,02$) (s. **Abbildung 5**).

4. Ergebnisse

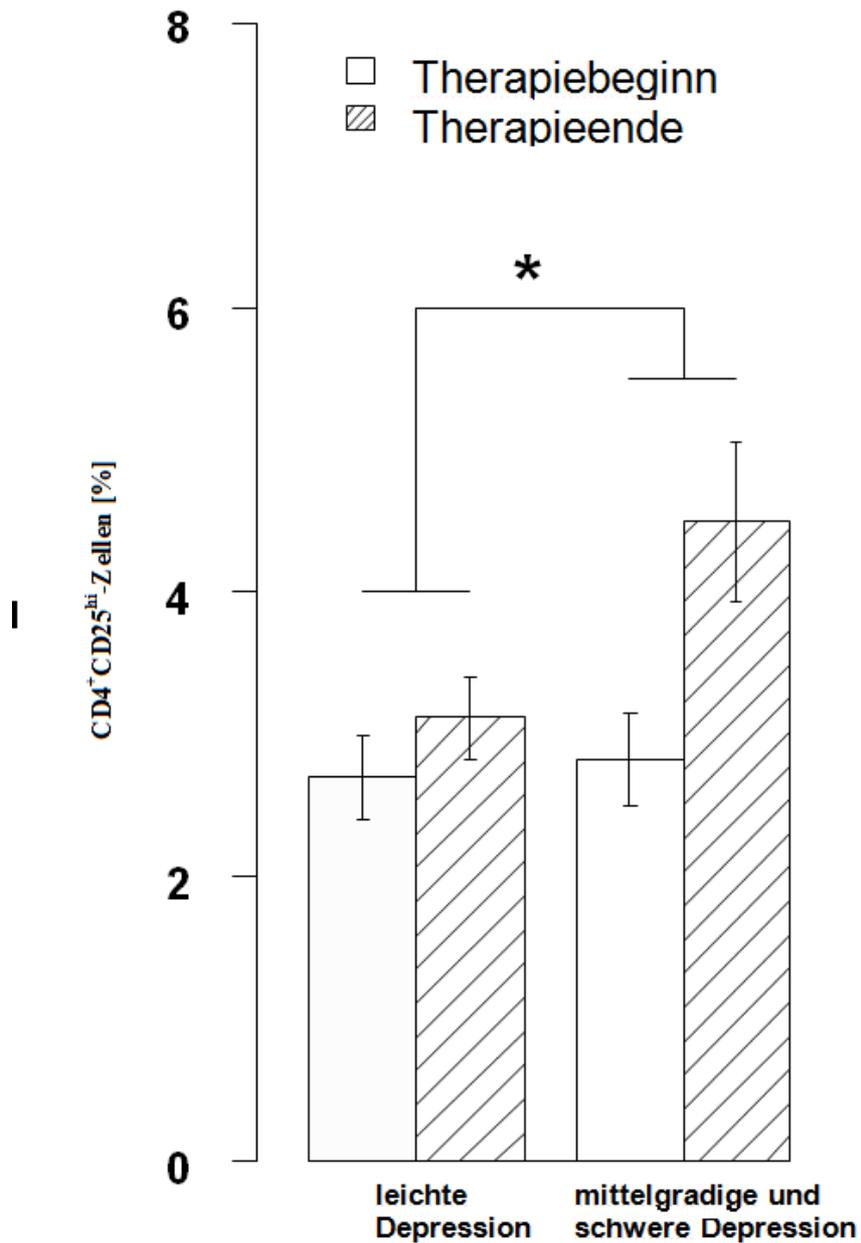


Abbildung 5. CD4⁺CD25^{hi}-Zellen [%] bei Beginn und nach Therapie bei Patienten mit leichter Depression (HAMD-21 < 22, n = 11) und mit mittelgradig bis schwerer Depression (HAMD-21 > 21, n = 5). Das Sternchen bezieht sich auf signifikante Unterschiede bezüglich des Ausmaßes des Anstieges der CD4⁺CD25⁺-Zellen in den beiden Gruppen.

4. Ergebnisse

Explorative Analysen zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen Männern und Frauen. Ferner lag keine Assoziation zwischen der absoluten oder relativen Veränderung in CD4⁺CD25⁺- sowie CD4⁺CD25^{hi}-Zellen und der Behandlung mit Mirtazapin (n = 5), SSRIs (N = 8), Citalopram oder Escitalopram (N = 5), Venlafaxin (N = 7) oder Quetiapin (N = 8) vor (T-test, alle p > 0,05). Für weitere Details hinsichtlich der Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung sei auf die Publikation von Himmerich et al. (Himmerich et al. 2010) verwiesen, die aus der Studie hervorgegangen ist.

5. Diskussion

5.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass antidepressive Behandlung sowohl die Plasmakonzentrationen von IL-1 β als auch die stimulierte in-vitro Produktion von IL-1 β und IL-6 reduziert, und dass gleichzeitig die dabei beobachteten Veränderungen der stimulierten IL-1 β -Produktion mit dem BDI-Score korrelieren. Es fand sich ein signifikanter Anstieg der CD4⁺CD25⁺- und der CD4⁺CD25^{hi}-Tregs über eine sechswöchige Behandlung.

5.2 Bedeutung der Ergebnisse

Diese Resultate stimmen mit älteren Studienergebnissen überein, die bereits eine reduzierte Produktion pro-inflammatorischer Zytokine durch erfolgreiche antidepressive Therapie sowohl in-vivo als auch in-vitro nachweisen konnten (Kubera et al. 2001; Piletz et al. 2009; Seidel et al. 1995; Basterzi et al. 2005). Daher konnte unsere Studie die Hypothese über den hemmenden Einfluss von Antidepressiva auf die Zytokinproduktion stützen.

Eine erhöhte Produktion von IL-1 β wurde in einem Tiermodell für chronischen Stress bei Ratten sowie einem Depressionsmodell bei Mäusen durch mitogenstimulierte Splenozyten nachgewiesen. Ferner konnte gezeigt werden, dass nach Verabreichen von IL-1 β an Tieren und Menschen depressionsähnliche Symptome auftreten, wie Anhedonie, Anorexie, Gewichtsverlust, sozialer Rückzug, psychomotorische Retardierung, Antriebsmangel, erhöhte Reizbarkeit und Schlafstörungen (Kubera et al. 2001). Man fand bei depressiven Kindern (Brambilla et al. 2004), bei depressiven Erwachsenen (Simon et al. 2008) und bei geriatrischen Patienten mit Depressionen (Diniz et al. 2010) erhöhte IL-1 β -Plasmakonzentrationen. Auch die Messenger-Ribonukleinsäure- (mRNA) -Konzentrationen von IL-1 β sind bei depressiven Patienten erhöht (Tsao et al. 2006). Außerdem scheint die Therapieansprechrates von antidepressiver Behandlung durch IL-1 β -Genmutationen beeinflusst zu werden (Tadić et al. 2008; Baune et al. 2009). Nachdem beobachtet wurde, dass der IL-1-Rezeptorantagonist (IL-1Ra) die durch IL-1 β hervorgerufenen Stresssymptome und -effekte sowohl in Zell- als auch in Verhaltensmodellen blockiert, hat man IL-1Ra als eine neue Therapieoption für Depressionen in Betracht gezogen (Koo und Duman 2009). Auch eine erhöhte IL-6-Bildung soll mit der Depression assoziiert sein (Basterzi et al. 2005). Unsere Befunde reihen sich also gut in die bisherige Literatur ein.

5. Diskussion

5.3 Mögliche Erklärungen für die erhaltenen Ergebnisse

Über drei unterschiedliche molekulare Mechanismen könnte die Aktivierung der Produktion pro-inflammatorischer Zytokine mit der Pathophysiologie der Depression in Verbindung stehen, so dass eine erhöhte Expression dieser Zytokine zu einer depressiven Symptomatik führt, während eine erfolgreiche Behandlung der Depression mit einem Rückgang der Überproduktion pro-inflammatorischer Zytokine einhergeht:

1. Pro-inflammatorische Zytokine können neuronale Serotonintransporter aktivieren und so den gegenteiligen Effekt wie SSRIs haben. Insbesondere IL-1 β scheint die Serotonintransporter-Expimierung im Hippocampus zu erhöhen (Ramamoorthy et al. 1995) und die Serotonintransporter zu aktivieren (Zhu et al. 2006).
2. Eine Immunaktivierung mit erhöhter Bildung pro-inflammatorischer Zytokine aktiviert das Tryptophan- und Serotonin-abbauende Enzym IDO. Ein vermehrter Verbrauch von Serotonin und seinem Vorläuferprotein Tryptophan führt zu einer verminderten Verfügbarkeit von Serotonin, als Folge der IDO-Aktivierung.
3. Es wurde postuliert, dass die Aktivierung des pro-inflammatorischen Zytokinsystems eine ursächliche Rolle bei der depressionsbezogenen Aktivierung der HPA-Achse spielt (Himmerich et al. 2009).

Daten aus mehreren ex-vivo-Studien zeigen, dass Antidepressiva die Bildung pro-inflammatorischer Zytokine hemmen. Dabei nimmt man an, dass diese Suppression der pro-inflammatorischen Zytokinproduktion in einer Verbesserung der depressiven Symptomatik mündet (Kenis und Maes 2005).

Obwohl der Mittelwert der stimulierten IFN- α -Bildung abfiel, erreichte diese Veränderung keine statistische Signifikanz, was an der kleinen Studienpopulation mit 16 Patienten liegen könnte.

Der neue Befund dieser Studie ist, dass CD4⁺CD25⁺- und CD4⁺CD25^{hi}-Zellen signifikant während antidepressiver Behandlung angestiegen sind, obwohl die Lymphozytenfraktion konstant geblieben ist. Dabei gibt es Parallelen zu Autoimmunerkrankungen, in denen Zytokine und Tregs ebenfalls eine wichtige Rolle einnehmen. Hier steigt die Tregs-Anzahl bei den Patienten, die von einer anti-inflammatorischen Behandlung profitieren (Boissier et al.

5. Diskussion

2009). Tregs sind potente Suppressoren sowohl des erworbenen als auch des angeborenen Immunsystems. Beispielsweise steuern Tregs die Monozytendifferenzierung zu den alternativ aktivierten Makrophagen (AAM). AAM stellen Zellen mit einem hohen anti-inflammatorischem Potential dar. Es konnte nach einer Inkubation mit Tregs gezeigt werden, dass die Monozyten die typischen Eigenschaften der AAM-Zellen aufwiesen, inklusive der Eigenschaft einer stark verminderten Produktion von IL-1 β und IL-6 (Tiemessen et al. 2007). Daher könnte eine Aktivierung der Tregs durch antidepressive Behandlung erklären, wieso Antidepressiva die Bildung pro-inflammatorischer Zytokine reduzieren. Andererseits könnte die Hochregulation von Tregs auch Folge der Herunterregulation von IL-1 β während antidepressiver Therapie sein, da die Konversion von Tregs in TH-17-Zellen durch IL-1 β induziert werden kann (Deknuydt et al. 2009).

In unserer Studie untersuchten wir CD4⁺CD25^{hi}-Tregs ohne Rücksicht auf den Foxp3-Status der Zellen, weil kontroverse Ergebnisse bezüglich muriner und humaner CD4⁺CD25^{hi}-T-Zellen publiziert wurden.

Beispielsweise fand man heraus, dass der Transkriptionsfaktor Foxp3 in Mäusen essentiell ist, während es bei Menschen unterschiedliche Ergebnisse bezüglich CD4⁺CD25^{hi}-T-Zellen gibt, seitdem Morgan et al. (2005) beschrieben hat, dass Foxp3 auch in anderen T-Zellen exprimiert wird. Horwitz fand bei Foxp3 zudem unterschiedliche Effekte in Abhängigkeit von den Färbemethoden heraus (Horwitz 2010). Da der CD4⁺CD25^{hi}-Population eine regulative Funktion beigemessen wird und dies im Allgemeinen auf breiten Konsens stößt, verzichteten wir in unserer Studie auf die Foxp3-Quantifizierung.

Tregs exprimieren Tyrosin-Hydroxylase, die Stellschraube in der Katecholaminsynthese, (Consentino et al. 2007). Ihre Exprimierung ändert sich unter Stresseinfluss und Kortisolfreisetzung (Höglund et al. 2006). Unsere Untersuchungsbefunde mit erhöhten Tregs nach erfolgreicher antidepressiver Therapie werden von den Ergebnissen von Li et al. (2009) gestützt, die reduzierte Tregs während akuter depressiver Episoden fanden, ferner von Sommershof et al. (2009), die reduzierte Tregs bei Patienten mit PTSD fanden. Indessen postuliert Miller (2010), dass Tregs einen positiven Einfluss auf die Schwere der Depression durch deren Runterregulation chronischer inflammatorischer Reaktionen haben könnten, betont aber, dass Tregs auch einen negativen Effekt aufweisen könnten und dass die Balance der T-Zellen wichtig sein könnte. Da allerdings von regulatorischen und gegenregulatorischen Mechanismen auf extrazellulärer, intrazellulärer, Membran-, Rezeptor-, DNA- und RNA-

5. Diskussion

Ebene ausgegangen werden muss, die im einzelnen noch nicht verstanden sind, sollten keine voreiligen und allzu weit reichenden Schlüsse gezogen werden.

5.4 Limitationen der Untersuchung

Der Effekt der antidepressiven Therapie auf die Tregs bei Patienten sowohl mit milder als auch mit schwerer Depression bestätigt die Konsistenz unserer Resultate. Dennoch war unsere Studie eine explorativ-naturalistische Untersuchung. Wir berechneten mögliche Effekte von spezifischen Antidepressiva, fanden aber keinen signifikanten Einfluss. Spezifische Effekte von verschiedenen Antidepressiva können aber wegen der geringen Fallzahl nicht sicher ausgeschlossen werden. Die o. a. Resultate werfen die Fragen auf, ob der Anstieg der Tregs-Konzentration die Ursache oder die Folge von reduzierten Zytokinkonzentrationen während antidepressiver Behandlung ist und ob die Veränderungen im Treg-System auf der Besserung der depressiven Erkrankung oder auf der Antidepressivawirkung beruhen.

Trotz dieser Limitationen sollte festgehalten werden, dass Tregs erheblich die Immunantwort und die Autoimmunität beeinflussen und ein wichtiger Bestandteil im Immunsystem sind. Trotzdem wurden Tregs bislang nicht während einer antidepressiven Behandlung untersucht. Daher stellt diese Studie einen ersten Schritt in diese Richtung dar, um die Beteiligung der Tregs an der Depression und ihrer Behandlung zu klären. Veränderungen innerhalb der Tregs könnten ein Grund für die Dysregulation der Zytokinproduktion bei depressiven Erkrankungen sein, und antidepressive Behandlung könnte diese pathologische Veränderung wieder normalisieren.

5.5. Limitationen der Zytokinhypothese für die Depression

Obwohl in der Literatur inkonsistente und widersprüchliche Angaben zu finden sind, gibt es einen Zusammenhang zwischen pro-inflammatorischen Zytokinen und der depressiven Erkrankung. Daher wird den Zytokinen möglicherweise in Zukunft ein Stellenwert bezüglich antidepressiver Targets und eine Biomarkerfunktion innerhalb der antidepressiven Behandlung beigemessen (Lichtblau et al. 2012). Möglicherweise eignen sich Zytokine auch für eine laborchemisch fundierte Subklassifizierung der Depression, die aktuell lediglich aufgrund der klinischen Symptomatik möglich ist, wie in der Einleitung ausgeführt wurde. Neben den klassischen pro-inflammatorischen Zytokinen IL-1 β , IL-6 und TNF- α kommen als mögliche Biomarker neu entdeckte Zytokine wie z. B. IL-12 hinzu, die prinzipiell das

5. Diskussion

Potential haben könnten, in der Behandlung von Depressionen eine Rolle zu spielen (Chang und Radbruch 2007). Aber die genauen Mechanismen und Parallelen zwischen psychiatrischen Erkrankungen und dem Immunsystem sind bislang nicht verstanden. Es sind noch viele Fragen zu klären, beispielsweise ob bei der Depression ohne körperliche Erkrankung die gleichen immunologischen Prozesse an der Entstehung affektiver Symptome beteiligt sind wie bei Patienten mit einer entzündlichen Hirnerkrankungen wie der MS und einer depressiven Episode.

Bisher liegen keine evidenz-basierten cut-off-Werte für Zytokinkonzentrationen vor, die zur Diagnosestellung einer depressiven Episode herangezogen werden könnten. Eine wiederholte Messung von Zytokinkonzentrationen könnte ein Indiz für die Progression oder eine beginnende Remission der Erkrankung sein. Andererseits können Zytokinkonzentrationen aufgrund anderer Faktoren fluktuieren, z. B. Infektionen, Körpergewichtsänderungen und Schwangerschaft. Die Anforderungen an einen Biomarker sind primär hohe Spezifität und hohe Sensitivität, gefolgt von minimal-invasiver Aquirierung des Probenmaterials und günstigen Routinelabormethoden. Was Zytokine betrifft, sind diese Standards nicht erreicht. Eine wichtige differentialdiagnostische Erkrankung ist beispielsweise die bipolare Störung. Auch in bipolaren Erkrankungen finden sich hohe Konzentrationen von IL-2, sIL-6R und IFN- γ (Modabbernia et al 2013). Aus diesem Grund können die bis heute bekannten Zytokine wahrscheinlich nicht zur Differentialdiagnose zwischen bipolarer und depressiver Störung herangezogen werden.

Auch wenn gezeigt werden konnte, dass Antidepressiva die Zytokinbildung in-vitro senken können (Himmerich et al. 2010b), aktivieren einige Antidepressiva das TNF- α -System in vivo (Hinze-Selch et al. 2000; Kraus et al. 2002), insbesondere Amitriptylin und Mirtazapin, die eine Gewichtszunahme bewirken. Daraus resultieren erhöhte Plasmakonzentrationen von TNF- α , sTNF-R p55 und sTNF-R p75. Zusätzlich wurde berichtet, das Lithium ähnliche stimulierende Effekte auf das TNF- α -System besitzt (Himmerich et al. 2005). Somit widersprechen diese referierten Befunde der Zytokinhypothese der Depression, da sowohl Amitriptylin als auch Mirtazapin potente Antidepressiva sind und die Therapieansprechrates im positiven Sinne beeinflussen können (Leucht et al. 2012; Watanabe et al. 2011). Lithium wird sogar bei therapieerschwerter Depression als sinnvolle Add-on-Therapie eingesetzt (Bauer et al. 2010). Diese immunologischen Veränderungen zeigen relevante Einflüsse des Immunsystems auf die antidepressive Behandlung im Allgemeinen auf, die derzeit aber nur unzureichend interpretiert werden können.

6. Zusammenfassung

Regulatorische T-Zellen (Tregs, $CD4^+CD25^{hi}$ -Tregs) haben u. a. die Aufgabe, die Immunantwort sowie die Zytokinfreisetzung zu steuern, um die Immuntoleranz gegenüber körpereigenen Antigenen aufrecht zu erhalten. Es wurde beschrieben, dass depressive Patienten eine erniedrigte Konzentration von Tregs aufweisen. Da es außerdem Hinweise darauf gibt, dass Zytokine wie Interleukin (IL)- 1β , IL-6 und Interferon (IFN)- α eine Rolle in der Pathophysiologie der Depression spielen und dass sich die Konzentrationen dieser Zytokine während antidepressiver Therapie ändern, untersuchten wir neben Veränderungen der Produktion von IL- 1β , IL-6 und IFN- α auch die Veränderung der Konzentration von $CD4^+CD25^{hi}$ -Tregs während antidepressiver Therapie.

Wir gewannen dazu das Blut von 16 Patienten mit depressiver Störung in der ersten und sechsten Woche nach stationärer Aufnahme, in dem wir die Plasmakonzentrationen von IL- 1β bestimmten. Ferner wurde die Produktion von IL- 1β , IL-6 und IFN- α in einem Vollblut-Assay unter immunologischer Stimulation mit Lipopolysaccharid (LPS) oder Newcastle Disease Virus (NDV) in-vitro gemessen. Die Lymphozyten wurden differenziert und $CD4^+CD25^{hi}$ -Tregs mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Der psychopathologische Status wurde mit der Hamilton-Depressionsskala (HAMD-21) erfasst.

Der HAMD-21-Score, die IL- 1β -Plasmakonzentrationen sowie die LPS-induzierte IL- 1β - und IL-6-Produktion waren nach sechs Wochen antidepressiver Behandlung signifikant gegenüber der Baseline erniedrigt. Dagegen stieg der Anteil der $CD4^+CD25^{hi}$ -Tregs unter den Lymphozyten von $2,74\% \pm 0,88$ (Mittelwert \pm Standardabweichung) auf $3,54\% \pm 1,21$ signifikant ($p = 0,007$) an. Es fand sich keine signifikante Änderung der NDV-induzierten IFN- α -Produktion.

Der Anstieg der $CD4^+CD25^{hi}$ -Tregs während antidepressiver Therapie könnte mit dem Abfall der Zytokinproduktion und der psychopathologischen Verbesserung der Patienten in einem kausalen Zusammenhang stehen.

7. Literaturverzeichnis

- Abbasi SH, Hosseini F, Modabbernia A, Ashrafi M, Akhondzadeh S: Effect of celecoxib addition treatment on symptoms and serum IL-6 concentrations in patients with major depressive disorder: Randomized double-blind placebocontrolled study. *Journal of Affective Disorders*, 2012; 141: 308 – 314.
- Akhondzadeh S, Jafari S, Raisi F, Nasehi AA, Ghoreishi A, Salehi B, Mohebibi-Rasa S, Raznahan M, Kamalipour A: Clinical trial of adjunctive celecoxib treatment in patients with major depression: A double blind and placebo controlled trial. *Journal of Depression and Anxiety*, 2009; 26: 607 – 611.
- Alexopoulos GS, Meyers BS, Young RC, Kakuma T, Feder M, Einhorn A, Rosendahl E: Recovery in geriatric depression. *Archives of General Psychiatry*, 1996; 53: 305 – 312.
- Angst J: Verlauf unipolarer depressiver, bipolar manisch-depressiver und schizoaffektiver Erkrankungen und Psychosen. Ergebnisse einer prospektiven Studie. *Fortschritte der Neurologie – Psychiatrie*, 1980; 48: 3 – 30.
- Angst J, Kupfer DJ, Rosenbaum JF: Recovery from depression: Risk or reality? *Acta Psychiatrica Scandinavica*, 1996; 93: 413 – 419.
- Antonioli M, Rybka J, Carvalho LA, Neuroimmune endocrine effects of antidepressants. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, 2012; 8: 65 – 83.
- Apostolou I, von Boehmer H: In vivo instruction of suppressor commitment in naive T Cells. *Journal of Experimental Medicine*, 2004; 199: 1401 – 1408.
- Argaw AT, Asp L, Zhang J, Navrazhina K, Pham T, Mariani JN, Mahase S, Dutta DJ, Seto J, Kramer EG, Ferrara N, Sofroniew MV, John GR: Astrocyte-derived VEGF-A drives blood – brain barrier disruption in CNS inflammatory disease. *Journal of Clinical Investigation*, 2012; 122: 2454 – 2468.

7. Literaturverzeichnis

- Avrameas S, Guilbert B: A Method for quantitative determination of cellular immunoglobulins by enzyme labelled antibodies. *European Journal of Immunology*, 1971; 1: 394 – 396.
- Bacchetta R, Gambineri E, Roncarolo MG: Role of regulatory T cells and FOXP3 in human diseases. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2007; 120: 227 – 235.
- Bagavant H, Thompson C, Ohno K, Setiady Y, Tung KS: Differential effect of neonatal thymectomy on systemic and organ-specific autoimmune disease. *International Immunology*, 2002; 14: 1397 – 1406.
- Banks WA: Anorectic effects of circulating cytokines: Role of the vascular blood – brain barrier. *Nutrition*, 2001; 17: 434 – 437.
- Bano S, Gitay M, Ara I, Badawy A: Acute effects of serotonergic antidepressants on tryptophan metabolism and corticosterone levels in rats. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2010; 23: 266 – 272.
- Bano S, Morgan CJ, Badawy AA, Buckland PR, Guffin PM: Inhibition of rat liver tryptophan pyrrolase activity by fluoxetine. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1999; 12: 11 – 16.
- Bartrop RW, Lazarus L, Luckhurst E, Kiloh LG, Penny R: Depressed lymphocyte function after bereavement. *Lancet*, 1977; 83: 834 – 836.
- Baune BT, Dannlowski U, Domschke K, Janssen DG, Jordan MA, Ohrmann P, Bauer J, Biros E, Arolt V, Kugel H, Baxter AG, Suslow T: The interleukin 1 beta (IL1B) gene is associated with failure to achieve remission and impaired emotion processing in major depression. *Biological Psychiatry*, 2010; 67: 543 – 549.
- Belanoff JK, Rothschild AJ, Cassidy F, Debattista C, Baulieu EE, Schold C, Schatzberg AF: An open label trial of C-1073 (mifepristone) for psychotic major depression. *Biological Psychiatry*, 2002; 52: 386 – 392.

7. Literaturverzeichnis

- Benedetti F, Campori E, Colombo C, Smeraldi E: Fluvoxamine treatment of major depression associated with multiple sclerosis. *Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences*, 2004; 16: 364 – 366.
- Berger M: *Psychische Erkrankungen und Therapie*. 3. Auflage, Elsevier Urban & Fischer, 2009.
- Berthold-Losleben M, Himmerich H: The TNF α system: Functional aspects in depression, narcolepsy and psychopharmacology. *Current Neuropharmacology*, 2008; 6: 193 – 202.
- Besedovsky HO, del Rey A, Klusman I, Furukawa H, Monge Arditi G, Kabiersch A: Cytokines as modulators of the hypothalamus – pituitary – adrenal axis. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 1991; 40: 613 – 618.
- Bettelli E, Dastrange M, Oukka M: Foxp3 interacts with nuclear factor of activated T cells and NF- κ to repress cytokine gene expression and effector functions of T helper Cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005; 102: 5138 – 5143.
- Bluthé RM, Michaud B, Kelley KW, Dantzer R: Vagotomy attenuates behavioural effects of interleukin-1 injected peripherally but not centrally. *Neuroreport*, 1996; 7: 1485 – 1488.
- Bluthé RM, Walter V, Parnet P, Layé S, Lestage J, Verrier D, Poole S, Stenning BE, Kelley KW, Dantzer R: Lipopolysaccharide induces sickness behaviour in rats by a vagal mediated mechanism. *Comptes Rendus del' Académie des Sciences*, 1994; 317 : 499 – 503.
- Bopp T, Jonuleit H, Schmitt E: Regulatory T cells--the renaissance of the suppressor T cells. *Annals of Medicine*, 2007; 39: 322 – 334.
- Bora U, Chugh L, Nahar P: Covalent immobilization of proteins onto photoactivated polystyrene microtiter plates for enzyme-linked immunosorbent assay procedures. *Journal of Immunological Methods*, 2002; 268: 171 – 177.

7. Literaturverzeichnis

- Cole MG, Bellavance F: The prognosis of depression in old age. *American Journal of Geriatric Psychiatry*, 1997; 5: 4 – 14.
- Capuron L, Miller AH: Cytokines and psychopathology: Lessons from interferon-alpha. *Biological Psychiatry*. 2004; 56: 819-824.
- Carpenter LL, Heninger GR, Malison RT, Tyrka AR, Price LH: Cerebrospinal fluid interleukin (IL)-6 in unipolar major depression. *Journal of Affective Disorders*, 2004; 79: 285 – 289.
- Chang HD, Radbruch A: The pro- and anti-inflammatory potential of interleukin-12. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2007; 1109: 40 – 46.
- Chen W, Jin W, Hardegen N, Lei KJ, Li L, Marinos N, McGrady G, Wahl SM: Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *Journal of Experimental Medicine*, 2003; 198: 1875 – 1886.
- Chiaravalloti ND, Deluca J: Cognitive impairment in multiple sclerosis. *Lancet Neurology*, 2008; 7: 1139 – 1151.
- Dantzer R: Cytokine, sickness behavior, and depression. *Immunology and Allergy Clinics of North America*, 2009; 29: 247 – 264.
- Dilling H, Mombour W, Schmidt MH, Schulte-Markwort E: Internationale Klassifikation psychischer Störungen, ICD-10 Kapitel V (F), Klinisch-diagnostische Leitlinien, 5. Auflage, Hans Huber, 2005.
- Domingues HS, Mues M, Lassmann H, Wekerle H, Krishnamoorthy G: Functional and pathogenic differences of Th1 and Th17 cells in experimental autoimmune encephalomyelitis. *PLoS One*, 2010; 5: e15531.

7. Literaturverzeichnis

- Eller T, Aluoja A, Maron E, Vasar V: Soluble interleukin-2 receptor and tumor necrosis factor levels in depressed patients in Estonia. *Medicina (Kaunas)*, 2009; 45: 971 – 977.
- Eller T, Vasar V, Shlik J, Maron E: Pro-inflammatory cytokines and treatment response to escitalopram in major depressive disorder. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 2008; 32: 445 – 450.
- Engvall E: Enzyme Immunoassay ELISA and EMIT. *Methods in Enzymology*, 1980; 70: 419 – 439.
- Engvall E, Perlman P: Enzyme-linked immunoabsorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry*, 1971; 8: 871 – 874.
- Erhardt S, Lim CK, Linderholm KR, Janelidze S, Lindqvist D, Samuelsson M, Lundberg K, Postolache TT, Träskman-Benz L, Guillemin GJ, Brundin L: Connecting inflammation with glutamate agonism in suicidality. *Neuropsychopharmacology*, 2013; 38: 743 – 752.
- Ericsson A, Kovacs KJ, Sawchenko PE: A functional anatomical analysis of central pathways subserving the effects of interleukin-1 on stress-related neuroendocrine neurons. *Journal of Neuroscience*, 1994; 14: 897 – 913.
- Faria MA, Weiner HL: Oral tolerance and TGF- β - producing cells: *Inflammation & Allergy Drug Targets*, 2006; 5: 179 – 190.
- Feinstein A: Multiple sclerosis, disease modifying treatments and depression: A critical methodological review. *Multiple Sclerosis Journal*, 2000; 6: 343 – 348.
- Feinstein A: The neuropsychiatry of multiple sclerosis. *Canadian Journal of Psychiatry* 2004; 49: 157 – 163.
- Feinstein A, O' Connor P, Feinstein K: Multiple sclerosis, interferon beta-1b and depression: A prospective investigation. *Journal of Neurology*, 2002; 249: 815 – 820.

7. Literaturverzeichnis

- Fluitman SB, Heijnen CJ, Denys DA, Nolen WA, Balk FJ, Westenberg HG: Electroconvulsive therapy has acute immunological and neuroendocrine effects in patients with major depressive disorder. *Journal of Affective Disorders*, 2011; 131: 388 – 392.
- Foley FW, Traugott U, La Rocca NG, Smith CR, Perlman KR, Caruso LS, Scheinberg LC: A prospective study of depression and immune dysregulation in multiple sclerosis. *Archives of Neurology*, 1992; 49: 238 – 244.
- Fontenot JD, Rudensky AY: A well adapted regulatory contrivance: regulatory T cell development and the forkhead family transcription factor Foxp3. *Nature Immunology*, 2005; 6: 331 – 337.
- Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY: Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nature Immunology*, 2003; 4: 330 – 336.
- Foster JR: The functions of cytokines and their uses in toxicology. *International Journal of Experimental Pathology* 2001; 82: 171 – 192.
- Fuchs E, Flüge G: Depressionen: Eine Störung der Neuroplastizität? *Psychoneuro*, 2005; 31: 197 – 203.
- Gallinat J, Heinz A: *Facharztprüfung Psychiatrie und Psychotherapie in Fällen, Fragen und Antworten*, Elsevier Urban & Fischer, 2010.
- Gershon RK, Cohen P, Hencin R, Liebhaber SA: Suppressor T cells. *Journal of Immunology*, 1972; 108: 586 – 590.
- Gershon RK, Kondo K: Infectious immunological tolerance. *Immunology*, 1971; 21: 903 – 914.
- Gill J, Luckenbaugh D, Charney D, Vythilingam M: Sustained elevation of serum interleukin-6 and relative insensitivity to hydrocortisone differentiates posttraumatic stress disorder with and without depression. *Biological Psychiatry*, 2010; 68: 999 – 1006.

7. Literaturverzeichnis

- Girgenti MJ, Hunsberger J, Duman CH, Sathyanesan M, Terwilliger R, Newton SS: Erythropoietin induction by electroconvulsive seizure, gene regulation, and antidepressant-like behavioral effects. *Biological Psychiatry*, 2009; 66: 267 – 274.
- Goldman Consensus Group: The Goldman Consensus statement on depression in multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis Journal*, 2005; 11: 328 – 337.
- Goodwin FK, Jamison KR: *Manic Depressive Illness*. Oxford University Press, 1990.
- Groettrup M, Kolassa IT: Substantial reduction of naïve and regulatory T cells following traumatic stress. *Brain, Behavior, and Immunity*, 2009; 23: 1117–1124.
- Heiser P, Lanquillon S, Krieg JC, Vedder H: Differential modulation of cytokine production in major depressive disorder by cortisol and dexamethasone. *European Neuropsychopharmacology*, 2008; 18: 860 – 870.
- Himmerich H, Berthold-Losleben M, Pollmächer T: Die Bedeutung des TNF- α -Systems für Erkrankungen des Gehirns. *Fortschritte der Neurologie – Psychiatrie*, 2009; 77: 334 – 345.
- Himmerich H, Fulda S, Linseisen J, Seiler H, Wolfram G, Himmerich S, Gedrich K, Kloiber S, Lucae S, Ising M, Uhr M, Holsboer F, Pollmächer T: Depression, comorbidities and the TNF-alpha system. *European Psychiatry*, 2008; 23: 421 – 429.
- Himmerich H, Fulda S, Sheldrick AJ, Plümäkers B, Rink L: IFN-gamma reduction by tricyclic antidepressants. *International Journal of Psychiatry in Medicine* 2010; 40: 413 – 424.
- Himmerich H, Koethe D, Schuld A, Yassouridis A, Pollmächer T: Plasma levels of leptin and endogenous immune modulators during treatment with carbamazepine or lithium. *Psychopharmacology*, 2005; 179: 447 – 451.

7. Literaturverzeichnis

- Himmerich H, Milenović S, Fulda S, Plümäkers B, Sheldrick AJ, Michel TM, Kircher T, Rink L: Regulatory T cells increased while IL-1 β decreased during antidepressant therapy. *Journal of Psychiatric Research*, 2010; 44: 1052 – 1057.
- Himmerich H: Sheldrick AJ, TNF-alpha and ghrelin: Opposite effects on immune system, metabolism and mental health. *Protein and Peptide Letters*, 2010; 17: 186 – 196.
- Himmerich H, Sorge S, Kirkby KC, Steinberg H: Schizophrene Störungen. Die Entwicklung immunologischer Krankheits- und Therapiekonzepte. *Nervenarzt*, 2012; 83: 7 – 15.
- Himmerich H, Wranik DW: Choice of treatment with antidepressants: Influencing factors. *Current Pharmaceutical Design*, 2012; 18: 5958 – 5975.
- Hinze-Selch D, Schuld A, Kraus T, Kühn M, Uhr M, Haack M, Pollmächer T: Effects of antidepressants on weight and on the plasma levels of leptin, TNF-alpha and soluble TNF receptors: A longitudinal study in patients treated with amitriptyline or paroxetine. *Neuropsychopharmacology*, 2000; 23: 13 – 19.
- Hori S, Nomura T, Sakaguchi S: Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science*, 2003; 299: 1057 – 1061.
- House RV: Theory and practice of cytokines assessment in immunotoxicology. *Methods*, 1999; 19: 17 – 27.
- Itoh M, Takahashi T, Sakaguchi N, Kuniyasu Y, Shimizu J, Otsuka F, Sakaguchi S: Thymus and autoimmunity: production of CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells as a key function of the thymus in maintaining immunologic self-tolerance. *Journal of Immunology*, 1999; 162: 5317 – 5326.
- Janelidze S, Ventorp F, Erhardt S, Hansson O, Minthon L, Flax J, Samuelsson M, Traskman-Bendz L, Brundin L: Altered chemokine levels in the cerebrospinal fluid and plasma of suicide attempters. *Psychoneuroendocrinology*, 2013; 38: 853 – 862.

7. Literaturverzeichnis

- Joffe RT, Lippert GP, Gray TA, Sawa G, Horwath Z: Mood disorders and multiple sclerosis. *Archives of Neurology*, 1987; 44: 376 – 378.
- Jokinen J, Chatzittofis A, Hellström C, Nordström P, Uvnäs-Moberg K, Asber M. Low CSF oxytocin reflects high intent in suicide attempters. *Psychoneuroendocrinology* 2012; 37: 482 – 490.
- Kawaguchi R, Shimokawa T, Umehara N, Nunomura S, Tanaka T, Ra C: Priming of peripheral monocytes with prolactin (PRL) sensitizes IFN-gamma-mediated indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) expression without affecting IFN-gamma signaling. *Journal of Reproductive Immunology*, 2008; 77: 117 – 125.
- Keller MB, Lavori PW, Mueller TI, Endicott J, Coryell W, Hirschfeld RM, Shea T: Time to recovery, chronicity, and levels of psychopathology in major depression: a 5-year prospective follow-up of 341 subjects. *Archives of General Psychiatry*, 1992; 49: 809 – 816.
- Kenis G, Maes M: Effects of antidepressants on the production of cytokines. *The International Journal of Neuropsychopharmacology*, 2002; 5: 401 – 412.
- Khosro S, Alireza S, Omid A, Forough S: Night work and inflammatory markers. *Indian Journal of Occupational and Environmental Medicine*, 2011; 15: 38 – 41.
- Kiank C, Zeden J. P, Drude S, Domanska G, Fusch G, Otten W, Schuett C: Psychological stress-induced, IDO1-dependent tryptophan catabolism: Implications on immunosuppression in mice and humans, 2010, 28; 5: e11825.
- Kim JM, Rasmussen JP, Rudensky AY: Regulatory T cells prevent catastrophic autoimmunity throughout the lifespan of mice. *Nature Immunology*, 2007; 8: 191 – 197.
- Kim YK, Na KS, Shin KH, Jung HY, Choi SH, Kim JB: Cytokine imbalance in the pathophysiology of major depressive disorder. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 2007; 31: 1044 – 1033.

7. Literaturverzeichnis

- Kirchner H, Kleinicke C, Digel W: A whole-blood technique for testing production of human interferon by leukocytes. *Journal of Immunological Methods*, 1982; 48: 213 – 219.
- Koch MW, Glazenberg A, Uyttenboogaart M, Mostert J, De Keyser J: Pharmacologic treatment of depression in multiple sclerosis. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2011; CD007295.
- Kohn R, Saxena S, Levav I, Saraceno B: The treatment gap in mental health care. *Bulletin of the World Health Organization*, 2004; 82: 858 – 866.
- Koo JW, Duman RS: Evidence for IL-1 receptor blockade as a therapeutic strategy for the treatment of depression. *Current Opinion in Investigational Drugs*, 2009; 10: 664 – 671.
- Kraus T, Haack M, Schuld A, Hinze-Selch D, Koethe D, Pollmächer T: Body weight, the tumor necrosis factor system, and leptin production during treatment with mirtazapine or venlafaxine. *Pharmacopsychiatry*, 2000; 35: 220 – 225.
- Krug EG, Dahlberg LL, Mercy JA, Zwi AB, Lozano R: World report on violence and health. World Health Organization, 2002.
- Krügel U, Fischer J, Radicke S, Sack U, Himmerich H: Antidepressant effects of TNF- α blockade in an animal model of depression. *Journal of Psychiatric Research*, 2013; 47: 611 – 616.
- Kubera M, Lin AH, Kenis G, Bosmans E, van Bockstaele D, Maes M: Anti-Inflammatory effects of antidepressants through suppression of the interferon-gamma/interleukin-10 production ratio. *Journal of Clinical Psychopharmacology*, 2001; 21: 199 – 206.
- Kuhn R: The treatment of depressive states with G 22355 (imipramine hydrochloride). *American Journal of Psychiatry*, 1958; 115: 459 – 464.
- Labrousse H, Guesdon JL, Ragimbeau J, Avrameas S: Miniaturization of b-galactosidase immunoassays using chromogenic and fluorogenic substrates. *Journal of Immunological Methods*, 1982; 48: 133–147.

7. Literaturverzeichnis

- Lanquillon S, Krieg JC, Bening-Abu-Shach U, Vedder H: Cytokine production and treatment response in major depressive disorder. *Neuropsychopharmacology*, 2000; 22: 370 – 379.
- Laux G: Chronifizierte Depressionen. Enke, 1986.
- Lavori PW, Keller MB, Klerman GL: Relapse in affective Disorders: A reanalysis of the literature using life table methods. *Journal of Psychiatric Research*, 1984; 18: 13 – 25.
- Leucht C, Huhn M, Leucht S: Amitriptyline versus placebo for major depressive disorder. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2012; CD009138.
- Li MO, Wan YY, Flavell RA: T-cell produced transforming growth factor- β 1 controls T cell tolerance and regulates Th1- and Th17-cell-differentiation. *Immunity* 2007; 26, 579-591.
- Li X, Cudaback E, Breyer RM, Montine KS, Keene CD, Montine TJ: Eicosanoid receptor subtype-mediated opposing regulation of TLR-stimulated expression of astrocyte glial-derived neurotrophic factor. *FASEB Journal*, 2012; 26: 3075 – 3083.
- Li Y, Xiao B, Qiu W, Yang L, Hu B, Tian X, Yang H: Altered expression of CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells and its 5-HT_{1a} receptor in patients with major depression disorder. *Journal of Affective Disorders* 2010; 124, 68-75
- Lichtblau N, Schmidt F, Himmerich H: Die Rolle von Zytokinen bei psychiatrischen Erkrankungen – Immunsystem und Depression. *InFo Neurologie Psychiatrie*, 2012; 14: 56 – 62.
- Lindqvist D, Janelidze S, Hagell P, Erhardt S, Samuelsson M, Minthon L, Hansson O, Björkqvist M, Träskman-Bendz L, Brudin L: Interleukin- 6 is elevated in the cerebrospinal fluid of suicide attempters and related to symptom severity. *Biological Psychiatry*, 2009; 66: 287 – 292.

7. Literaturverzeichnis

- Liu YJ, Soumelis V, Watanabe N, Ito T, Wang YH, Malefyt Rde W, Omori M, Zhou B, Ziegler SF: TSLP: an epithelial cell cytokine that regulates T cell differentiation by conditioning dendritic cell maturation. *Annual Review of Immunology*, 2007; 25: 193 – 219.
- Lotrich F: Inflammatory cytokines, growth factors, and depression. *Current Pharmaceutical Design*, 2012; 18: 5920 – 5935.
- Luttmann W, Bratke K, Küpper M, Myrtek D: *Der Experimentator: Immunologie*, 4. Auflage, Springer Spektrum, 2014.
- Maes M, Lambrechts J, Bosmans E: Evidence for a systemic immune activation during depression: results of leukocyte enumeration by flow cytometry in conjunction with monoclonal antibody staining. *Psychology and Medicine*, 1992; 22: 45 – 53.
- Maes M, Meltzer HY, Bosmans E, Bergmans R, Vandoolaeghe E, Ranjan R, Desnyder R: Increased plasma concentrations of interleukin-6, soluble interleukin-6, soluble interleukin-2 and transferrin receptor in major depression. *Journal of Affective Disorders*, 1995; 34: 301 – 309.
- Maes M, van der Planken M, Stevens WJ: Leukocytosis, monocytosis and neutrophilia: hallmarks of severe depression. *Journal of Psychiatric Research*, 1992; 26: 125 – 134.
- Maj M, Veltro F, Pirozzi R, Lobracc S, Magliano L: Pattern of recurrence of illness after recovery from an episode of major depression: a prospective study. *American Journal of Psychiatry*, 1992; 149: 795 – 800.
- Maloy KJ, Powrie F: Regulatory T cells in the control of immune pathology. *Nature Immunology* 2001; 2, 816-822.
- Malynn S, Campos-Torres A, Moynagh P, Haase J: The pro-inflammatory cytokine TNF- α regulates the activity and expression of the serotonin transporter (SERT) in astrocytes. *Neurochemical Research*, 2013; 38: 694 – 704.

7. Literaturverzeichnis

- Martinez JM, Garakani A, Yehuda R, Gorman JM: Proinflammatory and 'resiliency' proteins in the CSF of patients with major depression. *Depression and Anxiety*, 2012; 29: 32 – 38.
- Mattox JH, Buckman MT, Bernstein J, Pathak D, Kellner R: Dopamine agonists for reducing depression associated with hyperprolactinemia. *Journal of Reproductive Medicine*, 1986; 31: 694 – 698.
- McIvor GP, Riklan M, Reznikoff M: Depression in multiple sclerosis as a function of length and severity of illness, age, remission and perceived social support. *Journal of Clinical Psychology*, 1984; 40: 1028 – 1033.
- Mendlewicz J, Kriwin P, Oswald P, Souery D, Alboni S, Brunello N: Shortened onset of action of antidepressants in major depression using acetylsalicylic acid augmentation: A pilot open-label study. *International Clinical Psychopharmacology*, 2006; 21: 227 – 231.
- Merrill JE: Tumor necrosis factor alpha, interleukin 1 and related cytokines in brain development: normal and pathological. *Developmental Neuroscience*, 1992; 14: 1 – 10.
- Miller AH: Depression and immunity: a role for T cells? *Brain, Behavior, and Immunity*, 2010; 24: 1 – 8.
- Mitsonis CI, Zervas IM, Potagas CM, Mitropoulos PA, Dimopoulos NP, Sfagos CA, Papadimitriou GN, Vassilopoulos DC: Effects of escitalopram on stress-related relapses in women with multiple sclerosis: An open-label, randomized, controlled, one-year follow-up study. *European Neuropsychopharmacology*, 2010; 20: 123 – 131.
- Modabbernia A, Taslimi S, Brietzke E, Ashrafi M: Cytokine alterations in bipolar disorder: A meta-analysis of 30 studies. *Biological Psychiatry* 2013; 74:15-25.
- Mohr DC, Boudewyn AC, Goodkin DE, Bostrom A, Epstein L: Comparative outcomes for individual cognitive-behavior therapy, supportive-expressive group psychotherapy, and sertraline for the treatment of depression in multiple sclerosis. *Journal of Consulting and Clinical Psychology*, 2001; 69: 942 – 949.

7. Literaturverzeichnis

- Mohr DC, Hart SL, Fonavera I, Tasch ES: Treatment of depression for patients with multiple sclerosis in neurology clinics . *Multiple Sclerosis Journal*, 2006; 12: 204 – 208.
- Mohr DC, Hart SL, Julian L, Catledge C, Honos-Webb L, Vella L, Tasch ET: Telephone-administered psychotherapy for depression. *Archives of General Psychiatry*, 2005; 62: 1007 – 1014.
- Morgan ME, van Bilsen JH, Bakker AM, Heemskerk B, Schilham MW, Hartgers FC, Elferink BG, van der Zanden L, deVries RR, Huizinga TW, Ottenhoff TH, Toes RE: Expression of Foxp3 mRNA is not confined to CD4+CD25+ T regulatory cells in humans. *Human Immunology*, 2005; 66: 13 – 20.
- Mostert JP, Admiraal-Behloul F, Hoogduin JM, Luyendijk J, Heersema DJ, van Buchem MA, De Keyser J: Effects of fluoxetine on disease activity in relapsing multiple sclerosis: A double-blind, placebo-controlled, exploratory study. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, 2008; 79: 1027 – 1031.
- Musgrave T, Benson C, Wong G, Browne I, Tenorio G, Rauw G, Baker GB, Kerr BJ: The MAO inhibitor phenelzine improves functional outcomes in mice with experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *Brain, Behavior, and Immunity*, 2011; 25: 1677 – 1688.
- Müller N, Schwarz MJ: Immunologische Aspekte bei depressiven Störungen. *Nervenarzt*, 2007; 78: 1261 – 1273.
- Müller N, Schwarz MJ, Dehning S, Douhe A, Cerovecki A, Goldstein-Müller B, Spellmann I, Hetzel G, Maino K, Kleindienst N, Möller HJ, Arolt V, Riedel M: The cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib has therapeutic effects in major depression: Results of a double-blind, randomized, placebo controlled, add-on pilot study to reboxetine . *Molecular Psychiatry*, 2006; 11: 680 – 684.
- Myint AM, Leonard BE, Steinbusch HW, Kim YK: Th1, Th2 and Th3 cytokine alterations in major depression. *Journal of Affective Disorders* 2005; 88: 167-173.

7. Literaturverzeichnis

- Nakata A, Haratani T, Takahashi M, Kawakami N, Arito H, Kobayashi F, Fujioka Y, Fukui S, Araki S: Association of sickness absence with poor sleep and depressive symptoms in shift workers. *Chronobiology International*, 2004; 21: 899 – 912.
- Nierenberg AA, Fava M, Wong KK: A detailed examination of cytokine abnormalities in Major Depressive Disorder. *European Neuropsychopharmacology*, 2008; 18:230 –233.
- Pålhagen S, Qi H, Mårtensson B, Wålinder J, Granérus AK, Svenningsson P: Monoamines, BDNF, IL-6 and corticosterone in CSF in patients with Parkinson ' s disease and major depression. *Journal of Neurology*, 2010; 257: 524 – 532.
- Pandey GN, Rizavi HS, Ren X, Fareed J, Hoppensteadt DA, Roberts RC, Conley RR, Dwivedi Y: Proinflammatory cytokines in the prefrontal cortex of teenage suicide victims. *Journal of Psychiatric Research*, 2011; 46: 57 – 63.
- Patten SB, Williams JV, Love EJ: A case-control study of corticosteroid exposure as a risk factor for clinicallydiagnosed depressive disorders in a hospitalized population. *Canadian Journal of Psychiatry*, 1995; 40: 396 – 400.
- Paykel ES, Brugha T, Fryers T: Size and burden of depressive disorders in Europe. *European Neuropsychopharmacology*, 2005; 15: 411 – 423.
- Peck A, Mallins ED: Plasticity of T-cell phenotype and function: The T helper type 17 example. *Immunology*, 2009; 129: 147 – 153.
- Penninx BW, Kritchevsky SB, Yaffe K, Newman AB, Simonsick EM, Rubin S, Ferrucci L, Harris T, Pahor M: Inflammatory markers and depressed mood in older persons: Results from the Health, Aging and Body Composition study. *Biological Psychiatry*, 2003; 54: 566 – 572.
- Piccirillo CA, Shevach EM: Cutting edge: control of CD8+ T cell activation by CD4+ CD25+ immunoregulatory cells. *Journal of Immunology* 2001; 167, 1137-1140.

7. Literaturverzeichnis

- Piletz J. E, Halaris A, Iqbal O, Hoppensteadt D, Fareed J, Zhu H, Sinacore J, Devane CL: Pro-inflammatory biomarkers in depression: treatment with venlafaxine. *World Journal of Biological Psychiatry*, 2009; 10: 313 – 323.
- Porstmann T, Kiessig ST: Enzyme immunoassays techniques. An overview. *Journal of Immunological Methods*, 1992; 150: 5 – 21.
- Ramamoorthy S, Ramamoorthy JD, Prasad PD, Bhat GK, Mahesh VB, Leibach, FH, Ganapathy V: Regulation of the human serotonin transporter by interleukin-1beta. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1995; 216: 560 – 567.
- Rief W, Mills PJ, Ancoli-Israel S, Ziegler MG, Pung MA, Dimsdale JE: Overnight changes of immune parameters and catecholamines are associated with mood and stress. *Psychosomatic Medicine*, 2010; 72: 755 – 762.
- Rivera-Baltanas T, Olivares JM, Calado-Otero M, Kalynchuk LE, Martinez-Villamarin JR, Caruncho HJ: Serotonin transporter clustering in blood lymphocytes as a putative biomarker of therapeutic efficacy in major depressive disorder. *Journal of Affective Disorders*, 2012; 137: 46 – 55.
- Robert Koch Institut: Heft 51 Depressive Erkrankungen. Gesundheitsberichterstattung des Bundes, 2010.
- Romagnani S: Regulation of the T cell response. *Clinical and Experimental Allergy*, 2006; 36: 1357 – 1366.
- Roncarolo MG, Bacchetta R, Bordignon C, Narula S, Levings MK: Type 1 T regulatory cells. *Immunological Reviews*, 2001; 182: 68 – 79.
- Roncarolo MG, Gregori S, Battaglia M, Bacchetta R, Fleischhauer K, Levings MK: Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans. *Immunological Reviews*, 2006; 212: 28 – 50.

7. Literaturverzeichnis

- Rothermundt M, Arolt V, Fenker J, Gutbrodt H, Peters M, Kirchner H: Different immune patterns in melancholic and non-melancholic major depression . *European Archives of Psychiatry and Clinical Neurosciences*, 2001; 251: 90 – 97.
- Rudensky AY, Gavin M, Zheng Y: FOXP3 and NFAT: partners in tolerance. *Cell*, 2006; 126: 253 - 256.
- Rübenach SP: Todesursache Suizid. *Wirtschaft und Statistik*, 2007: 960–971.
- Sack U, Tárnok A, Rothe G: *Zelluläre Diagnostik. Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflusszytometrie*. Karger, 2007.
- Sakaguchi S, Powrie F: Emerging challenges in regulatory T cell function and biology. *Science*, 2007; 317: 627 – 629.
- Sakaguchi S, Sakaguchi M, Asano M, Itoh M, Toda M: Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor α -chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *Journal of Immunology*, 1995; 155: 1151 – 1164.
- Sakaguchi S, Sakaguchi N, Shimizu J, Yamazaki S, Sakihama T, Itoh M, Kuniyasu Y, Nomura T, Toda M, Takahashi T: Immunologic tolerance maintained by CD25+CD4+ regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance. *Immunological Review*, 2001; 182: 18 – 32.
- Sakaguchi S: Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nature Immunology*, 2005; 6: 345 – 352.
- Sakaguchi S: Regulatory T cells: key controllers of immunologic self-tolerance. *Cell*, 2000; 101: 455 – 458.

7. Literaturverzeichnis

- Sasayama D, Hattori K, Wakabayashi C, Teraishi T, Hori H, Ota M, Yoshida S, Arima K, Higuchi T, Amano N, Kunugi H: Increased cerebrospinal fluid interleukin-6 levels in patients with schizophrenia and those with major depressive disorder. *Journal of Psychiatric Research*, 2013; 47: 401 – 406.
- Schildkraut JJ: The catecholamine hypothesis of affective disorders: A review of supporting evidence. *American Journal of Psychiatry*, 1965; 122: 509 – 522.
- Schumann R, Adamaszek M, Sommer N, Kirkby KC: Stress, depression and antidepressant treatment options in patients suffering from multiple sclerosis. *Current Pharmaceutical Design*, 2012; 18: 5837 – 5845.
- Scott TF, Nussbaum P, McConnell H, Brill P: Measurement of treatment response to sertraline in depressed multiple sclerosis patients using the Carroll scale. *Journal of Neurology Research*, 1995; 17: 421 – 422.
- Schleifer S, Keller SE, Meyerson AT, Raskin MJ, Davis KL, Stein M: Lymphocyte function in major depressive disorder. *Archives of General Psychiatry*, 1984; 4: 484 – 486.
- Seddon B, Mason D: The third function of the thymus. *Immunology Today*, 2000; 21: 95 – 99.
- Seidel A, Arolt V, Hunstiger M, Rink L, Behnisch A, Kirchner H: Cytokine production and serum proteins in depression. *Scandinavian Journal of Immunology*, 1995; 41: 534 – 538.
- Seidel A, Arolt V, Hunstiger M, Rink L, Behnisch A, Kirchner H: Increased CD56+ natural killer cells and related cytokines in major depression. *Clinical Immunology and Immunopathology*, 1996; 78: 83 – 85.
- Seidel A, Rothermundt M, Rink L: Cytokine production in depressed patients. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1999; 461: 47 – 57.

7. Literaturverzeichnis

- Shalev I, Selzner N, Shyu W, Grant D, Levy G: Role of Regulatory T Cells in the Promotion of Transplant Tolerance. *Liver Transplantation*, 2012; 18 : 761 – 770.
- Shevach EM: CD4+CD25+ suppressor T cells: more questions than answers. *Nature Reviews Immunology*, 2002; 2: 389 – 400.
- Shih FF, Mandik-Nayak L, Wipke BL, Allen PM: Massive thymic deletion results in systemic autoimmunity through elimination of CD4+CD25+ T regulatory cells. *Journal of Experimental Medicine*, 2004; 199: 323 – 335.
- Simon GE, Fleck M, Lucas R, Bushnell DM, LIDO Group: Prevalence and predictors of depression treatment in an international primary care study. *American Journal of Psychiatry*, 2004; 161: 1626 – 1634.
- Simon NM, McNamara K, Chow CW, Maser RS, Papakostas GI, Pollack MH, Nierenberg AA, Fava M, Wong KK: A detailed examination of cytokine abnormalities in Major Depressive Disorder. *European Neuropsychopharmacology*, 2008; 18: 230 – 233
- Slaughter JR, Slaughter KA, Nichols D, Holmes SE, Martens MP: Prevalence, clinical manifestations, etiology, and treatment of depression in Parkinson' s disease. *Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences*, 2001; 13: 187 – 196.
- Sommershof A, Aichinger H, Engler H, Adenauer H, Catani C, Boneberg EM, Elbert T, Groettrup M, Kolassa IT: Substantial reduction of naïve and regulatory T cells following traumatic stress, 2009; 23: 1117 – 1124.
- Steinberg H, Himmerich H: Roland Kuhn – 100th birthday of an innovator of clinical psychopharmacology. *Psychopharmacology Bulletin*, 2012; 45: 48 – 50.
- Su S, Miller AH, Snieder H, Bremner JD, Ritchie J, Maisano C, Jones L, Murrah NV, Goldberg J, Vaccarino V: Common genetic contributions to depressive symptoms and inflammatory markers in middle-aged men: The Twins Heart Study. *Psychosomatic Medicine*, 2009; 71: 152 – 158.

7. Literaturverzeichnis

- Surget A, Wang Y, Leman S, Ibarguen-Vargas Y, Edgar N, Griebel G, Belzung C, Sibille E: Corticolimbic transcriptome changes are state-dependent and region-specific in a rodent model of depression and of antidepressant reversal. *Neuropsychopharmacology*, 2010; 34: 1363 – 1380.
- Suri-Payer E, Amar ZA, Thornton AM, Shevach EM: CD4⁺CD25⁺ T cells inhibit both the induction and effector function of autoreactive T cells and represent a unique lineage of immunoregulatory cells. *Journal of Immunology* 1998; 160, 1212 – 1218.
- Suri-Payer E, Fritzsching B: Regulatory T cells in experimental autoimmune disease. *Springer Seminar of Immunopathology*, 2006; 28: 3 – 16.
- Surridge D: An investigation into some psychiatric aspects of multiple sclerosis. *British Journal of Psychiatry*, 1969; 115: 749 – 764.
- Surtees PG, Barkley C: Future imperfect: the long-term outcome of depression. *British Journal of Psychiatry*, 1994; 164: 327 – 341.
- Tadić A, Rujescu D, Müller MJ, Kohlen R, Stassen HH, Szegedi A, Dahmen N: Association analysis between variants of the interleukin-1beta and the interleukin-1 receptor antagonist gene and antidepressant treatment response in major depression. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, 2008; 4: 269 – 276.
- Taler M, Gil-Ad I, Korob I, Weizman A: The immunomodulatory effect of the antidepressant sertraline in an experimental autoimmune encephalomyelitis mouse model of multiple sclerosis. *Neuroimmunomodulation*, 2011; 18: 117 – 122.
- Thomas AJ, Davis S, Morris C, Jackson E, Harrison R, O' Brien JT: Increase in interleukin-1beta in late-life depression. *American Journal of Psychiatry*, 2005; 162: 175 – 177.
- Tiemessen MM, Jagger AL, Evans HG, van Herwijnen MJ, John S, Taams LS: CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells induce alternative activation of human monocytes/macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007; 104: 19446 – 19451.

7. Literaturverzeichnis

- Tonelli LH, Stiller J, Rujescu D, Giegling I, Schneider B, Maurer K, Schnabel A, Möller HJ, Chen HH, Postolache TT: Elevated cytokine expression in the orbitofrontal cortex of victims of suicide. *Acta Psychiatrica Scandinavica*, 2008; 117: 198 – 206.
- Tsao CW, Lin YS, Chen CC, Bai CH, Wu SR: Cytokines and serotonin transporter in patients with major depression. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 2006; 30: 899-905.
- Tsai SJ: Glatiramer acetate could be a potential antidepressant through its neuroprotective and anti-inflammatory effects. *Medical Hypotheses*, 2007; 69: 145 – 148.
- Tyring S, Gottlieb A, Papp K, Gordon K, Leonardi C, Wang A, Lalla D, Woolley M, Jahreis A, Zitnik R, Cella D, Krishnan R: Etanercept and clinical outcomes, fatigue, and depression in psoriasis: Double-blind placebo-controlled randomised phase III trial. *Lancet*, 2006; 367: 29 – 35.
- Tzartos JS, Friese MA, Craner MJ, Palace J, Newcombe J, Esiri MM, Fugger L: Interleukin-17 production in central nervous system-infiltrating T Cells and glial cells is associated with active disease in multiple sclerosis. *American Journal of Pathology*, 2008; 172: 146 – 155.
- Valet G: Past and present concepts in flow cytometry: A European perspective. *Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents*, 2003; 17: 213 – 222.
- Vgontzas AN, Zoumakis E, Bixler EO, Lin HM, Follett H, Kales A, Chrousos GP: Adverse effects of modest sleep restriction on sleepiness, performance, and inflammatory cytokines. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 2004; 89: 2119 – 2126.
- Vignali DA, Collison LW, Workman CJ: How regulatory T cells work. *Nature Reviews Immunology*, 2008; 8: 523 – 532.
- Vollmar P, Nessler S, Kalluri SR, Hartung HP, Hemmer B: The antidepressant venlafaxine ameliorates murine experimental autoimmune encephalomyelitis by suppression of pro-

7. Literaturverzeichnis

- inflammatory cytokines. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, 2009; 12: 525 – 536.
- Vukmanovic-Stejić M, Zhang Y, Cook JE, Fletcher JM, McQuaid A, Masters JE, Rustin MH, Taams LS, Beverley PC, Macallan DC, Akbar AN: Human CD4⁺CD25^{hi}Foxp3⁺ regulatory T cells are derived by rapid turnover of memory populations in vivo. *Journal of Clinical Investigation*, 2006; 116: 2423 – 2433.
- Wahrens J, Gerlach J: Bromocriptine and imipramine in endogenous depression. A double-blind controlled trial in out-patients. *Journal of Affective Disorders*, 1981; 3: 193 – 202.
- Warner-Schmidt JL, Vanover KE, Chen EY, Marshall JJ, Greengard P: Antidepressant effects of selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs) are attenuated by antiinflammatory drugs in mice and humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011; 108: 9262 – 9267.
- Wang J, Ioan-Facsinay A, van der Voort EI, Huizinga TW, Toes RE: Transient expression of FOXP3 in human activated non regulatory CD4⁺ T cells. *European Journal of Immunology*, 2007; 37: 129 – 138.
- Watanabe N, Omori IM, Nakagawa A, Cipriani A, Barbui C, Churchill R, Furukawa TA: Mirtazapine versus other antidepressive agents for depression. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2011; CD006528.
- Watanabe N, Wang YH, Lee HK, Ito T, Wang YH, Cao W, Liu YJ: Hassall's corpuscles instruct dendritic cells to induce CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in human thymus. *Nature*, 2005; 436: 1181 – 1185.
- Weiner HL: Oral tolerance: immune mechanisms and the generation of Th3-type TGF- β -secreting regulatory cells. *Microbes and Infection*, 2001; 3: 947 – 954.
- Weschenfelder J, Sander C, Kluge M, Kirkby KC, Himmerich H: The influence of cytokines on wakefulness regulation: clinical relevance, mechanisms and methodological problems. *Psychiatria Danubina*, 2012; 24: 112 – 126.

7. Literaturverzeichnis

- Wildin RS, Freitas A: IPEX and FOXP3: clinical and research perspectives. *Journal of Autoimmunity*, 2005; 25: 56 – 62.
- Wildin RS, Smyk-Pearson S, Filipovich AH: Clinical and molecular features of the immunodysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X linked (IPEX) syndrome. *Journal of Medical Genetics*, 2002; 39: 537 – 545.
- Wittchen HU, Jacobi F: Size and burden of mental disorders in Europe, a critical review and appraisal of 27 studies. *European Neuropsychopharmacology*, 2005; 15: 357 – 376.
- Wittchen HU, Nelson B, Lachner G: Prevalence of mental disorders and psychosocial impairments in adolescents and young adults. *Psychological Medicine*, 1998; 28: 109 – 126.
- Wu Y, Borde M, Heissmeyer V, Feuerer M, Lapan AD, Stroud JC, Bates DL, Guo L, Han A, Ziegler SF, Mathis D, Benoist C, Chen L, Rao A.: FOXP3 controls regulatory T cell function through cooperation with NFAT. *Cell*, 2006; 126: 375 – 387.
- Wolfersdorf M: Depression und Suizid. *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz* 2008; 51: 443 – 450.
- World Federation for Mental Health: Depression: A Global Crisis. World Mental Health Day, 2012.
- Yang L, Zhang Z, Sun D, Xu Z, Zhang X, Li L: The serum interleukin-18 is a potential marker for development of post-stroke depression. *Journal of Neurology Research*, 2010; 32: 340 – 346.
- Yaqoob P, Newsholme EA, Calder PC: Comparison of cytokine production in cultures of whole human blood and purified mononuclear cells. *Cytokine*, 1999; 11: 600 – 605.

7. Literaturverzeichnis

- Yoshimura R, Hori H, Ikenouchi-Sugita A, Umene-Nakano W, Ueda N, Nakamura J: Higher plasma interleukin-6 (IL-6) level is associated with SSRI- or SNRI-refractory depression. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 2009; 33: 722 – 726.
- Zawatzky R, Hilfenhaus J, Marcucci F, Kirchner H: Experimental infection of inbred mice with herpes simplex virus type 1. Investigation of humoral and cellular immunity and of interferon induction. *Journal of Genetic Virology*, 1981; 53: 31 – 8.
- Zhu CB, Blakely RD, Hewlett WA: The proinflammatory cytokines interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha activate serotonin transporters. *Neuropsychopharmacology* 2006; 31: 2121 – 2131.
- Zis AP, Goodwin FK: Major affective disorder as a recurrent illness: a critical review. *Archives of General Psychiatry*, 1979; 36: 835 – 839.

8. Anlagen

Publikation Regulatory T cells increased while IL-1 β decreased during antidepressant therapy

Journal of Psychiatric Research 44 (2010) 1052–1057



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Psychiatric Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/psychiresRegulatory T cells increased while IL-1 β decreased during antidepressant therapyHubertus Himmerich^{a,c}, Saša Milenović^a, Stephany Fulda^d, Birgit Plümäkers^b, Abigail J. Sheldrick^a, Tanja M. Michel^a, Tilo Kircher^{a,e}, Lothar Rink^{b,*}^a Department of Psychiatry and Psychotherapy, Medical Faculty, RWTH Aachen University, Pauwelsstrasse 30, 52074 Aachen, Germany^b Institute of Immunology, Medical Faculty, RWTH Aachen University, Pauwelsstrasse 30, 52074 Aachen, Germany^c Clausen-Simon-Endowed Professorship for Neurobiology of Affective Disorders, Department of Psychiatry, University of Leipzig, Semmelweisstr. 10, 04103 Leipzig, Germany^d Max-Planck-Institute of Psychiatry, Kraepelinstrasse 10, 80804 Munich, Germany^e Department of Psychiatry and Psychotherapy, Medical Faculty, Philipps University, Rudolf-Bultmann-Straße 8, 35039 Marburg, Germany

ARTICLE INFO

Article history:

Received 15 January 2010

Received in revised form

6 March 2010

Accepted 12 March 2010

Keywords:

Regulatory T cells

IL-1beta

Depression

Antidepressants

ABSTRACT

Background: Regulatory T cells (Tregs, CD4⁺CD25^{hi}) are specialized in steering the immune response and cytokine release to maintain tolerance to self-antigens. As cytokines such as interleukin (IL)-1 β , IL-6 and interferon (IFN)- α have been shown to be involved in the pathophysiology of depression and cytokine levels have been shown to change during successful antidepressant treatment, we tested the involvement CD4⁺CD25^{hi} Tregs in these immunological processes during antidepressant therapy.

Methods: 16 patients suffering from a depressive episode were included into the study and treated with antidepressants according to their doctor's choice. Blood samples were collected during the first week after admission and after 6 weeks of treatment. Therein, we determined plasma levels of IL-1 β , and measured IL-1 β , IL-6 and IFN- α levels in the stimulated blood by performing a whole blood assay. We distinguished lymphocytes and identified CD4⁺CD25^{hi} Tregs by multiparameter flow cytometry. The psychopathological status was assessed using the Hamilton Depression Rating Scale (HAMD-21).

Results: HAMD-21 score, IL-1 β serum levels as well as LPS-stimulated IL-1 β and IL-6 production had decreased significantly at the end of treatment. In contrast, the amount of CD4⁺CD25^{hi} cells increased significantly from 2.74% \pm 0.88 (mean value \pm standard deviation) to 3.54% \pm 1.21; $p = 0.007$. No significant changes in virus-induced IFN- α production was observed.

Conclusions: The increase in CD4⁺CD25^{hi} Tregs during antidepressant therapy may be the reason for the decrease in cytokine production and the recovery from depression.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

In recent years, tremendous progress has been made in understanding a subpopulation of T cells: the T regulatory cells (Tregs). Tregs are specialized in suppressing the immune response so that tolerance to self-antigens can be maintained. They belong to a group of T cells expressing specific cell surface molecules denoted as cluster of differentiation (CD) 4 and CD25 which is abbreviated as CD4⁺CD25⁺. Due to their high expression of CD25, they are currently named CD4⁺CD25^{hi}. The immunomodulating effects of Tregs are mediated by membrane molecules and the modulation of cytokine expression (Liu and Leung, 2006).

A lack or defect of Tregs has been shown to be involved in a variety of autoimmune diseases and previous studies clearly show that reduced cell number or impaired function of Tregs is correlated with increased autoimmunity (Loser and Beissert, 2007). In turn,

Treg count increases in patients responding to pro-inflammatory cytokine antagonist therapy (Boissier et al., 2009). Evidence is emerging that a number of autoimmune diseases are also associated with high levels of interleukin (IL)-1 β or genetic predisposition to IL-1 β overproduction (Timms et al., 2004; Pascual et al., 2005; Maeda et al., 2005).

Pro-inflammatory cytokines such as interleukin IL-1 β are not only involved in the pathogenesis of inflammatory diseases. They are also involved in the pathophysiology of depression (Piletz et al., 2009; Konsman et al., 2008). Moreover, the so-called "cytokine hypothesis of depression" implies that an excessive secretion of certain cytokines represents a key factor in the propensity to precipitate depression in susceptible individuals (Maes, 2008). In accordance to this, elevated pro-inflammatory cytokine plasma levels such as IL-1 β and IL-6 have repeatedly been found in patients suffering from affective disorders (Himmerich et al., 2008; Seidel et al., 1995, 1999; Kubera et al., 2001; Brambilla et al., 2004; Simon et al., 2008; Diniz et al., 2010; Howren et al., 2009). Interferon (IFN)- α is a cytokine released in response to viral infection

* Corresponding author. Tel.: +49 241 80 80208; fax: +49 241 80 82613.
E-mail address: lrink@ukaachen.de (L. Rink).

which induces cellular release of IL-1 β and IL-6, into systemic circulation (Dantzer et al., 2008). In combination with ribavirin, IFN- α is the primary treatment for patients with chronic hepatitis C virus (HCV) infection. But while efficacious, a substantial portion of patients develops major depression during treatment (Capuron and Miller, 2004). Several studies have demonstrated elevations in peripheral levels of IL-6 among patients undergoing IFN- α therapy (Wichers et al., 2007). Therefore it is meaningful to measure IFN- α production while investigating changes in IL-1 β and IL-6 production during antidepressant therapy.

However, the changes of CD4⁺CD25^{hi} Tregs during antidepressant therapy have never been tested so far. We sought to investigate these changes during antidepressant therapy in patients with different degrees of depressive episodes and additionally determined *in vivo* concentrations of IL-1 β and the *in vitro* production of IL-1 β , IL-6 and IFN- α . Recently, Tregs have been shown to be decreased in the peripheral blood of patients suffering from major depression (Li et al., 2009). Therefore, we hypothesize that antidepressant therapy may increase Tregs and correct this immunological feature of depressed patients.

2. Methods

2.1. Subjects

$N = 16$ (5 males, 11 females) consecutive referrals to the department of psychiatry and psychotherapy of the Medical School of the RWTH Aachen University suffering from a depressive episode were included into the study. Mean age was 42 ± 8.2 years (mean \pm SD years). Initially, 19 patients were included, but 2 patients refused standardized psychopathological examination and 1 patient was excluded because of not being depressed according to the initial study examination.

After a complete description of the study, all patients gave written informed consent to participate in the investigation, which had been approved by an independent ethics committee (Ethics Committee of the Medical Faculty, RWTH Aachen University, Germany; EK002/08). All patients included in the study suffered from a depressive episode at the time of admission to the hospital, the day clinic or the outpatients unit. Individual diagnosis according to ICD-10 criteria varied within the range of affective spectrum disorders (F31, F32, F33). Substance dependence and severe medical conditions that might be related to depressive symptoms such as endocrine disorders or dementia precluded study enrolment. Physical examination, medical history and baseline laboratory investigations did not reveal any acute or chronic inflammation or infection. Autoimmune, cardiac, pulmonary, endocrine and haematological diseases were also ruled out. The study followed a naturalistic design, i.e. patients were treated with different kinds of antidepressant drugs according to their doctor's choice. The individual dose was adjusted according to clinical judgment and plasma levels.

2.2. Procedure

Blood samples were collected during the first week after admission and after 6 weeks of treatment. Patients' psychopathology was assessed using the Hamilton Depression Rating Scale (HAMD) (Hamilton, 1960) as well as the Beck Depression Inventory (BDI) (Beck et al., 1961) on the same day. HAMD-21 at week 1 was 16.87 ± 6.16 ; range: 8–28.

Within the blood, we determined plasma levels of IL-1 β . Additionally, a whole blood assay was performed in the blood samples as described previously (Kirchner et al., 1982; Seidel et al., 1996). Blood was cultured in a whole blood assay within 1–2 h after blood

collection. Test tubes (5 ml, Greiner, Nürtingen, Germany) were filled with 900 μ l RPMI 1640 medium supplemented with L-glutamine (2 mM) and penicillin/streptomycin (100 U/100 μ g/ml) (Cambrex, Verviers, Belgium). Subsequently, 100 μ l of blood was introduced into each tube. For induction of IL-1 β and IL-6 production we used endotoxin (LPS, Sigma-Aldrich, Munich, Germany; 250 ng/ml) and for induction of IFN- α production we used Newcastle Disease Virus (NDV, kindly provided by Prof. R. Zawatzky, German Cancer Research Centre, Heidelberg; 80 haemagglutinating units (HAU) per ml). All tubes were covered and samples were incubated in an atmosphere of 5% CO₂ and 37 °C for 24 h. Cell-free supernatants were harvested after incubation and stored at -70 °C. For quantification of IL-1 β , IL-6 and IFN- α , antibody pairs (BD Bioscience) were used to analyze supernatants. Results were measured with a Magellan-EUSA plate reader (Tecan, Crailsheim, Germany). The detection limits of IL-1 β , IL-6 and IFN- α were at 3.9 pg/ml, 4.6 pg/ml and 7.9 pg/ml respectively.

We used a multiparameter flow cytometry (FACS Calibur, BD Bioscience, Heidelberg, Germany) to distinguish lymphocytes and to identify CD4⁺CD25⁺ cells and CD4⁺CD25^{hi} Tregs. The expression was detected by the monoclonal antibodies anti-CD4-FITC and anti-CD25PE (BD Bioscience). The different cell fractions could be distinguished via two-dimensional plots of forward and side scatter. Tregs were identified by gating on CD4⁺CD25^{hi}. For details and for an example of multiparameter flow cytometry, see Fig. 1.

2.3. Statistics

Lillefors test of normality (Dallal and Wilkinson, 1986) indicated no significant deviation from the normality assumption for CD4⁺CD25⁺ and CD4⁺CD25^{hi} cells at the beginning and end of treatment (all $p > 0.35$). To test for differences in CD4⁺CD25⁺ and CD4⁺CD25^{hi} as well as to control for overall alpha-level, a multivariate repeated measures ANOVA with the within-factor beginning vs. end of treatment and two outcome measures (CD4⁺CD25⁺ and CD4⁺CD25^{hi}) was computed. Only in the case of a significant overall multivariate F-test, univariate analyses followed. In addition, to explore potential determinants of the observed changes, correlations and t-tests for difference scores and percentages were computed with gender, age, severity of illness, magnitude of improvement or specific medications as exploratory variables. For these latter analyses, an uncorrected p -value of less than 0.05 was considered significant. Differences between beginning and end of treatment in stimulated IL-1, IL-6 and IFN- α levels and lymphocyte fraction were tested with the non-parametric Wilcoxon-test because of non-normality in some parameters. All analyses were undertaken with SPSS 16.0 and R (R Development Core Team, 2008).

3. Results

At the end of treatment, HAMD-21 had improved from an initial mean score of 16.87 ± 6.16 to 7.69 ± 6.04 . In 15 of the 16, HAMD-21 scores were lower at the end of treatment, while in one subject HAMD-21 scores had increased from 15 to 16. On average, scores were reduced by 9.2 ± 6.0 points or $55\% \pm 8$.

At the beginning of the treatment, IL-1 β levels in serum were below the detection limit in 10 of the 16 patients, while at the end of treatment all 16 patients had undetectable levels of IL-1 β ; this difference in frequencies was statistically significant (Fisher's exact test; $p = 0.018$). In the 6 patients that had measurable levels at baseline, these varied between 7.12 pg/ml and 60.87 pg/ml (mean: 31.29). In all six patients, IL-1 β levels were no longer detectable at the end of treatment. The six patients with detectable IL-1 β levels at baseline did not differ from the 11 other patients in depression

8. Anlagen

1054

H. Himmerich et al. / Journal of Psychiatric Research 44 (2010) 1052–1057

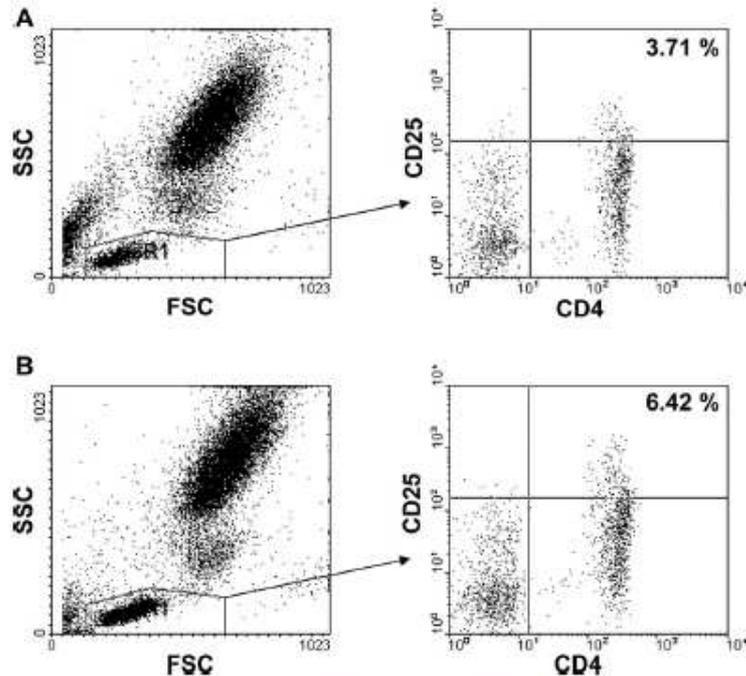


Fig. 1 Example of multiparameter flow cytometry to identify CD4⁺CD25^{hi} Tregs in a patient at the beginning (A) and at the end of antidepressant treatment (B). Different cell fractions could be distinguished in a two-dimension plot (left part of Fig. 1) of forward scatter (FSC; proportional to cell size) and side scatter (SSC; proportional to cellular granularity): lymphocytes (framed, R1), monocytes (right above the lymphocytes in gate R1) and granulocytes (big point cloud right upper quadrant). Gating on CD4⁺CD25^{hi} Tregs were identified (right upper quadrant) as shown in the right part of the figure. At the beginning of antidepressant therapy, this patient's proportion of CD4⁺CD25^{hi} Tregs amounted to 3.71%. At the end of antidepressant therapy, this proportion amounted to 6.42%.

severity, baseline levels or magnitude of changes in CD4⁺CD25⁺ and CD4⁺CD25^{hi} proportions. Stimulated IL-1 β levels were significantly lower at the end of treatment (median [interquartile range (IQR)]: 896.00 pg/ml [414.25–1824.25] vs. 684.00 pg/ml [321.25–1733.75]). Stimulated IL-1 β levels did not correlate with age, lymphocyte fraction or the HAMD score (spearman's rho, $p > 0.10$). There was a positive association between stimulated IL-1 β levels and BDI scores at baseline (rho 0.52, $p = 0.039$) and at the end of treatment (rho 0.50, $p = 0.047$). In addition, the baseline to

end of treatment differences of IL-1 β correlated with differences in the BDI scores (rho 0.59, $p = 0.015$).

Stimulated IL-6 levels were significantly lower at the end of treatment, too (median [IQR]: 6411.50 pg/ml [4177.00–7651.00] vs. 5297.50 pg/ml [3516.00–7015.00]).

However, stimulated IFN- α levels did not differ between beginning and end of treatment (median [IQR]: 441.00 pg/ml [176.00–1152.75] vs. 224.50 pg/ml [8.00–494.25]). All changes in cytokine production are summarized in Table 1.

Table 1

Changes in depression severity, cytokine levels and proportion of CD4⁺CD25⁺ and CD4⁺CD25^{hi} cells ($n = 16$).

	Begin of treatment	End of treatment	Test statistic, p
	Mean \pm SD (range)	Mean \pm SD (range)	
HAMD-21	16.87 \pm 6.16 (8–28)	7.69 \pm 6.04 (0–17)	$t(15) = 6.1$, $p < 0.001$
IL-1 β serum level below detection limit	$n = 10$ (62.5%)	$n = 16$ (100%)	Fisher's exact test: $p = 0.018$
IL-1 β induced levels	1141.62 pg/ml \pm 850.53	947.94 pg/ml \pm 685.72	$Z = -1.965$, $p = 0.049$
IL-6 induced levels	6439.88 pg/ml \pm 3259.18	5490.88 pg/ml \pm 2425.69	$Z = -2.068$, $p = 0.039$
IFN- α induced levels	668.44 pg/ml \pm 659.31	357.38 pg/ml \pm 435.42	$Z = -1.590$, $p = 0.112$
Lymphocyte fraction	22.41% \pm 8.58	23.74% \pm 7.84	$Z = -0.517$, $p = 0.605$
Overall change in CD4 ⁺ CD25 ⁺ and CD4 ⁺ CD25 ^{hi} cells			$F(2,14) = 7.5$, $p = 0.006$
CD4 ⁺ CD25 ⁺	29.61% \pm 7.14	31.95% \pm 7.61	$F(1,15) = 14.5$, $p = 0.002$
CD4 ⁺ CD25 ^{hi}	2.74% \pm 0.88	3.54% \pm 1.21	$F(1,15) = 9.8$, $p = 0.007$

The multivariate F-test revealed a significant overall change in CD4⁺CD25⁺ and CD4⁺CD25^{hi} cells between the beginning and end of treatment ($p < 0.05$). The subsequent univariate comparisons revealed that the proportion of CD4⁺CD25⁺ and CD4⁺CD25^{hi} cells had increased at the end of treatment (see Table 1). Average increases were $2.33\% \pm 2.45$ for CD4⁺CD25⁺ and $0.81\% \pm 1.03$ for CD4⁺CD25^{hi}. Translated into percentage change from baseline values, the increases were 8% for CD4 and 36% for CD4⁺CD25^{hi}. There was no change in lymphocyte fraction (median [IQR]: 21.03% [16.32–27.90] vs. 24.28% [16.75–28.79]).

Neither age nor absolute or relative change in HAMD-21 scores correlated significantly with baseline proportions or relative changes of CD4⁺CD25⁺ and CD4⁺CD25^{hi}. However, depression severity at the beginning of therapy correlated significantly with absolute increases in CD4⁺CD25^{hi} levels ($r = 0.635$, $p = 0.008$). Accordingly, we found that patients with moderate to severe depression (HAMD-1 scores > 21 , $n = 5$) did not differ from those with milder depressive symptoms (HAMD-1 scores < 22 , $n = 11$) in baseline levels of CD4⁺CD25⁺ or CD4⁺CD25^{hi} proportions but that the increase in CD4⁺CD25^{hi} levels ($0.41\% \pm 0.85$ vs. $1.67\% \pm 0.89$; $t(14) = 2.7$, $p = 0.02$) at the end of therapy was significantly larger for the more severely depressed subjects (see Fig. 2).

In addition, explorative analyses revealed no difference between males and females. There was also no association between the absolute or relative change in CD4⁺CD25⁺ or CD4⁺CD25^{hi} cells and treatment with mirtazapine ($n = 5$), SSRIs ($n = 8$), citalopram or escitalopram ($n = 5$), venlafaxine ($n = 7$) or quetiapine ($n = 8$) (t -tests, all $p > 0.05$).

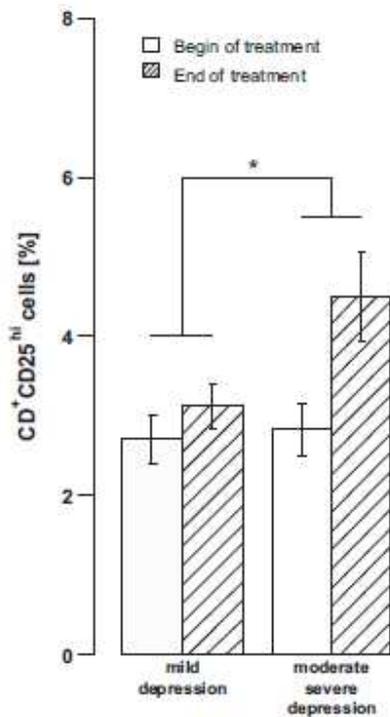


Fig. 2. CD4⁺CD25^{hi} cells [%] at the beginning and end of treatment in subjects with milder depression (HAMD-21 < 22 , $n = 11$) and with moderate to severe depression (HAMD-21 > 21 , $n = 5$). The asterisks refer to significant differences in the magnitude of the increase of CD4⁺CD25^{hi} cells between the two groups.

4. Discussion

In this study, we could show that antidepressant treatment reduces serum levels of IL-1 β , stimulated *in vitro* production of IL-1 β and IL-6, and the changes of stimulated IL-1 β production correlated with changes in the BDI score. These results are in concordance with previous studies showing that successful antidepressant therapy reduces pro-inflammatory cytokine production *in vivo* and *in vitro* (Kubera et al., 2001; Piletz et al., 2009; Seidel et al., 1995; Basterzi et al., 2005). Therefore, our study provides further evidence for the hypothesis that antidepressants counteract the mechanisms by which cytokines lead to depression.

An increased production of IL-1 β has been observed in culture supernatant of mitogen-stimulated splenocytes in the mild, chronic stress rat and mouse models of depression, and IL-1 β given to animals and humans has been shown to produce behavioral alterations and symptoms similar to those observed in major depression, such as anhedonia, anorexia, weight loss, social withdrawal, psychomotor retardation, anergy, irritability, and sleep disturbances (Kubera et al., 2001). IL-1 β plasma levels have been found to be elevated in depressed children (Brambilla et al., 2004), depressed adults (Simon et al., 2008) and geriatric depressed patients (Diniz et al., 2010). Also elevated mRNA levels of IL-1 β could be shown in patients suffering from depression (Tsao et al., 2006). And the response to antidepressant therapy seems to be influenced by IL-1 β gene variants (Tadić et al., 2008; Baune et al., 2010). As IL-1 β is thought to be a contributing factor to major depression, and as the IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra) blocks the stress-like effects of IL-1 β in both cellular and behavioral models, the IL-1Ra has been proposed to be a new candidate for the treatment of depression (Koo and Duman, 2009).

An increased IL-6 production has also been reported to be positively associated with major depression (Howren et al., 2009), and a decrease of IL-6 production during antidepressant treatment has been found (Basterzi et al., 2005). Three different mechanisms might link the activation of the cytokine system to the pathophysiology of depression: First, pro-inflammatory cytokines might activate neuronal serotonin transporters and may therefore have the opposite effect of selective serotonin reuptake inhibitors. Specifically IL-1 β has been shown to up-regulate hippocampal expression of the serotonin transporter (Ramamoorthy et al., 1995) and to activate neuronal serotonin transporters (Zhu et al., 2006) in previous studies. Second, immune activation with increased production of pro-inflammatory cytokines activates the tryptophan- and serotonin-degrading enzyme indoleamine-2,3-dioxygenase (IDO). The increased consumption of serotonin and its precursor tryptophan leads to a reduced availability of serotonin due to activation of IDO. Third, it has been postulated that the activation of the pro-inflammatory cytokine system might play a causative role in the depression-related activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) system (Himmerich et al., 2009). Moreover, several data from *ex-vivo* studies suggest that antidepressants suppress pro-inflammatory cytokine production; it was hypothesized that this suppression may result in an improvement of depressive symptoms (Kenis and Maes, 2002).

However, although the median value of stimulated IFN- α production decreased, this change did not reach statistical significance, maybe due to the restricted sample size of 16 patients.

The completely novel finding of this investigation is that CD4⁺CD25⁺ and CD4⁺CD25^{hi} cells increased significantly during antidepressant treatment, although the lymphocyte fraction remained constant. The more severely depressed the patients were at baseline, the more their CD4⁺CD25^{hi} proportions increased. This parallels autoimmune diseases, in which cytokines also play a significant role. Treg counts do increase in those patients profiting from anti-inflammatory therapy (Boissier et al., 2009).

Tregs are potent suppressors of both the adaptive and the innate immune system. Tregs, for example, steer monocyte differentiation toward alternatively activated macrophages (AAM). AAM are cells with strong anti-inflammatory potential, and it could be shown that after co-culture with Tregs, monocytes display typical features of AAM, including a strongly reduced capacity to produce IL-1 β and IL-6. (Tiemessen et al., 2007). Therefore, up-regulation of Tregs due to antidepressant treatment might provide an explanation why antidepressants reduce pro-inflammatory cytokine production. On the other hand, up-regulation of Tregs might be a consequence of downregulation of IL-1 β during antidepressant treatment, because the conversion of Treg into pro-inflammatory T helper (TH)-17 cells can be induced by IL-1 β (Deknuydt et al., 2009). In our study we investigated CD4⁺CD25^{hi} Tregs only since controversial findings have been published concerning murine and human CD4⁺CD25^{hi} T cells. The transcription factor Foxp3 for example has been detected to be highly necessary for regulatory T cells in mice, while there are divergent findings concerning human CD4⁺CD25^{hi} T cells, since it has been reported by Morgan et al. (Morgan et al., 2005) that this transcription factor is also expressed in other T cells. The problem with Foxp3 in human studies was further highlighted by Horwitz (Horwitz, 2010) showing divergent effects by divergent staining techniques. However, the CD4⁺CD25^{hi} population is still accepted as being of regulatory function only. Therefore, we investigated CD4⁺CD25^{hi} T cells in our study without quantification of Foxp3. However, this discrimination may be of further interest as already introduced by Miller (Miller, 2010), as discussed below.

Tregs express tyrosine hydroxylase, the rate-limiting enzyme in the synthesis of catecholamines. They both contain and are responsive to dopamine (Cosentino et al., 2007) and their expression varies during stress and cortisol release (Höglund et al., 2006).

Our findings of an increase in Tregs during successful antidepressant therapy are in line to the finding of Li et al. (2009) who found decreased Tregs during an acute episode of major depression and to the findings of Sommershof et al. (2009) who found decreased Tregs in patients suffering from posttraumatic stress disorder (PTSD). However, Miller (Miller, 2010) hypothesized that Tregs may contribute to the severity of depression through downregulation of chronic inflammatory responses. But Miller also mentioned that Tregs may have negative effects and that the balance of T cell populations may be important. Since these mechanisms are complex and involve regulatory and counter-regulatory processes on the level of extra- and intracellular, membrane, receptor, DNA and RNA processes, one should not jump to far reaching conclusions.

The difference in patients with mild or severe depression provides evidence for the consistency of our findings. Nevertheless, our study is an explorative naturalistic study. We calculated possible effects of specific antidepressants but did not find any significant influence. Nevertheless, specific effects of different antidepressants can not be excluded due to the low number of treated patients. The reported results – as nearly every new scientific finding – bring up more questions than they answer, whether increased Treg count is the reason for or a consequence of decreased cytokine levels during antidepressant treatment, whether changes in the Treg systems are linked to depression, to antidepressants or to the consequences of both. Nevertheless, Tregs have been shown to significantly contribute to immune response and to autoimmunity and therefore play a crucial role within the immune system. Tregs have not been investigated during antidepressant treatment so far. Therefore, this study provides a first exploratory step in exploring the involvement of Tregs in depression and its therapy and may be a causative for the dysregulated cytokine production in depression.

Conflict of interest

Prof. Himmerich declares research support in terms of chemical substances from the Wyeth Pharma GmbH, Novartis and AstraZeneca, and lecture fees from Servier.

Prof. Kircher declares fees for educational programmes from Janssen-Cilag, Eli Lilly, Servier, Lundbeck, Bristol Myers Squibb, Pfizer, AstraZeneca, Glaxo, travel support/sponsorship for congresses from Servier, speaker's honoraria from Janssen-Cilag and research grants from Pfizer, Lundbeck and AstraZeneca.

Dr. Milenović, Ms Fulda, Ms Plümäkers, Dr. Sheldrick, Dr. Michel, and Prof. Rink reported no biomedical financial interests or potential conflicts of interest.

Funding source

The authors thank Prof. Dr. Dr. Frank Schneider, head of the department of psychiatry and psychotherapy, RWTH Aachen University, for the support of the study. The study was also supported by an unrestricted grant from AstraZeneca and by the Clausen-Simon-Foundation. The mentioned sponsors did not have any influence on the study design, the collection, analysis and interpretation of data, the writing of the report, and in the decision to submit the paper for publication.

References

- Basterzi AD, Aydemir C, Kisa C, Aksaray S, Tuzer V, Yazici K, et al. IL-6 levels decrease with SSRI treatment in patients with major depression. *Human Psychopharmacology* 2005;20:473–6.
- Baune BT, Dannlowski U, Domschke K, Janssen DG, Jordan MA, Ohrmann P, et al. The interleukin 1 beta (IL1B) gene is associated with failure to achieve remission and impaired emotion processing in major depression. *Biological Psychiatry* 2010;67:543–9.
- Beck AT, Ward CH, Mendelson M, Mock J, Erbaugh J. An inventory for measuring depression. *Archives of General Psychiatry* 1961;4:561–71.
- Boissier MC, Assier E, Biton J, Demps A, Falgarone G, Bessis N. Regulatory T cells (Treg) in rheumatoid arthritis. *Joint, Bone, Spine: Revue du Rhumatisme* 2009;76:10–4.
- Brambilla F, Monteleone P, Maj M. Interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha in children with major depressive disorder or dysthymia. *Journal of Affective Disorders* 2004;78:273–7.
- Capuron L, Miller AH. Cytokines and psychopathology: lessons from interferon-alpha. *Biological Psychiatry* 2004;56:819–24.
- Cosentino M, Pietta AM, Ferrari M, Rasini E, Bombelli R, Carcano E, et al. Human CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells selectively express tyrosine hydroxylase and contain endogenous catecholamines subserving an autocrine/paracrine inhibitory functional loop. *Blood* 2007;109:632–42.
- Dallal GE, Wilkinson L. An analytic approximation to the distribution of Lilliefors' test for normality. *The American Statistician* 1988;40:294–6.
- Dantzer R, O'Connor JC, Freund GG, Johnson RW, Kelley KW. From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. *Nature Reviews Neuroscience* 2008;9:546–56.
- Deknuydt F, Biolley G, Valmori D, Ayyoub M. IL-1beta and IL-2 convert human Treg into TH17 cells. *Clinical Immunology* 2009;131:298–307.
- Diniz BS, Teixeira AL, Talib L, Gattaz WF, Forlerza OV. Interleukin-1beta serum levels is increased in antidepressant-free elderly depressed patients. *The American Journal of Geriatric Psychiatry* 2010;18:172–6.
- Hamilton M. A rating scale for depression. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry* 1960;23:56–62.
- Himmerich H, Berthold-Loseleben M, Pollmächer T. The relevance of the TNF- α system in psychiatric disorders. *Fortschritte der Neurologie-Psychiatrie* 2009;77:334–45.
- Himmerich H, Fulda S, Linseisen J, Seiler H, Wolfram G, Himmerich S, et al. Depression, comorbidities and the TNF-alpha system. *European Psychiatry* 2008;23:421–9.
- Höglund CO, Acén J, Kemi C, Jermelöv S, Grunewald J, Müller-Suur C, et al. Changes in immune regulation in response to examination stress in atopic and healthy individuals. *Clinical and Experimental Allergy* 2006;36:982–92.
- Horwitz DA. Identity of mysterious CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ cells in S.E. Arthritis Research Therapy 2010;12:101.
- Howren MB, Lamkin DM, Suls J. Associations of depression with C-reactive protein, IL-1, and IL-6: a meta-analysis. *Psychosomatic Medicine* 2009;71:171–86.
- Kenis G, Maes M. Effects of antidepressants on the production of cytokines. *The International Journal of Neuropsychopharmacology* 2002;5:401–12.
- Kirchner H, Kleinschke C, Digel W. A whole-blood technique for testing production of human interferon by leukocytes. *Journal of Immunological Methods* 1982;48:213–9.

8. Anlagen

- Konstman JP, Veeneman J, Combe C, Poole S, Lueheshi GN, Dantzer R. Central nervous action of interleukin-1 mediates activation of limbic structures and behavioural depression in response to peripheral administration of bacterial lipopolysaccharide. *The European Journal of Neuroscience* 2008;28:2499–510.
- Koo JW, Duman RS. Evidence for IL-1 receptor blockade as a therapeutic strategy for the treatment of depression. *Current Opinion in Investigational Drugs* 2009;10:664–71.
- Kubera M, Lin AH, Kenis G, Bosmans E, van Bockstaele D, Maes M. Anti-inflammatory effects of antidepressants through suppression of the interferon-gamma/interleukin-10 production ratio. *Journal of Clinical Psychopharmacology* 2001;21:199–206.
- Li Y, Xiao B, Qiu W, Yang L, Hu B, Tian X, et al. Altered expression of CD4(+)/CD25(+) regulatory T cells and its 5-HT(1a) receptor in patients with major depression disorder. *Journal of Affective Disorders*; 2009. Epub.
- Liu H, Leung BP. CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in health and disease. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 2006;33:519–24.
- Loser K, Beissert S. Dendritic cells and T cells in the regulation of cutaneous immunity. *Advances in Dermatology* 2007;23:307–33.
- Maeda S, Hsu LC, Liu H, Bankston LA, Imura M, Kagnoff ME, et al. Nod2 mutation in Crohn's disease potentiates NF- κ B activity and IL-1 processing. *Science* 2005;307:734–8.
- Maes M. The cytokine hypothesis of depression: inflammation, oxidative & nitrosative stress (IO&NS) and leaky gut as new targets for adjunctive treatments in depression. *Neuro Endocrinology Letters* 2008;29:287–91.
- Miller AH. Depression and immunity: a role for T cells? *Brain, Behavior, and Immunity* 2010;24:1–8.
- Morgan ME, van Bilsen JH, Bakker AM, Heemskerk R, Schilham MW, Hartgers FC, et al. Expression of Foxp3 mRNA is not confined to CD4⁺CD25⁺ T regulatory cells in humans. *Human Immunology* 2005;66:13–20.
- Pascual V, Allantaz F, Arce I, Pinero M, Banchereau J. Role of interleukin-1 (IL-1) in the pathogenesis of systemic onset juvenile idiopathic arthritis and clinical response to IL-1 blockade. *The Journal of Experimental Medicine* 2005;201:1479–86.
- Piletz JE, Halaris A, Iqbal O, Hoppens-Isaacs D, Fareed J, Zhu H, et al. Pro-inflammatory biomarkers in depression: treatment with venlafaxine. *World Journal of Biological Psychiatry* 2009;10:313–23.
- Ramamoorthy S, Ramamoorthy JD, Prasad PD, Bhat GK, Mahesh VB, Leibach FH, et al. Regulation of the human serotonin transporter by interleukin-1 beta. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1995;216:560–7.
- R Development Core Team. R: a language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing. ISBN 3-900051-07-0; 2008. <http://www.R-project.org/>; 2008.
- Seidel A, Arolt V, Hunstiger M, Rink L, Belmisch A, Kirchner H. Cytokine production and serum proteins in depression. *Scandinavian Journal of Immunology* 1995;41:534–8.
- Seidel A, Arolt V, Hunstiger M, Rink L, Belmisch A, Kirchner H. Increased CD56⁺ natural killer cells and related cytokines in major depression. *Clinical Immunology and Immunopathology* 1996;78:33–5.
- Seidel A, Rothermundt M, Rink L. Cytokine production in depressed patients. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 1999;461:47–57.
- Simon NM, McNamara K, Chow CW, Maser RS, Papakostas GI, Pollack MH, et al. A detailed examination of cytokine abnormalities in major depressive disorder. *European Neuropsychopharmacology* 2008;18:230–3.
- Sommershof A, Aichinger H, Engler H, Adenauer H, Catani C, Boneberg EM, et al. Substantial reduction of naive and regulatory T cells following traumatic stress. *Brain, Behavior, and Immunity* 2009;23:1117–24.
- Tadić A, Rujescu D, Müller MJ, Kolmen R, Stassen HH, Szegedi A, et al. Association analysis between variants of the interleukin-1beta and the interleukin-1 receptor antagonist gene and antidepressant treatment response in major depression. *Neuropsychiatric Disease and Treatment* 2008;4:269–76.
- Tiemessen MM, Jagger AL, Evans HG, van Herwijnen MJ, John S, Taams LS. CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells induce alternative activation of human monocytes/macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2007;104:19446–51.
- Timms AE, Crane AM, Sims AM, Cordell HJ, Bradbury LA, Abbott A, et al. The interleukin 1 gene cluster contains a major susceptibility locus for ankylosing spondylitis. *American Journal of Human Genetics* 2004;75:587–95.
- Tsao CW, Lin YS, Chen CC, Bai CH, Wu SR. Cytokines and serotonin transporter in patients with major depression. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* 2006;30:899–905.
- Wichers MC, Kenis G, Koek GH, Robbaeys G, Nicolson NA, Maes M. Interferon-alpha-induced depressive symptoms are related to changes in the cytokine network but not to cortisol. *Journal of Psychosomatic Research* 2007;62:207–14.
- Zhu CB, Blakely RD, Hewlett WA. The proinflammatory cytokines interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha activate serotonin transporters. *Neuropsychopharmacology* 2006;31:2121–31.

9. Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren.

.....

Datum

.....

Unterschrift

10. Lebenslauf und wissenschaftlicher Werdegang

10.1 Lebenslauf

Name und Vorname: Milenović, Saša

Geburtsdatum: 28.08.1976

Geburtsort: Meerbusch

Derzeitige Position: Assistenzarzt für Neurologie

Neurologische Klinik St. Franziskus-Krankenhaus der Maria-Hilf-Kliniken GmbH Mönchengladbach

Ausbildung:

- 12/2011 Anerkennung zum Facharzt für Psychiatrie und Psychotherapie bei der Ärztekammer Nordrhein
- seit 09/2011 Assistenzarzt für Neurologie im St. Franziskus-Krankenhaus der Maria-Hilf-Kliniken Mönchengladbach
- 09/2010 bis 08/2011 Assistenzarzt für Neurologie des Medizinischen Zentrums für Neurologie Bardenberg-Würselen
- 10/2007 bis 09/2010 Assistenzarzt für Psychiatrie und Psychotherapie und wissenschaftlicher Mitarbeiter der Universitätsklinik Aachen
- 02/2006 bis 09/2007 Assistenzarzt für Psychiatrie und Psychotherapie der LWL-Klinik Gütersloh
- 12/2004 bis 08/2005 Wehrdienst in Serbien
- 12/2003 Erfolgreicher Abschluss des Humanmedizinstudiums an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
- 08/2002 Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung in Düsseldorf
- 09/1999 Ärztliche Vorprüfung in Düsseldorf
- 10/1996 Immatrikulation an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf zum Humanmedizin-Studium
- 05/1996 Abitur

10. Lebenslauf und wissenschaftlicher Werdegang

10.2 Publikationen

Himmerich H, Milenović S, Fulda S, Plümäkers B, Sheldrick AJ, Michel TM, Kircher T, Rink L: Regulatory T cells increased while IL-1 β decreased during antidepressant therapy. *Journal of Psychiatric Research* 2010; 44: 1052 – 1057.

Milenović S, Himmerich H: Antipsychotikum bei schwer behandelbarer Depression: Remission und Response werden wahrscheinlicher (Journal Screen). *InFo Neurologie Psychiatrie*, 2009; 11: 30 – 31.

11. Danksagung

За Одскочну Даску Мојим Родитељима од Срца Велика Хвала...

Mein Dank richtet sich in erster Linie an meinen Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Hubertus Himmerich. Ohne Ihn wäre diese Promotionsarbeit nicht zustande gekommen. Die Art und Weise seiner Betreuung ist einzigartig, insbesondere seine pragmatisch-konstruktive und geduldige Herangehensweise führten mich zu meinem langersehntem Ziel. In diesem Zusammenhang danke ich auch der Claussen-Simon-Stiftung und der Klinik und Poliklinik für Psychiatrie und Psychotherapie der Universität Leipzig mit ihrem Direktor, Prof. Dr. Ulrich Hegerl, die die Professur von Prof. Himmerich förderten und somit meine Promotion ermöglichten.

Ein weiterer besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Rink und seinen Mitarbeitern des Instituts für Immunologie der Universitätsklinik Aachen, insbesondere Frau Plümäkers, die für die fachkompetente Bearbeitung der Blutproben verantwortlich war. An dieser Stelle möchte ich meinen weiteren Dank an all diejenigen richten, die mich bei der Durchführung der HipMood-Studie unterstützten, in deren Rahmen die hier beschriebene Untersuchung stattfand. In dieser Hinsicht danke ich v. a. Herrn Prof. Dr. Kircher und Herrn Prof. Dr. Dr. Schneider sowie der Firma Astra Zeneca, die diese Studie mitfinanzierte.

Mein ganz persönlicher Dank gilt meinen Eltern, die dafür sorgten, dass ich den ärztlichen Beruf heute ausüben kann. Ihnen widme ich diese Dissertation. Meiner lieben Frau sowie meinem süßen „Mogli 1“, aber auch „Mogli 2“ in spe, schulde ich sehr viel verlorene gemeinsame Zeit als Ehemann und Vater. Danke für die Geduld, Liebe und die jahrelange Unterstützung!