

**Molekulare, biochemische und klinische
Untersuchungen zu Chronischer
Prostatitis/Chronischem
Beckenschmerzsyndrom in Hinblick auf
Schmerz und Fertilität**

**Inauguraldissertation zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Medizin des Fachbereiches Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen**

Vorgelegt von Marc Philipp Manthey

Gießen 2024

Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

**Andrologisch-Urologisches Forschungslabor
Arbeitsgemeinschaft Epigenetik des Urogenitalsystems
Biomedizinisches Forschungszentrum Seltersberg**

Klinik und Poliklinik für Urologie, Kinderurologie und Andrologie

Gutachter: Frau Prof. Dr. Undraga Schagdarsurengin

Gutachter: Herr Prof. Dr. Andreas Meinhardt

Tag der Disputation: 01.10.2024

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-----------|
| 1. Einleitung | 1 |
| 1.1 Prävalenz und Klassifikation der Prostatitis-Syndrome | 1 |
| 1.2 Symptomatik und Quantifizierung der Beschwerden bei CP/CPPS | 3 |
| 1.3 Phänotypisierung und multimodale Therapie nach UPOINT(S)..... | 4 |
| 1.4 Ätiologie und Komorbiditäten des Chronischen Beckenschmerzsyndroms..... | 5 |
| 1.5 Subfertilität als Folge von CP/CPPS | 6 |
| 1.6 Neurogene Inflammation..... | 7 |
| 1.6.1 Grundlagen der neurogenen Inflammation in chronischen Schmerzerkrankungen | 7 |
| 1.6.2 Experimentell erzeugte Autoimmunprostatitis und nervale Dysregulation | 8 |
| 1.6.3 Datenlage zu Prozessen der neurogenen Inflammation bei CP/CPPS | 9 |
| 1.7 Zielsetzung der Studie | 11 |
| 2. Material | 12 |
| 2.1 Materialakquise..... | 12 |
| 2.2. Chemikalien und Reagenzien | 13 |
| 2.3 Zusammensetzung der verwendeten Puffer..... | 14 |
| 2.4 Gerätschaften | 14 |
| 2.5 Verbrauchsgegenstände | 15 |
| 2.6 Enzyme und zugehörige Puffer | 15 |
| 2.7 Primer | 15 |
| 2.7.1 Primer RT-qPCR | 15 |
| 2.7.2 Primer Pyrosequenzierung | 17 |
| 2.7.3 Primer COBRA..... | 17 |
| 2.8 Vollständig bereitgestellte Kits | 17 |
| 2.9 Software | 18 |
| 3. Methoden | 18 |
| 3.1 Gewinnung und Lagerung der Fluid Biopsies (ExUr, Ejakulat und Blut) | 19 |
| 3.2 Gewinnung von Epithelzellen und Leukozyten aus Ejakulat- und ExUr-Pellet... .. | 19 |
| 3.3 DNA/RNA-Extraktion aus ExUr-Pellets | 20 |
| 3.4 Analyse der Genexpression | 21 |
| 3.4.1 Reverse Transkription | 21 |
| 3.4.2 Genexpressionsanalyse mittels RT-qPCR | 22 |
| 3.4.3 Agarosegel-Elektrophorese | 24 |
| 3.5 Analyse der Promotormethylierung | 25 |
| 3.5.1 Bisulfit-Konvertierung | 26 |
| 3.5.2 Promotormethylierungsanalyse mittels Pyrosequenzierung..... | 27 |

| | |
|---|-----------|
| 3.5.3 Combined bisulfite restriction analysis (COBRA) | 30 |
| 3.6 Proteinmessung mittels Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) | 34 |
| 3.7 Messung der Calciumkonzentrationen im Seminalplasma | 36 |
| 3.8 Statistische Auswertung | 36 |
| 4. Ergebnisse | 37 |
| 4.1 Gesamtanalyse CP/CPPS | 37 |
| 4.1.1 Charakterisierung des gesamten Studienkollektivs anhand von Fragebögen, Spermiogramm und Labordiagnostik | 37 |
| 4.1.2 Promotormethylierungsanalyse und Genexpressionsanalyse von Calcitonin- gene-related peptide (CALCA) | 39 |
| 4.1.3 Genexpressionsanalyse und Proteinmessung von S100 Calcium Binding Protein A12 (S100A12) | 44 |
| 4.1.4 Genexpressionsanalyse von Receptor For Advanced Glycation End- Products (RAGE) | 50 |
| 4.1.5 Genexpressionsanalyse von Macrophage Inflammatory Protein 1 Alpha (CCL3) | 52 |
| 4.1.6 Messung der Calciumkonzentrationen im Seminalplasma | 53 |
| 4.1.7 Korrelation des Alters mit klinischen und laborchemischen Parametern | 54 |
| 4.2 Subgruppenanalyse nach Matching der Kohorten nach dem Alter | 55 |
| 4.2.1 Charakterisierung des Studienkollektivs nach Matching gegenüber dem Alter anhand von Fragebögen, Spermiogramm und Labordiagnostik | 55 |
| 4.2.2 Proteinkonzentration von S100 Calcium Binding Protein A12 (S100A12) ... | 57 |
| 4.3 Selektionierte Schmerzkohorte | 59 |
| 4.3.1 Selektionierung der Schmerzpatienten | 59 |
| 4.3.2 Charakterisierung der Schmerzkohorte anhand von Fragebögen, Spermiogramm und Labordiagnostik | 60 |
| 4.3.3 Promotormethylierungsanalyse und Genexpressionsanalyse von Tumornekrosefaktor-alpha (<i>TNF α</i>) | 61 |
| 4.3.4 Promotormethylierungsanalyse, Genexpressionsanalyse und Proteinmessung von Nerve-Growth-Factor (<i>NGF</i>) | 64 |
| 4.3.5 Promotormethylierungsanalyse und Genexpressionsanalyse von Cyclooxygenase-2 (<i>PTGS2</i>) | 66 |
| 4.3.6 Genexpressionsanalyse und Proteinmessung von Monocyte Chemoattractant Protein 1 (CCL2) und Macrophage Inflammatory Protein 1 Alpha (CCL3) | 67 |
| 4.3.7 Genexpressionsanalyse von Interleukin-1 β (<i>IL 1β</i>) | 69 |
| 4.3.8 Genexpressionsanalyse von Tachykinin-Rezeptor-1 (<i>TAC1R</i>) | 69 |
| 4.3.9 Promotormethylierungsanalyse von Solute Carrier Family 6 Member 4 (<i>SLC6A4</i>) | 70 |
| 4.3.10 Promotormethylierungsanalyse von Calcitonin Gene-Related Peptide (<i>CALCA</i>) | 71 |

| | |
|---|-----------|
| 4.3.11 Promotormethylierungsanalyse von Transient Receptor Potential Cation Channel Subfamily A Member 1 (<i>TRPA1</i>) | 71 |
| 4.3.12 Promotormethylierungsanalyse von Opioid Receptor Mu 1 (<i>OPRM1</i>)..... | 71 |
| 5. Diskussion | 73 |
| 5.1. Studienpopulation | 73 |
| 5.2 Veränderungen im Spermogramm bei CP/CPPS-Patienten | 74 |
| 5.3 Calcitonin gene-related peptide (<i>CALCA</i>) | 77 |
| 5.3.1 Promotormethylierung und Genexpression von <i>CALCA</i> in CP/CPPS | 77 |
| 5.3.2 <i>CALCA</i> als Schlüsselspieler in der Schmerzentsstehung von CP/CPPS? | 78 |
| 5.3.3 <i>CALCA</i> und der pH-Wert | 79 |
| 5.3.4 <i>CALCA</i> im Kontext der chronischen Inflammation bei CP/CPPS | 79 |
| 5.3.5 <i>CALCA</i> als Mediator der Subfertilität bei CP/CPPS? | 80 |
| 5.4 Die Achse aus S100A12 und RAGE | 81 |
| 5.4.1 S100A12-Proteinkonzentrationen in Blutserum und Seminalplasma | 81 |
| 5.4.2 Genexpression von S100A12 in Fluid Biopsies | 81 |
| 5.4.3 S100A12 als Schlüsselspieler der Symptomentstehung von CP/CPPS? | 82 |
| 5.4.4 S100A12 und der pH-Wert im Ejakulat | 82 |
| 5.4.5 Zusammenspiel von Zink und Calcium mit S100A12 | 83 |
| 5.4.6 S100A12 als Mediator der urogenitalen Inflammation..... | 85 |
| 5.4.7 S100A12 als wesentlicher Faktor der Subfertilität bei CP/CPPS?..... | 85 |
| 5.4.8 S100A12 im alternden Mann | 86 |
| 5.4.9 Ausschluss des Alters als Konfounder-Variable..... | 86 |
| 5.4.10 <i>RAGE</i> -Genexpression in CP/CPPS | 87 |
| 5.4.11 <i>RAGE</i> als Mediator der Subfertilität bei CP/CPPS? | 88 |
| 5.4.12 <i>RAGE</i> und <i>CALCA</i> als Kofaktoren in CP/CPPS? | 89 |
| 5.5 Genexpressionsanalyse von CCL3 | 89 |
| 5.6. Untersuchung der selektionierten Schmerzkohorte | 90 |
| 5.6.1 Promotormethylierungsanalyse und Genexpressionsanalyse von <i>TNF α</i> ... | 91 |
| 5.6.2 Genexpressionsanalyse von <i>IL 1β</i> | 92 |
| 5.6.3 Genexpressionsanalyse und Proteinmessung von CCL2 und CCL3 | 92 |
| 5.6.4 Promotormethylierungs-, Genexpressionsanalyse und Proteinmessung von NGF | 93 |
| 5.6.5 Genexpressionsanalyse von <i>TAC1R</i> | 95 |
| 5.6.6 Promotormethylierungsanalyse und Proteinmessung von <i>PTGS2</i> | 96 |
| 5.6.7 Promotormethylierungsanalyse von <i>SLC6A4</i> | 98 |
| 5.6.8 Promotormethylierungsanalyse von <i>CALCA</i> | 99 |
| 5.6.9 Promotormethylierungsanalyse von <i>OPRM1</i> | 99 |
| 5.6.10 Promotormethylierungsanalyse von <i>TRPA1</i> | 100 |

| | |
|---|------------|
| Zusammenfassung (Deutsch) | 101 |
| Zusammenfassung (Englisch)..... | 102 |
| Abkürzungsverzeichnis | 103 |
| Abbildungsverzeichnis | 105 |
| Tabellenverzeichnis | 108 |
| Literaturverzeichnis | 109 |
| Anhang..... | 119 |
| Publikationsverzeichnis..... | 140 |
| Selbstständigkeitserklärung..... | 141 |
| Danksagung..... | 142 |

1. Einleitung

1.1 Prävalenz und Klassifikation der Prostatitis-Syndrome

Das Prostatitis-Syndrom ist aufgrund seiner hohen Prävalenz, sowie dem damit einhergehenden Leidensdruck der Patienten, eine Erkrankung mit enormer Bedeutung in der Urologie. Bei männlichen Patienten unter 50 Jahren stellt sie eine sehr häufige urologische Erkrankung dar (Khan et al. 2017). Die Prävalenz wird auf circa 8,2 % geschätzt, wobei es starke lokoregionäre Unterschiede gibt (Krieger et al. 2008).

Klassifiziert wird das Prostatitis-Syndrom nach den National Institutes of Health (NIH) in vier separate Kategorien. Dabei werden die akute bakterielle Prostatitis (NIH I), die chronische bakterielle Prostatitis (NIH II), sowie die chronische Prostatitis/Chronisches Beckenschmerzsyndrom, kurz CP/CPPS, (NIH III) und die asymptomatische Prostatitis (NIH IV) voneinander abgegrenzt. Während bei NIH I und II in der mikrobiologischen Untersuchungen an Ejakulat und Urin ein Erregernachweis gelingt und als Auslöser für die Prostatitis angesehen wird, ist dies bei NIH III und IV nicht der Fall (Krieger et al. 2008). Lediglich 19 % der Prostatitis-Syndrome entfallen auf bakteriell verursachte Prostatitiden. Weitaus häufiger fällt die mikrobiologische Diagnostik dagegen negativ aus. Mit 66 % stellt Kategorie NIH III demnach die häufigste Entität dar. Der Rest entfällt auf die asymptomatische Prostatitis (Clemens et al. 2005).

Die akute bakterielle Prostatitis (NIH I) ist ein akutes infektiöses Geschehen, das mit Schmerzen im Beckenbereich, Fieber und Miktionsbeschwerden einhergeht. Die Beschwerden bei der Miktion reichen von Dysurie über Pollakisurie bis zum Harnverhalt. Insgesamt entfallen 10 % der Prostatitis-Syndrome auf die akute bakterielle Prostatitis (Clemens et al. 2005). Zu einer Infektion kann es beispielsweise nach transrektaler Prostatabiopsie oder intraurethralen Manipulationen im Rahmen von Katheterisierungen kommen. Jedoch deutlich häufiger ist eine spontane Infektion ohne vorherige Eingriffe. Auch Harnwegsinfekte können zur Entwicklung einer bakteriellen Prostatitis führen. Aufgrund der genannten Ätiologie ähnelt das Keimspektrum anderen urogenitalen Infektionen. Das Erregerspektrum reicht von *Escherichia coli* über verschiedene andere gram-negative Spezies wie Pseudomonaden, Klebsiellen und Proteus-Spezies. Seltener finden sich gram-positive Spezies wie Enterokokken (Bowen et al. 2015). Die akute bakterielle Prostatitis ist dementsprechend antibiotisch behandelbar, erstreckt sich jedoch über mehrere Wochen. (Coker und Dierfeldt 2016).

In circa 10 % der Fälle persistiert die bakterielle Infektion und geht in eine chronische bakterielle Prostatitis über. Risikofaktoren für eine Persistenz sind insbesondere Harnabflussstörungen wie Harnröhrenstrikturen. In Bezug auf die Symptomatik

1. Einleitung

präsentiert sich die chronisch-bakterielle Prostatitis während den akut-infektiösen Episoden wie die akute bakterielle Prostatitis. Zwischen diesen Episoden kann sie nahezu asymptomatisch verlaufen. Von einem chronischen Stadium (NIH II) spricht man, wenn die Symptomatik über mindestens 3 von 6 Monaten hinweg besteht, beziehungsweise in diesem Zeitraum rezidivierend auftritt. Ein Erregernachweis in der 2- oder 4- Gläserprobe ist definitionsgemäß bei der bakteriellen Prostatitis obligat. Die Bakterienanzahl sollte im Exprimaturin (ExUr) mindestens 10-fach höher sein als im Mittelstrahlurin (Wagenlehner et al. 2009).

Bei weiteren 10 % der bakteriellen Prostatitiden heilt die Infektion zwar aus, die rezidivierenden Schmerzen aber bleiben bestehen. Die Erkrankung geht somit in ein Chronisch pelvines Schmerzsyndrom (CP/CPPS) über (Wagenlehner et al. 2013a). In Bezug auf die Symptomatik ähnelt CP/CPPS stark der chronischen bakteriellen Prostatitis. Definitionsgemäß liegt das Vergleichskriterium beim Erregernachweis. Ist kein Erreger nachweisbar, so spricht man von CP/CPPS. Neben dem Erregernachweis erfolgt in der 2- oder 4-Gläserprobe auch die Bestimmung von Entzündungsmarkern in Urin und Ejakulat. Anhand dieser Marker wird in eine entzündliche (NIH IIIa) sowie eine nicht-entzündliche (NIH IIIb) Form unterschieden. In der Klinik und Poliklinik für Urologie Gießen werden dazu folgende Schwellenwerte genutzt (siehe Tabelle 1):

Tabelle 1 **Schwellenwerte zur Differenzierung von CP/CPPS in Typ 3A und 3B.** Unterteilung der CP/CPPS in eine entzündliche (Typ 3A) und nicht-entzündliche (Typ 3B) Subgruppe anhand der Schwellenwerte der Klinik und Poliklinik für Urologie Gießen (Wagenlehner et al. 2009).

| | CP/CPPS 3A | CP/CPPS 3B |
|--|---------------------|---------------------|
| Anzahl der Leukozyten im ExUr | >10/mm ³ | <10/mm ³ |
| Peroxidase positive Zellen im Ejakulat | >0,113 Mio. PPL/ml | <0,113 Mio. PPL/ml |
| Leukozyten-Elastase im Ejakulat | >280 ng/ml | <280 ng/ml |
| Interleukin-8 im Ejakulat | 10630-19501 pg/ml | 2033-5287 pg/ml |

Im Rahmen der 4-Gläserprobe werden Initialurin, Mittelstrahlurin, sowie Prostataexprimat und ExUr gesondert voneinander auf Leukozyten und Bakterien untersucht. Eine Vereinfachung der 4-Gläserprobe stellt die 2-Gläserprobe dar, bei der nur Mittelstrahlurin und Urin nach Prostatamassage miteinander verglichen werden. Beide Formen werden ebenbürtig zur Diagnosestellung verwendet (Nickel et al. 2006). Findet sich hierbei lediglich ein Entzündungsnachweis ohne Symptomatik, so spricht man von einer asymptomatischen Prostatitis (NIH IV). Ein solche Situation kann beispielsweise zufällig im Rahmen eines Spermioграмms auftreten (Rees et al. 2015).

1.2 Symptomatik und Quantifizierung der Beschwerden bei CP/CPPS

Der weitaus größte Anteil unter den Prostatitis-Syndromen entfällt dabei auf CP/CPPS (Breser et al. 2017). Die Diagnostik gestaltet sich hier jedoch aufgrund der heterogenen Symptomatik und des Fehlens von Biomarkern als kompliziert. Die Tatsache, dass Ätiologie und Pathogenese in CP/CPPS nur in Ansätzen verstanden sind und sich am ehesten multifaktoriell gestalten, erschwert das Stellen der Diagnose und die Therapie.

Neben einer urologischen Anamnese und körperlichen Untersuchung spielen in der Diagnosestellung verschiedene standardisierte Fragebögen eine zentrale Rolle. Die unterschiedlich starke Ausprägung der einzelnen Symptombereiche kann hierdurch spezifisch für jeden Patienten standardisiert erfasst werden. Eine entsprechende Klassifizierung ist anschließend für die individuelle Anpassung der Therapie gemäß dem UPOINT-System von Bedeutung. Wichtig in diesem Zusammenhang sind vor allem der NIH-CPSI (Chronic Prostatitis Symptom Index), der sowohl für die Stellung der Diagnose als auch zum Therapiemonitoring geeignet ist. Ein weiterer differentialdiagnostisch wichtiger Fragebogen ist der IPSS-Fragebogen (International Prostate Symptom Score). Das Vorliegen sexueller Funktionsstörungen wird zudem mittels International Index of Erectile Function (IIEF) geprüft (Rees et al. 2015).

Bei der klinischen Symptomatik der Patienten steht neben den Beschwerden beim Wasserlassen und einer eingeschränkten Lebensqualität häufig der Schmerz im Mittelpunkt. Die Symptome müssen definitionsgemäß in mindestens 3 von 6 Monaten wiederkehrend bestehen (Wagenlehner et al. 2009) und werden standardisiert mithilfe des NIH-CPSI erfasst. Dieser Score vergibt differenziert Punkte in den drei Subkategorien Schmerz, Miktion und Lebensqualität. Dies geschieht unter Verwendung von 9 Fragen. Dabei widmen sich vier Fragen dem Thema Schmerz, zwei Fragen der Miktion und drei Fragen der Lebensqualität (Litwin MS et al. 1999). Entsprechend der einzelnen Kategorien werden Punkte vergeben, wobei diagnostisch dem Schmerzbereich die höchste Bedeutung zu kommt, da er insbesondere in der Differentialdiagnose zu anderen Erkrankungen von Bedeutung ist. Ab einem Punktwert von >10 im Bereich Schmerz, spricht man von einer manifesten CPPS-Symptomatik (Schneider et al. 2005). Die Schmerzen bei CP/CPPS manifestieren sich an verschiedenen Stellen des Becken- und Genitalbereiches. Schmerzen im Bereich des Damms (63 %) und der Hoden (58 %) stellen die häufigsten Lokalisationen dar. Des Weiteren finden sich Schmerzen im Blasen- und Schambereich (42 %) sowie am Penis (32 %). Bei der Ejakulation und Miktion klagen 45 % der Patienten über Schmerzen. Schmerzstärke und -frequenz haben hierbei einen höheren Einfluss auf die Lebensqualität der Patienten als die Lokalisation der Schmerzen (Wagenlehner et al. 2013b).

1. Einleitung

Im Bereich der Schmerzdomäne des NIH-CPSI dienen 4 Fragen der genaueren Ermittlung ihrer Schmerzkomponente. Auf Basis eines Punktesystems können CP/CPPS-Patienten nach ihrer Schmerzkomponente kategorisiert werden. Die Fragen dienen zur genaueren Differenzierung von Schmerzstärke, Lokalisation und Frequenz. Eine Einstufung der Schmerzstärke erfolgt anhand einer Schmerzskala von 0 bis 10. Schmerzen mit einer Intensität von 0–3 werden als leicht, von 4–6 als mittel und von 7–10 als schwer eingestuft. Insgesamt können im Bereich Schmerz maximal 21 Punkte erreicht werden. Patienten mit 0–7 Punkten haben eine leichte, 8–13 Punkten haben eine mittlere und 14–21 eine starke Schmerzkomponente (Wagenlehner et al. 2013b).

1.3 Phänotypisierung und multimodale Therapie nach UPOINT(S)

Um bei Patienten mit CP/CPPS eine möglichst individuelle Therapie zu initiieren, entwickelten Shoskes et al. 2009 das Phänotypisierungssystem UPOINT(S). Mit dessen Hilfe können CP/CPPS-Patienten anhand von 6 Unterbereichen kategorisiert werden und sind einer individuellen Therapie zuführbar. Dieser Ansatz beinhaltet bereits erste Muster einer personalisierten Präzisionsmedizin. Derartigen Therapiekonzepten kommt bei pathophysiologisch heterogenen Erkrankungen wie CP/CPPS eine zunehmend größere Bedeutung zu. Die Einteilung nach UPOINT(S) erfolgt nach den folgenden Punkten: 1) Symptomatik beim Wasserlassen, 2) psychosoziale Dysfunktion, 3) organspezifische Befunde, 4) Infektionen, 5) neurologisch/systemische Erkrankungen, 6) Beckenbodendysfunktion und 7) Sexuelle Dysfunktion. Die Subkategorien mit den zugehörigen Therapieoptionen sind in Abbildung 1 dargestellt. Eine multimodale Therapie nach UPOINT war in mehreren Studien gegenüber einer herkömmlichen Monotherapie effektiver. Der Therapieerfolg wurde in einer multizentrischen Studie mit 914 CPPS-Patienten analysiert. Hier kam es bei 77,5 % der Patienten zu einer Verbesserung von 6 oder mehr Punkten im NIH-CPSI (Magri et al. 2015).

Die Therapieoptionen eines Patienten richten sich nach den jeweils zutreffenden Bereichen des UPOINTS-Systems. Liegen obstruktive oder irritative Symptome beim Wasserlassen, sowie erhöhte Restharmengen vor, so erfolgt eine Behandlung mit Alpha-Blockern oder Anticholinergika. Falls eine Symptomatik im Psychosozialen Bereich vorliegt, ist eine psychologische Therapie oder die Behandlung mit Antidepressiva indiziert. Zeigt sich die Prostata unter Palpation stark druckempfindlich oder sind Leukozyten in der 4-Gläser-Probe nachweisbar, so kann eine Therapie mit Pollenextrakten oder Quercetin begonnen werden. Erfolgt im Zuge der weiteren mikrobiologischen Untersuchung ein Erregernachweis, ist eine antibiotische Therapie indiziert. Breitet sich der Schmerz über die Prostata hinweg auf andere Organsysteme aus oder besteht eine generalisierte Abgeschlagenheit, so ist auch in diesem Kontext

1. Einleitung

die Gabe von Antidepressiva oder Antikonvulsiva möglich. Physiotherapie ist darüber hinaus beim Vorliegen von Beckenbodendysfunktion oder bei muskulären Schmerzen indiziert. Bei Vorliegen einer Sexuellen Dysfunktion besteht die Möglichkeit einer Therapie mit Sildenafil oder SSRI bei Libidoverlust (Shoskes et al. 2018) (siehe Abb. 1).

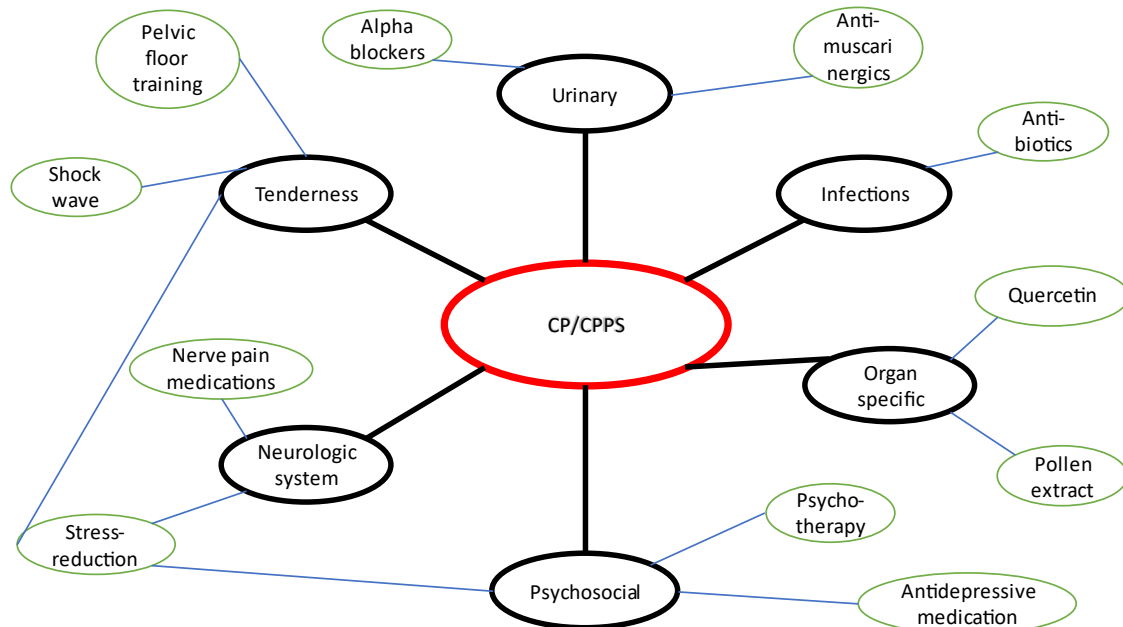


Abbildung 1 **Phänotypisierung und multimodale Therapie nach UPOINT**. In der Abbildung ist die Phänotypisierung von CP/CPPS-Patienten anhand des UPOINT-Systems dargestellt. Trifft einer der Punkte auf einen Patienten zu, so kann dieser einer entsprechenden spezifischen Therapie zu geführt werden. Die Therapieoptionen sind den jeweils zugehörigen Unterbereichen des UPOINT-Systems verbunden. Die Abbildung des UPOINT-Modells stützt sich auf die Darstellung der Publikationen von Shoskes et al. 2018.

Anhand dieser Erläuterungen wird deutlich, dass sich die aktuelle Therapie stark an der klinischen Symptomatik des einzelnen Patienten orientiert. Aufgrund des fehlenden Wissens über unterschiedliche pathophysiologische Abläufe in einzelnen Patienten ist dies zum jetzigen Zeitpunkt das Optimum im Sinne einer Präzisionstherapie. Bei einer detaillierteren molekularbiologischen Charakterisierung von CP/CPPS könnten Therapien für Subfertilität und Schmerz individuell zugeschnitten werden.

1.4 Ätiologie und Komorbiditäten des Chronischen Beckenschmerzsyndroms

Trotz der hohen Inzidenz sind Ätiologie und Pathogenese von CP/CPPS zu großen Teilen unbekannt. Vor allem für die Aufrechterhaltung der chronischen Schmerzen gibt es bisher kaum Erklärungen. Am ehesten ist die Genese dabei als multifaktoriell anzusehen und nicht auf einen einzelnen Faktor reduzierbar. Die fehlende Klarheit über die Ätiologie von CP/CPPS macht einen einheitlichen und effektiven monotherapeutischen Ansatz aktuell unmöglich (Magistro et al. 2016). In den letzten

1. Einleitung

Jahrzehnten entwickelten sich jedoch einige Hypothesen, die das Zusammenspiel unterschiedlicher Faktoren in der Entstehung von CP/CPPS zu erklären versuchen.

Ein möglicher Faktor in der Entstehung von CP/CPPS sind bakterielle Infektionen. Wie bereits eingangs erwähnt, münden bakterielle Prostatitiden zu 10 % in CP/CPPS. Dies kann auch geschehen nachdem die eigentliche Infektion erfolgreich antibiotisch behandelt wurde (Wagenlehner et al. 2013a). Neben solchen dokumentierten bakteriellen Prostatitiden werden Infektionen mit okkulten Erregern wie Mykoplasmen, Chlamydien, Trichomonaden und Ureaplasmen als Auslöser diskutiert. Ein tatsächlicher Nachweis fortbestehender Infektionen war in mehreren Studien jedoch nicht möglich. Lediglich im Anfangsurin von CP/CPPS-Patienten fand sich eine Vermehrung von *Burkholderia cenocepacia* gegenüber der Vergleichsgruppe (Nickel et al. 2015). Des Weiteren zeigte sich bei CP/CPPS-Patienten eine signifikant erhöhte Lebenszeitprävalenz von unspezifischen Harnwegsinfektionen (Pontari et al. 2005). Im Verlauf ist zwar kein weiterer Erregernachweis mehr möglich, dennoch kommt es zu einer Chronifizierung der Symptome. Hierfür werden nach abgelaufener Infektion unterschiedliche Mechanismen in Betracht gezogen. Nicht die Infektion selbst, sondern eine genetische Prädisposition mit entsprechender immunologischer und nervaler Dysregulation könnte somit zur Entwicklung von CP/CPPS führen (Pontari et al. 2005).

Als mögliche verstärkende Faktoren werden verschiedene Komorbiditäten diskutiert. Hierzu zählen unter anderem hormonelle Dysbalancen, Dysfunktionen des Beckenbodens und Harnabflussstörungen, sowie unterschiedliche psychische Störungen (Breser et al. 2017). In einer Studie zu Komorbiditäten von CP/CPPS-Patienten zeigte sich bei Patienten eine signifikant höhere Lebenszeitprävalenz für psychiatrische und neurologische, sowie kardiovaskuläre Ereignisse. Daneben bestand ein deutlich erhöhtes Risiko für Entwicklung von lymphatischen, hämatologischen oder weiteren infektiologischen Erkrankungen. Diese Prädisposition legen Fehlregulation auf einer Ebene nahe, die über den Urogenitaltrakts hinauszugehen scheint (Pontari et al. 2005). Insbesondere psychiatrischen Komorbiditäten im Sinne einer Depression kommt im Rahmen des CP/CPPS eine entscheidende Bedeutung zu. Dies ist zu einem großen Teil auf die teils erheblich reduzierte Lebensqualität der Patienten zurückzuführen. Vor allem ein schlechteres Bildungsniveau sowie ein niedriges Gehalt sind Prädiktoren für eine höhere Symptomschwere der Patienten (McNaughton Collins et al. 2001).

1.5 Subfertilität als Folge von CP/CPPS

Neben den genannten Komorbiditäten findet sich bei CP/CPPS häufig eine Subfertilität (Motrich et al. 2018). Im Spermogramm betroffener Patienten zeigen sich eine geringere

Spermiendichte, ein niedrigerer Anteil progressiver Spermien und weniger normal gebildete Spermien ohne Defekte. Das Ejakulatvolumen zeigt sich demgegenüber bei CP/CPSP-Patienten erhöht (Fu et al. 2014). Des Weiteren findet sich in Spermien von CP/CPSP-Patienten eine verstärkte DNA-Fragmentierung, was ebenfalls einen negativen Einfluss auf die Fertilität der Patienten nimmt (Berg et al. 2021). Die genauen pathophysiologischen Hintergründe der eingeschränkten Fertilität im Rahmen der CP/CPSP sind zum gegenwärtigen Zeitpunkt jedoch weitestgehend unerforscht. Eine mögliche Ursache stellen entzündliche Veränderungen im Kontext der Erkrankung dar. Im Tiermodell zeigte sich eine Assoziation zwischen inflammatorischen Mediatoren und einer reduzierten Fertilität in experimentell erzeugter Autoimmunprostatitis (EAP). Wie auch CP/CPSP-Patienten zeigten die Tiere eine eingeschränkte Konzentration und Motilität der Spermien (Motrich et al. 2006). Die Zusammenhänge zwischen CP/CPSP und der damit einhergehenden Subfertilität sind jedoch weitestgehend unerforscht.

1.6 Neurogene Inflammation

1.6.1 Grundlagen der neurogenen Inflammation in chronischen Schmerzerkrankungen

Eine neuere Hypothese zur Krankheitsentstehung von CP/CPSP ist die neurogene Inflammation. Die Entstehung und Aufrechterhaltung von chronischen Schmerzen soll über ein komplexes Zusammenspiel von Immun- und Nervensystem erklärt werden. Das Konzept der neurogenen Inflammation wurde das erste Mal 1901 durch den Physiologen Sir William Maddock Bayliss beschrieben. Die entsprechenden Vorgänge umfassen eine Entzündungsreaktion, die durch Aktivierung des peripheren Nervensystems ausgelöst und aufrechterhalten wird. An den Endigungen der sensorischen Nervenfasern kommt es zu einer Freisetzung verschiedener Mediatoren, die im peripheren Gewebe eine Entzündung hervorrufen. Hervorzuheben sind in diesem Zusammenhang insbesondere Calcitonin-gene-related-peptide (CGRP) und Substanz P (SP). Diese Faktoren sind in der Lage eine Reihe von Prozessen zu initiieren, die unter anderem zu klassischen Entzündungsreaktionen beitragen. Hierzu zählen vor allem die Vasodilatation, sowie die Ausbildung von Ödemen und die Rekrutierung von Immunzellen. In diesem Rahmen wird eine sogenannte Hyperalgesie ausgelöst, wodurch Reize zu einer stärkeren Schmerzwahrnehmung als üblich führen. Durch unterschiedliche Wechselwirkungen an den peripheren Nervenendigungen wird die Reizschwelle der Nervenzellen durch Entzündungsmediatoren herabgesetzt. Auch Reize, die ursprünglich unterhalb dieser Schmerzgrenze lagen, können durch solche Vorgänge fortan zu Schmerzen im betroffenen Gewebe führen (siehe Abbildung 2). Einen entsprechenden Zustand bezeichnet man als Allodynie (Herbert und Holzer 2002).

1. Einleitung

Die Entstehung akuter wie auch chronischer Schmerzen wird durch die neurogene Inflammation begünstigt. Von zentraler Bedeutung scheint dabei die enge Interaktion zwischen Leukozyten und Neuronen über zahlreiche Mediatoren zu sein. Durch gegenseitige Stimulation tragen sie zur Aufrechterhaltung der Schmerzsymptomatik bei. Ähnliche Prozesse bei CP/CPPS wären denkbar (Breser et al. 2017). Neben CP/CPPS gibt es eine Reihe weiterer chronischer Schmerzerkrankungen, bei denen die neurogene Inflammation eine Rolle zu spielen scheint. Vorbeschrieben ist dies insbesondere in der Pathophysiologie der Migräne. Schlüsselspieler und Therapietarget ist dort vor allem CGRP. Neben einer ausgeprägten Vasodilatation initiiert CGRP hier eine Reihe inflammatorischer Signalkaskaden (Spekker et al. 2021). Ähnliche Prozesse sind auch bei diversen weiteren Erkrankungen vorbeschrieben. Insbesondere bei viszeraler Dysfunktion scheint die neurogene Inflammation von Bedeutung zu sein. Hier seien insbesondere chronisch-entzündliche Darmerkrankungen und die Endometriose genannt (Velho et al. 2021). Aber auch bei Schmerzerkrankungen der Gelenke wie der rheumatoiden Arthritis und der Arthrose ist sie vorbeschrieben (Walsh et al. 2015).

Die zugrundeliegenden pathophysiologischen Prozesse scheinen insbesondere durch CGRP und SP ausgelöst zu werden. Neben der Induktion inflammatorischer Kaskaden tragen sie zur Aktivierung von Mastzellen bei. Mastzellen ihrerseits setzen in der Folge eine Reihe von proinflammatorischen Mediatoren frei (Ottosson und Edvinsson 1997). Hierzu zählen diverse Cyto- und Chemokine, die wiederum zu einer Rekrutierung von Leukozyten führen. Diese Prozesse tragen über unterschiedliche Rezeptorsysteme zu einer erneuten Aktivierung der Nervenfasern bei. Es kommt zu einer positiven Rückkopplung und Verstärkung des ursprünglichen Signals (siehe Abb. 2). Sensibilisierungen gegenüber Schmerzreizen sind die Folge (Raddant und Russo 2011).

1.6.2 Experimentell erzeugte Autoimmunprostatitis und nervale Dysregulation

Die Grundlagenforschung im Bereich der neurogenen Inflammation wird bei CP/CPPS durch den Mangel an Gewebebiopsien verkompliziert. Liquid Biopsies spielen somit eine entscheidende Rolle. Diese lassen zwar Prozesse im Nervensystem erahnen, ein direkter Nachweis neuronaler Veränderungen im Gewebe ist dadurch jedoch nicht möglich. Zur Darstellung der nervalen Prozesse innerhalb des Prostatagewebes nutzt man daher im Tiermodell die experimentell erzeugte Autoimmunprostatitis (EAP). In ihrer Aussagekraft bezüglich der Pathophysiologie bei CP/CPPS sind solche Maus-Modelle verständlicherweise limitiert. Dies liegt im Wesentlichen an der künstlichen Induktion der Prostatitis. Die Ergebnisse aus den Tiermodellen geben jedoch Einblicke in die Dysregulation des prostatistischen Nervensystems. Infolge der künstlich erzeugten Prostatitis laufen in der Prostata auch Prozesse im Sinne einer neurogenen Inflammation

1. Einleitung

ab. Diese führen neben der Freisetzung diverser Mediatoren zu einer verstärkten Innervation der Prostata mit einer Dichtezunahme von Nervenfasern im Gewebe. Mäuse in denen eine EAP induziert wurde, zeigten sich anschließend deutlich sensibler gegenüber einer mechanischen Stimulation der Dammregion. Auch auf ursprünglich nicht-schmerzhafte Reize zeigten diese Tiere höhere Schmerzreaktionen. Laut den Autoren könnten diese Prozesse auch nach Abklingen der akuten Entzündung zu einer chronischen Allodynie und Hyperalgesie beitragen. Vergleichbare Veränderungen des prostatistischen Nervensystems wäre auch CP/CPPS denkbar (Rudick et al. 2008).

1.6.3 Datenlage zu Prozessen der neurogenen Inflammation bei CP/CPPS

Zum Zeitpunkt unserer Studie existieren kaum Untersuchungen, die sich explizit mit der neurogenen Inflammation im Rahmen von CP/CPPS beschäftigen. Lediglich eine Studie untersuchte die Regulation neuroinflammatorischer Gene in Blut und ExUr-Pellet. Hier fanden sich einige vielversprechende Faktoren. Insbesondere das Calcium und Zink bindende Protein S100A12 war im ExUr-Pellet auf Genexpressionsebene hochreguliert (Shoskes et al. 2021). Die Achse aus S100A12 und dem korrespondierenden Rezeptor RAGE wird unter anderem mit neuropathischen Schmerzen, bspw. bei diabetischer Polyneuropathie, in Verbindung gebracht (Wang et al. 2021). Klassische Marker der neurogenen Inflammation sind in CP/CPPS bisher jedoch kaum erforscht. Insbesondere zu den beiden Schlüsselspielern CGRP und Substanz P existieren aktuell keine Studien.

Im Kontext der EAP wurde jedoch bereits eine ganze Reihe unterschiedlicher Mediatoren untersucht, die mit der neurogenen Inflammation in Verbindung gebracht werden. Insbesondere die Chemokine *Ccl2* und *Ccl3* scheinen im Maus-Modell eine Rolle zu spielen. Beide fanden sich in EAP auf mRNA-Ebene hochreguliert und wiesen einen signifikanten Einfluss auf die Schmerzsymptomatik der betroffenen Tiere auf (Quick et al. 2012). Über das Tiermodell hinaus existieren zu diesen Chemokinen bereits Studien an Menschen. Hier zeigten sich CCL2 und CCL3 auf Proteinebene im Prostataexprimat von CP/CPPS-Patienten erhöht. Im Fall von CCL3 korrelierten die Spiegel mit dem Schmerz (Desireddi et al. 2008). Beide Chemokine wurden im Kontext von neuropathischen Schmerzen bereits tiefergehend untersucht (White et al. 2007).

Ein weiterer vielversprechender Mediator der neurogenen Inflammation im Kontext von CP/CPPS scheint der Nerve Growth Factor (NGF) zu sein. NGF wird seit einigen Jahren immer wieder als Biomarker für CP/CPPS und andere Erkrankungen mit viszeraler Dysfunktion diskutiert (Coelho et al. 2019). Im Tiermodell konnte bereits eine Hochregulation von *Ngf* im Rahmen der EAP nachgewiesen werden. Dies geht mit einer Sensibilisierung gegenüber Schmerzreizen einher (Schwartz et al. 2015; Schwartz et al.

1. Einleitung

2016). In CP/CPPS-Patienten findet sich NGF auf Proteinebene im Prostataexprimat erhöht. Auch hier besteht eine Korrelation mit der Schmerzsymptomatik (Miller et al. 2002) und ein Zusammenhang mit dem Therapieansprechen (Watanabe et al. 2011).

Neben diesen Faktoren sind einige der klassischen inflammatorischen Cytokine bei CP/CPPS vorbeschrieben. Insbesondere zu Interleukin-1 β , TNF- α , IL-6 und IL-8 liegen einige Studien vor (Khadra et al. 2006; Nadler et al. 2000; Orhan et al. 2001). Cytokine führen zu einer Sensibilisierung von Nervenfasern und tragen dadurch wesentlich zur Entstehung neuropathischer Schmerzen bei (Leung und Cahill 2010). In CP/CPPS zeigte vor allem IL-8 eine Korrelation mit der Schmerzsymptomatik (Khadra et al. 2006).

Ein weiteres Enzym, das im Rahmen von CP/CPPS bereits untersucht wurde, ist die Cyclooxygenase 2 (COX2). Durch die Bildung von Prostaglandinen nimmt sie über die Sensibilisierung von Neuronen Einfluss auf die Entstehung von Schmerzen (Jang et al. 2020). Im Prostataexprimat von CP/CPPS fanden sich bereits erhöhte Konzentrationen und eine Korrelation mit der Schmerzsymptomatik (Yuan et al. 2014).

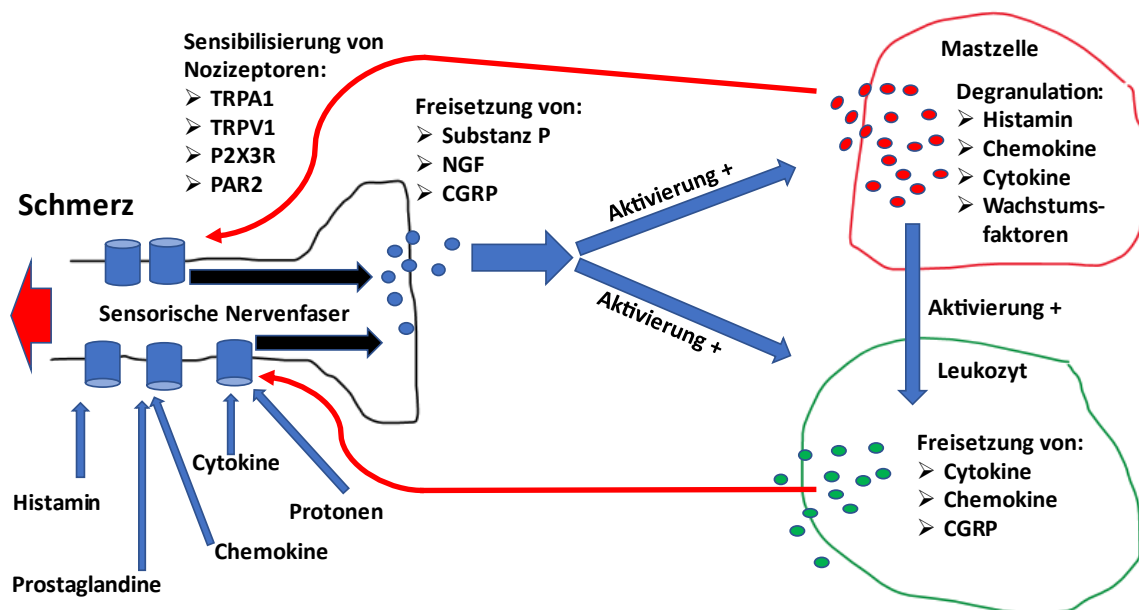


Abbildung 2 **Prozesse der neurogenen Inflammation.** Abgebildet sind grob-schematisch die Prozesse der neurogenen Inflammation. Auf der linken Seite ist die Endigung einer sensorischen Nervenfaser mit ihren Rezeptoren dargestellt. An den Endigungen der Nervenfaser werden insbesondere die neuroinflammatorischen Mediatoren NGF, CGRP und Substanz P freigesetzt. Diese führen zu einer Aktivierung von Mastzellen und Leukozyten, welche in der Folge ihrerseits eine Vielzahl von Mediatoren wie Chemokinen und Cytokinen freisetzen. Hierdurch kommt es zu einer positiven Rückkopplung mit Aktivierung der Nervenfasern. Die Folge ist eine Verstärkung des ursprünglichen Signals sowie die Entstehung und Aufrechterhaltung von Schmerzen.

Aus der Literatur ist bekannt, dass die oben genannten Mediatoren in der Lage sind diverse Rezeptoren auf Nervenfasern zu aktivieren und dadurch zu einer Sensibilisierung der Nozizeptoren beizutragen. Im Zuge dieser Prozesse sinkt die

Reizschwelle der Nervenfasern und es kommt es zur Entwicklung einer Allodynie und Hyperalgesie. Derartige Prozesse im Zuge der neurogenen Inflammation sind bereits für einige Schmerzkrankungen gezeigt worden. (Gouin et al. 2017; Park et al. 2010; Fiorucci und Distrutti 2002) (siehe Abbildung 2).

1.7 Zielsetzung der Studie

Die Pathophysiologie von CP/CPPS ist weitestgehend unbekannt. In den letzten Jahren gewinnt das Konzept der neurogenen Inflammation zur Erklärung der Erkrankung mehr und mehr an Popularität. In dieser Studie möchten wir ein möglichst großes Spektrum von Genen und Proteinen untersuchen, die in der Literatur mit der neurogenen Inflammation in Verbindung gebracht werden. Diese wollen wir auf den drei Ebenen DNA, RNA und Protein darstellen. Hierbei sollen zunächst die zugrunde liegenden epigenetischen Regulationen ausgewählter Faktoren im ExUr-Pellet untersucht werden. Erstens soll hier die Methylierung genexpressionsregulierender Promotorregionen analysiert werden. Zweitens soll eine Genexpressionsanalyse neuroinflammatorischer Mediatoren erfolgen. Im Anschluss folgen Messungen der Proteinkonzentration in ExUr, Semialplasma und Blutserum. Zunächst sollen hier nach Möglichkeit Korrelationen von Regulationen auf DNA-, RNA- und Proteinebene für einzelne Mediatoren untersucht werden. Anschließend sollen auch Korrelationen dieser Faktoren untereinander auf Gen- und Proteinebene dargestellt werden. Zudem soll eine Assoziation mit der klinischen Symptomatik und molekularen Markern untersucht werden. Insbesondere die Untersuchung von Korrelationen zwischen neuroinflammatorischen Markern und der Schmerzsymptomatik sowie Subfertilität sollen Gegenstand der Studie sein. Um Veränderungen in der Regulation einzelner neuroinflammatorischer Mediatoren im sehr heterogenen Patientenkollektiv von CP/CPPS zu untersuchen, entschieden wir uns für ein dreiteiliges Vorgehen. Zunächst soll die Analyse einer Gesamtkohorte erfolgen, welche den ersten Abschnitt der Arbeit bildet. Zweitens soll eine Subkohorte nach Matching gegenüber dem Alter untersucht werden, um Verzerrungen durch Altersunterschiede zwischen den Kohorten zu vermeiden. Korrelationen der untersuchten Mediatoren mit der vorbeschriebenen Subfertilität von CP/CPPS-Patienten sollen so möglichst unverzerrt analysiert werden. Abschließend sollen im dritten Abschnitt der Studie vielversprechende Mediatoren aus der Literatur in einer nach dem Faktor Schmerz selektionierten Patientenkohorte untersucht werden. Hierdurch soll eine genauere Charakterisierung dieser stark schmerzgeplagten Kohorte erfolgen.

2. Material

2.1 Materialakquise

Die wissenschaftliche Arbeit im Zuge der Promotion wurde auf Basis des Ethikvotums AZ.: 55/13 der Sitzung vom 11.04.2013 durchgeführt. Alle Studienteilnehmer gaben nach Aufklärung vor Verwertung ihrer Proben ein schriftliches Einverständnis ab. Die Analyse aller Proben erfolgte retrospektiv und stützt sich auf die Biobank mit Proben der Klinik und Poliklinik für Urologie, Kinderurologie und Andrologie, die im Rahmen des laufenden DFG GRK 1871/ Teilprojekt 5 „Systemic and local inflammatory gene regulation in chronic prostatitis – studies in patients’ blood and ejaculates towards individualized disease profiling“ angelegt wurde.

Die Herausforderung in der Forschung zu den pathophysiologischen Grundlagen in CP/CPPS besteht vor allem im Mangel von Prostatabiopsien betroffener Patienten. Eine solche Biopsie ist bei den ohnehin schon stark schmerzgeplagten Patienten kaum denkbar. Aus diesem Grund stützt sich ein großer Teil der Forschung stattdessen auf sogenannte „Liquid Biopsies“. Der Vorteil dieser Proben liegt in ihrer nichtinvasiven Verfügbarkeit. Das zugehörige Material umfasst Blut, Ejakulat und Urin. Wobei im Fall von Urin weiter in Ersturin und ExUr unterschieden werden muss. Als Ersturin werden die ersten circa 25 ml Urin bezeichnet, die zu Beginn der Miktion die Harnröhre verlassen. Die Gewinnung des ExUr gestaltet sich ähnlich. Hierbei erhält der Patient vor dem Wasserlassen lediglich für einige Sekunden eine sogenannte Prostatamassage. Der zugrundeliegende Vorgang ähnelt in seiner Durchführung einer routinemäßigen digital-rektalen-Untersuchung und wurde von einem Arzt durchgeführt.

Die im Rahmen der Studie verwendeten Patientenproben wurden im Zuge der Sprechstunde für Chronische Prostatitis an der Klinik und Poliklinik für Urologie, Kinderurologie und Andrologie seit 2013 gewonnen. Eine gesunde Kontrollkohorte wurde über denselben Zeitraum durch Medizindoktoranden im Zuge einer Probandenrekrutierung über die Probandensuchfunktion des Uni-Mail-Systems aufgebaut. Ausschlusskriterien für die Teilnahme in der gesunden Kontrollgruppe waren urologisch-andrologische Vorerkrankungen sowie Zeichen einer Infektion in Ejakulat und Urin. Um in der Kontrollkohorte insbesondere etwaige urologische Vorerkrankungen festzustellen, füllten die Probanden einen andrologischen Fragebogen aus. Es wurden zudem bevorzugt Personen ausgewählt, die nicht regelmäßig Medikamente einnahmen.

Ein Teil der bei Patienten akquirierten Proben wurde zur routinemäßigen Diagnostik im Rahmen der Sprechstunde analysiert. Im Blut wurden hierbei CRP, PSA sowie Testosteron und Östrogen bestimmt. Daneben wurden Urinproben und Ejakulat

2. Material

mikrobiologisch auf bakterielle Infektionen untersucht sowie ein routinemäßiger Urinstatus von Ersturin und ExUr erstellt. Auf Basis der WHO-Kriterien erfolgte eine Analyse des SpermioGRAMMS, in dessen Rahmen unter anderem auf entzündliche Prozesse untersucht wurde. Neben den Laboruntersuchungen erfolgten im Zuge der Sprechstunde eine urologische Anamnese inklusive körperlicher Untersuchung und eine sonographische Beurteilung des urologischen Kompartiments. Die Patienten füllten zusätzlich verschiedene Fragebögen aus, die die vorherige Anamnese um einige Bereiche ergänzen. Zu nennen sind hier der IPSS, NIH-CPSI und IIEF.

Auf Grundlage dieser umfassenden Untersuchungsergebnisse wurden die Patienten zunächst charakterisiert. Die entsprechenden Diagnosen wurden durch einen Facharzt gestellt. Für die Studie wurden lediglich Patienten mit der Diagnose einer CP/CPPS (NIH III) ausgewählt. In den ersten Teil der Studie wurden sowohl Patienten vom Typ IIIA als auch Typ IIIB eingeschlossen. In den letzten Teil der Studie wurden nur Patienten mit der Diagnose NIH IIIB aufgenommen. Eingeschlossene Patienten wiesen weder Hinweise auf Malignome noch Zeichen von Infektionen im Urogenitalbereich auf.

2.2. Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 2 **Chemikalien und Reagenzien**

| | |
|---------------------------------------|---|
| Chloroform | Carl Roth, Karlsruhe |
| PeqGold Trifast | PeqLab, Erlangen |
| Glykogen | Carl Roth, Karlsruhe |
| Isopropanolol | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| Ethanol | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| Diethylpyrocarbonat (DEPC) | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| Natriumacetat | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| Essigsäure | Carl Roth, Karlsruhe |
| Natriumhydroxid | Carl Roth, Karlsruhe |
| Tris-Hydrochlorid PUFFERAN® | Carl Roth, Karlsruhe |
| Orange G | Merck, Darmstadt |
| Agarose | Carl Roth, Karlsruhe |
| Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| GelRed Nucleic Acid Gel Stain | Biotium, Fremont, USA |
| GeneRuler DNA Ladder Mix | ThermoScientific, Darmstadt |
| Deoxynucleotide Triphosphates (dNTPs) | Promega, Mannheim |
| Oligo-dT-Primer | InvitrogenThermoScientific, Waltham, US |
| Hexamer-Primer | InvitrogenThermoScientific, Waltham, US |
| Wash-Buffer Pyromark | Qiagen, Hilden |
| Annealing-Buffer Pyromark | Qiagen, Hilden |
| Binding-Buffer Pyromark | Qiagen, Hilden |
| Denaturation-Buffer Pyromark | Qiagen, Hilden |
| Streptavidin-Sepharose | Sigma-Aldrich, Steinheim |

2. Material

2.3 Zusammensetzung der verwendeten Puffer

Tabelle 3 Zusammensetzung der verwendeten Puffer

| | |
|-------------------------|---|
| TAE-Puffer | TRIS-Puffer 48,4 g Eisessig 11,42 g EDTA 0,5 mol 20 ml dd-H ₂ O auf 1 l auffüllen pH-Wert mit NaOH / HCl auf 8,2 titrieren |
| TE-Puffer (pH-Wert 8,0) | 1M Tris-Cl (pH 8.0) 1 ml 0.5M EDTA (pH 8.0) 0.2 ml dd-H ₂ O 98.8 ml |

2.4 Gerätschaften

Tabelle 4 Gerätschaften

| | |
|--|------------------------------|
| Feinwaage AE240 | Mettler-Toledo, Gießen |
| -80 °C Gefrierschrank | ThermoScientific, Darmstadt |
| Economic GSL 3601- Gefrierschrank | Bosch, Stuttgart |
| Kühlschrank (4 °C) | Bosch, Stuttgart |
| Universal 320- Zentrifuge | Hettich, Frankenberg |
| Reax 2000 Schüttler Shaker Vortexer | Heidolph, Schwabach |
| Nanodrop 1000 (Photometer) | PegLab, Erlangen |
| Gelkammer und Gelkämme (groß) | PegLab, Erlangen |
| Gelkammer und Gelkämme (klein) | Biorad, Hercules, USA |
| Thermocycler T100 | Biorad, Hercules, USA |
| Thermomixer C | Eppendorf, Hamburg |
| Thermocycler MasterCycler | Eppendorf, Hamburg |
| Thermocycler C 1000 Touch | Biorad, Hercules, USA |
| PowerPac™ Basic Power Supply | Biorad, Hercules, USA |
| VXR basic Vibrax® | IKA, Staufen |
| PyroMark Q24 System | Qiagen, Hilden |
| Intellowave-Mikrowelle | LG, Ratingen |
| Milli-Q® Reinstwassersystem | (Millipore) Merck, Darmstadt |
| Tischzentrifuge 1,5/2 ml | Fischerbrandt, Darmstadt |
| Tischzentrifuge 0,2 ml | Carl Roth, Karlsruhe |
| Präzisionsheizplatte PZ 28-1 ET | STÖRK-TRONIC, Stuttgart |
| Kamm (Pyromark Q24) | Qiagen, Hilden |
| Arbeitsplatte (Pyromark Q24) | Qiagen, Hilden |
| Magnetrührer RCT | IKA, Staufen |
| 2x Plattenhalter (Pyromark Q24) | Qiagen, Hilden |
| Cartridge (Pyromark Q24) | Qiagen, Hilden |
| Racks | Carl Roth, Karlsruhe |
| Gelschlitten (groß) | PegLab, Erlangen |
| Gelschlitten (klein) | Biorad, Hercules, USA |
| Pipetten (1-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl) | Eppendorf, Hamburg |
| Messzylinder (verschiedene Größen) | Schott, Mainz |
| Multiscan GO | ThermoScientific, Darmstadt |
| pH Meter InLab Routine Pro | Mettler-Toledo, Gießen |
| BioDoc Analyze | Biometra, Göttingen |
| Mehrkanalpipette | Eppendorf, Hamburg |

2. Material

| | |
|----------------------|---------------------------------|
| LICOR-ODYSSEY | LI-COR BIOSCIENCES, Bad Homburg |
| Schüttler MS 3 basic | IKA, Staufen |
| Vakuumpumpe 2511 Dry | Welch by Gardner Denver, USA |

2.5 Verbrauchsgegenstände

Tabelle 5 Verbrauchsgegenstände

| | |
|-----------------------------------|-----------------------------------|
| Reaktionsgefäße 2 ml | Sarstedt AG & Co. KG, Nürmbrecht |
| Reaktionsgefäße 1,5 ml | Sarstedt AG & Co. KG, Nürmbrecht |
| Reaktionsgefäße 0,2 ml | Sarstedt AG & Co. KG, Nürmbrecht |
| Nitril-Handschuhe Größe M | Ansell, Richmond, Australien |
| Pipettenspitzen | Nerbe plus, Winsen |
| Autoklavierbeutel | Nerbe plus, Winsen |
| Falcon 15ml | Greiner, Kremsmünster, Österreich |
| Falcon 50ml | Greiner, Kremsmünster, Österreich |
| 96-Well-Platte (Pyromark Q24) | Qiagen, Hilden |
| Lösungswannen (Pyromark Q24) | Qiagen, Hilden |
| Mehrkanalpipettenspitzen | Eppendorf, Hamburg |
| 96-Well-Platte (RT-qPCR) | Biozym, Oldendorf |
| Folie (96-Well-Platte) | Biozym, Oldendorf |
| Hydrophober Parafilm | Bemis, Neenah |
| Hydrophobe Platten (Pyromark Q24) | Qiagen, Hilden |
| Klebeband-Durapore | 3M, Saint Paul, USA |

2.6 Enzyme und zugehörige Puffer

Tabelle 6 Enzyme und zugehörige Puffer

| | |
|------------------------------------|-----------------------------|
| <i>2x MyTaq HS MIX</i> | Bioline, London |
| Pyromark PCR-Mastermix (2x) | Qiagen, Hilden |
| CoralLoad-Concentrate (10x) | Qiagen, Hilden |
| IQ™ SYBR® Green Supermix | Biorad, München |
| RNasin® Ribonuclease Inhibitor | Promega, Mannheim |
| <i>M-MLV Reverse Transcriptase</i> | Promega, Mannheim |
| M-MLV Reverse Transcriptase-Buffer | Promega, Mannheim |
| Fast Digest Tail (FD1144) | ThermoScientific, Darmstadt |
| Fast Digest Green Buffer (10x) | ThermoScientific, Darmstadt |
| Enzymmix (Pyromark Q24) | Qiagen, Hilden |
| Substratmix (Pyromark Q24) | Qiagen, Hilden |

2.7 Primer

2.7.1 Primer RT-qPCR

Tabelle 7 Primer RT-qPCR

| Gen | Sequenz bzw. Hersteller | Produktlänge (in bp) | Referenz |
|---|---|----------------------|----------------------|
| Homo sapiens tachykinin precursor 1 (<i>TAC1</i>) | MM-RTPCR-TAC1-F1: CGACCAGATCAAGGAGGAACTG MM-RTPCR-TAC1-R1: CAGCATCCCGTTTGCCATT | 110 | O'Connor et al. 2004 |

2. Material

| | | | |
|---|--|-----|----------------------|
| Homo sapiens tachykinin receptor 1 (<i>TACR1</i>) | MM-RTPCR-TACR1-F1: TCTCCACTAACACCTCGGAACC MM-RTPCR-TACR1-R1: CAGCTGCCCAAAGGACAATT | 69 | O'Connor et al. 2004 |
| Homo sapiens nerve growth factor (<i>NGF</i>) | MM-RTPCR-NGF-F1: CCCATCCCATCTTCCACAGG MM-RTPCR-NGF-R1: GGTGGTCTTATCCCCAACCC | 74 | Takano et al. 2017 |
| Homo sapiens prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (<i>PTGS2</i>) | HY-RTPCR-PTGS2-F1: GCTGTTCCCACCCATGTCAA HY-RTPCR-PTGS2-R1: AAATTCCGGTGTTGAGCAGT | 116 | Hang Yang, (Gießen) |
| Homo sapiens C-C motif chemokine ligand 3 (<i>CCL3</i>) | MM-RTPCR-CCL3-F1: TGGCTCTCTGCAACCAGTTCT MM-RTPCR-CCL3-R1: GTAGCTGAAGCAGCAGGCG | 68 | Towson et al. 2002 |
| Homo sapiens calcitonin related polypeptide alpha (<i>CALCA</i>) | MM-RTPCR-CALCA-F1: TTGCCCAGAAGAGAGCCTGTG MM-RTPCR-CALCA-R1: TTGTTCTTCACCACACCCCCTG | 91 | Minatani et al. 2016 |
| Homo sapiens calcitonin receptor like receptor (<i>CALCRL</i>) | MM-RTPCR-CALCRL-F1: TGCAAGACCCCATCAACAAG MM-RTPCR-CALCRL-R1: TTCCAGCAGAGCCATCCATC | 70 | Minatani et al. 2016 |
| Homo sapiens C-C motif chemokine ligand 2 (<i>CCL2</i>) | MM-RTPCR-CCL2-F2: AAACTGAAGCTCGCACTCTCG MM-RTPCR-CCL2-R1: TTGATTGCATCTGGCTGAGCG | 115 | Ghoryani et al. 2019 |
| Homo sapiens neurotrophic receptor tyrosine kinase 1 (<i>NTRK1</i>) | MM-RTPCR-NTRK1-F2: TTTGGCATGAGCAGGGATATC MM-RTPCR-NTRK1-R1: GTCGCTCTCGGTGGTGAAC | 123 | Ginsberg et al. 2006 |
| Homo sapiens interleukin 1 beta (<i>IL1B</i>) | MM-RTPCR-IL1 β -F1: ACAGATGAAGTGCTCCTTCCA MM-RTPCR-IL1 β -R1: GTCGGAGATTCTAGCTGGAT | 78 | Li et al. 2004 |
| Homo sapiens tumor necrosis factor (<i>TNF</i>) | MM-RTPCR-TNF α -F1: GCCCATGTTGTAGCAAACCC MM-RTPCR-TNF α -R1: TATCTCTCAGCTCCACGCCA | 97 | Nahidi et al. 2015 |
| Homo sapiens glycerol-dehyde-3-phosphate dehydrogenase (<i>GAPDH</i>) | HY-RTPCR-GAPDH-F1: GCAAATCCATGGCACCGT HY-RTPCR-GAPDH-R1: TCGCCCCACTTGATTTTGG | 106 | Hang Yang, Gießen |
| Homo sapiens SLC6A4 solute carrier family 6 member 4 (<i>SLC6A4</i>) | MM-RTPCR-SLC6A4-F1: TCACAGTGCTCGGTTACATGGC MM-RTPCR-SLC6A4-R1: GAAAGTGGACGCTGGCATGTTG | 68 | Origene |
| <i>S100A12</i> S100 calcium binding protein A12 | Sino Biological | 176 | Sino Biological |

2. Material

| | | | |
|--|-----------------|-----|-----------------|
| <i>RAGE</i> Receptor For Advanced Glycation End-Products | Sino Biological | 144 | Sino Biological |
| <i>CALCRL</i> Calcitonin receptor like receptor | Sino Biological | 130 | Sino Biological |

2.7.2 Primer Pyrosequenzierung

Tabelle 8 **Primer Pyrosequenzierung**

| | | |
|---|--|-------------------|
| Hs_PTGS2_02_PM PyroMarkCpG assay, GeneGlobe Catalog No. PM00000532 | Analysierte Sequenz: CTTTTCTTCTTCGCAGTC TTTGCCCGAGCGCTTCCGA PCR-Produkt=211 bp | Qiagen, Hilden |
| Hs_NGF_01_PM PyroMark CpG assay, GeneGlobe Catalog No. PM00002618 | Analysierte Sequenz: CGGTCTGGCGAGCTCTCT GGTTACCCCGAGGCTCCCGC PCR-Produkt=211 bp | Qiagen, Hilden |
| Hs_SLC6A4_01_PM PyroMark CpG assay, GeneGlobe Catalog No. PM00065625 | Analysierte Sequenz: CCCCGACACACACACGCTC GCAGGGAGGAGCGGAGCGCGGA PCR-Produkt=156 bp | Qiagen, Hilden |
| Hs_OPRM1_01_PM PyroMark CpG assay, GeneGlobe Catalog No. PM00024794 | Analysierte Sequenz: TTGCTGGCGTTYGTGGGGRCAGCGC PCR-Produkt=229 bp | Qiagen, Hilden |
| Hs_TRPA1_02_PM PyroMark CpG assay, GeneGlobe Catalog No. PM00035336 | Analysierte Sequenz: TCTGGGGGCTCGCGGGTCTGGAGG GGTTCCGACGTGCGGGCGGGGGTCTG PCR-Produkt=148 bp | Qiagen, Hilden |
| Hs_CALCA_01_PM PyroMark CpG assay, GeneGlobe Catalog No. PM00046445 | Analysierte Sequenz: CGCYGTCCCTGATCGCACCGTCTGCGGA PCR-Produkt=144 bp | Qiagen, Hilden |

2.7.3 Primer COBRA

Tabelle 9 **Primer COBRA**

| | | |
|--|---|--|
| NN-HU-COBRA- <i>TNF</i> α -Reverse Primer | Invitrogen, Darmstadt Sequenz: AAACTAACCAAACACTCACCTCTTC | Produktgröße in Basenpaaren (bp)=223 |
| NN-HU-COBRA- <i>TNF</i> α -Forward Primer | Invitrogen, Darmstadt Sequenz: TTTTTTGGAAAGGATATTATGAGTATTG | Produktgröße in Basenpaaren (bp)=223 |

2.8 Vollständig bereitgestellte Kits

Tabelle 10 **Vollständig bereitgestellte Kits**

| | |
|--|------------------|
| ab179886 Human MCP1 SimpleStep ELISA® Kit | Abcam, Cambridge |
| ab193760 beta Nerve Growth Factor (beta NGF) Human SimpleStep ELISA® Kit | Abcam, Cambridge |
| ab282299 Human S100A12 SimpleStep ELISA® Kit | Abcam, Cambridge |

3. Methoden

| | |
|--|-------------------------|
| ab214569 Human MIP1a SimpleStep ELISA® Kit | Abcam, Cambridge |
| ab221828 Human Procalcitonin ELISA Kit | Abcam, Cambridge |
| ab190807 Human RAGE ELISA Kit | Abcam, Cambridge |
| Human/Mouse/Rat CGRP-I EIA Kit | RayBio®, Peachtree Corn |
| EZ DNA Methylation Kit | ZymoResearch, Freiburg |

2.9 Software

Tabelle 11 **Software**

| | |
|-----------------------------|---------------------------------------|
| BioDoc Analyze | Biometra, Göttingen |
| BioRad CFX | BioRad, München |
| IBM SPSS Statistics 27 | IBM, Armonk, USA |
| Image Studio Version 5.2.5 | LI-COR BIOSCIENCES, Bad Homburg |
| Microsoft Office | Microsoft, Redmond, USA |
| NanoDrop 1000 Version 3.8.1 | PeqLab, Erlangen |
| GraphPad PRISM Version 8.0 | graphpad software inc, San Diego, USA |
| ScanIT Re Version 6.0.1 | ThermoScientific, Darmstadt |
| Pyromark Q24 | Qiagen, Hilden |

3. Methoden

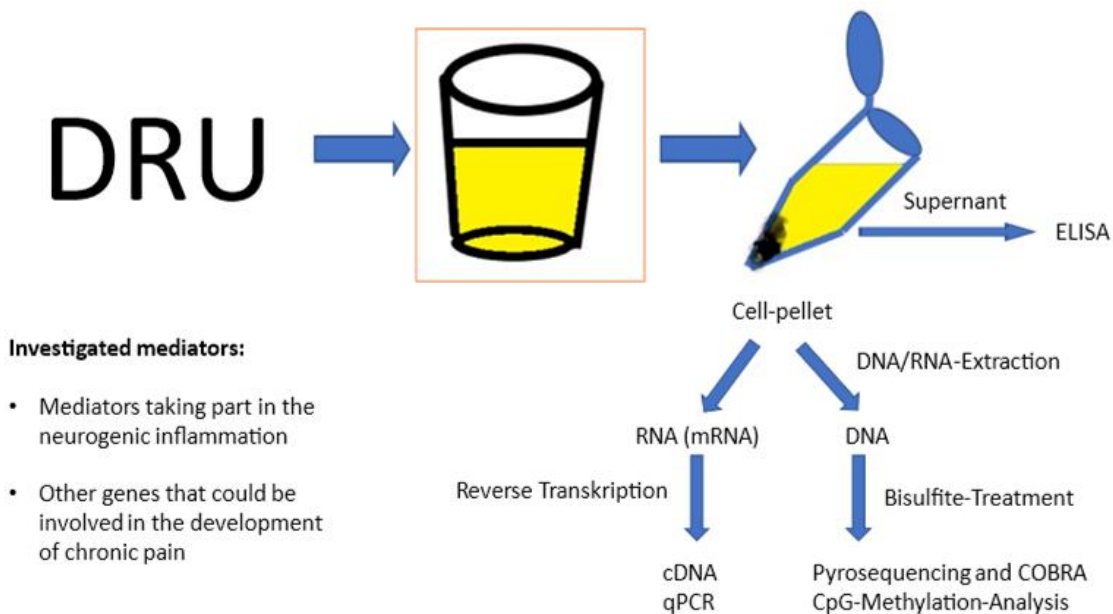


Abbildung 3 **Ablaufplan der Versuche an ExUr**. Übersichtsfolie zum Ablauf der labortechnischen Schritte. Dargestellt ist der Studienablauf für ExUr. Nach Prostatamassage/Digital-rektaler-Untersuchung (DRU) wurde der anschließend gewonnene ExUr zentrifugiert. Ein hierbei isoliertes Zellpellet wurde zur Extraktion von DNA und RNA genutzt. Nach Reverser Transkription führten wir Genexpressionsanalysen mittels RT-qPCR durch. Die DNA wurde nach Bisulfite Treatment für Promotormethylierungsanalysen mittels COBRA und Pyrosequenzierung verwendet. Den Urinüberstand nutzen wir für Proteinkonzentrationsmessungen mittels ELISA.

Zur Übersicht über den Versuchsablauf an ExUr soll Abb. 3 dienen. Der Großteil der Versuche wurde an ExUr durchgeführt. Lediglich einige Messungen der Calcium- und Proteinkonzentration stützten sich auf Blut und Ejakulat. Je nach verfügbarem Material und labortechnischen Möglichkeiten untersuchen wir die epigenetische Regulation

3. Methoden

einzelner Mediatoren auf der DNA-, RNA- und Proteinebene. Zur Untersuchung der Regulation auf DNA-Ebene bestimmten wir im Rahmen der Studie zunächst den Methylierungsstatus verschiedener Promotorregionen mittels Pyrosequenzierung und Combined Bisulfite Restriction Analysis, kurz COBRA. Anschließend führten wir eine Analyse der Genexpression mittels Reverser Transkription und anschließender quantitative Polymerase Kettenreaktion (RT-qPCR) durch und bestimmten die Proteinkonzentration in ExUr, Seminalplasma und Blutserum mit ELISA.

3.1 Gewinnung und Lagerung der Fluid Biopsies (ExUr, Ejakulat und Blut)

Nach Durchführung einer Prostatamassage wurden die ersten 25 ml Urin in einem Falcon-Tube gesammelt und umgehend ins Labor gebracht. Dort wurden sie für 20 min bei 13000 rpm zentrifugiert, wodurch sich am Boden des Falcons ein Zellpellet bildete. Dieses enthielt neben Zellen des ableitenden Harntrakts vor allem jene Zellen, welche im Zuge der Prostatamassage aus der Prostata in die Harnröhre gelangten. Anschließend wurde das Zellpellet vom restlichen Urinüberstand getrennt. Es wurde hierzu in ein 2 ml Tube überführt, während der Urinüberstand in einem 25 ml Falcon verblieb. Zellpellet und Urinüberstand wurden nun separat bei -80 °C gelagert.

Die Gewinnung des Ejakulats erfolgte mittels Masturbation und wurde in einem 50 ml Falcon aufgefangen. Eine vorherige sexuelle Karenzzeit von mindestens 5 Tagen wurde mit teilnehmenden Patienten und gesunden Probanden vereinbart. Das Ejakulat wurde unmittelbar durch die Technischen Assistentinnen weiterverarbeitet. Hierbei erfolgte die Erstellung eines Spermioграмms nach WHO-Kriterien. Das verbleibende Ejakulat wurde bei Raumtemperatur für 5 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Zellpellet und flüssiger Überstand, das sogenannte Seminalplasma, konnten nun getrennt werden. Das Seminalplasma wurde für die anschließenden Versuche zu mehreren 100 µl-Ansätzen aliquotiert und separat bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Die Blutabnahme erfolgte mittels Butterfly-System. Anschließend wurde jede Probe bei 13000 rpm für 10 min zentrifugiert. Der flüssige Überstand, das Blutserum, konnte anschließend extrahiert werden und wurde bei -80 °C gelagert.

3.2 Gewinnung von Epithelzellen und Leukozyten aus Ejakulat- und ExUr-Pellet

Im ersten Teil der Doktorarbeit arbeiteten wir mit Epithelzellen und Leukozyten aus ExUr- und Ejakulat-Pellets. Die Isolierung dieser Zellen erfolgte mittels Magnetic Activated Cell Sorting (MACS). Dieser Teil der Versuche wurde durch den PhD-Student Hang Yan durchgeführt und soll hier somit nur grob erklärt werden. Für tiefergehende Informationen sei auf dessen Dissertation verwiesen. Die Isolierung der Zellen mittels MACS basierte auf Antikörper-beschichteten Kügelchen (CD45 für Leukozyten und CD326 für

3. Methoden

Epithelzellen). Nach mehreren Zwischenschritten konnte eine Separierung der Zellen durch ein Magnetfeld erfolgen. Zur Verifizierung von MACS verwendeten wir ein Gemisch aus PC3-Zellen (Epithelzellen) und THP-1-Zellen (Leukozyten). Die anschließende Prüfung erfolgte lichtmikroskopisch anhand des Fluoreszenzsignals nach Behandlung mit Antikörpern gegenüber den Oberflächenmarkern: CK8/18/19 und CD45. Nach Isolierung der Leukozyten- und Epithelzell-Pellets erfolgte die DNA- und RNA-Extraktion analog zum Vorgehen bei Zellpellets aus ExUr, wie unten beschrieben.

3.3 DNA/RNA-Extraktion aus ExUr-Pellets

Die Extraktion von DNA und RNA aus dem eingefrorenen Zellpellet umfasste mehrere Schritte, die über zwei Tage hinweg erfolgten. Zunächst wurde das Zellpellet auf Trockeneis langsam auf Raumtemperatur erwärmt und für 20 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Nachdem sich erneut alle Zellen in Form eines Zellpellets auf dem Boden des Tubes abgesetzt hatten, konnte der verbliebene Urinüberstand oberhalb der Pellets verworfen werden. Anschließend wurden 200 µl Chloroform und 1000 µl Trifast auf das Zellpellet gegeben und durch Vortexen vermischt. Das Tube wurde nun für 5 min bei Raumtemperatur stehen gelassen, während sich bereits zwei Phasen ausbildeten. Anschließend folgte eine weitere Zentrifugation bei 13000 rpm für 10 min, in der sich die beiden Phasen nun endgültig voneinander trennten. Die obere wässrige Phase enthielt nun die gelöste RNA, während die untere Phenolphase hauptsächlich Protein beinhaltete. Zwischen den beiden Phasen befand sich eine dritte Phase aus weißen Schlieren, die sogenannte Interphase. Im Zuge der weiteren Extraktion wurde die obere wässrige Phase vollständig in ein 1,5 ml Tube überführt. Die verbliebene Interphase wurde gemeinsam mit der Phenolphase für die DNA-Extraktion im 2 ml Tube belassen.

Im folgenden Schritt wurden der RNA-Phase 500 µl 100 %-Isopropanolol zugeben sowie 20 µl NaAc und 5 µl Glykogen. Simultan wurden der DNA-Phase 600 µl 100 % Ethanol zugeben, sowie 20 µl NaAc und 5µl Glykogen. Die DNA- und RNA-enthaltenden Tubes wurden über Nacht bei -20 °C inkubiert und anschließend bei 13000 rpm für 20 min zentrifugiert. Der über den dadurch entstehenden Pellets befindliche Überstand wurde verworfen. Die Pellets wurden mit 70 % Ethanol gewaschen und für 5 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Der ethanolhaltige Überstand wurde verworfen. Beide Pellets wurden nun bei Raumtemperatur für 5 min getrocknet, bis das Ethanol verdampft war. Im Anschluss wurden sie in 20 µl DEPC-H₂O (RNA) oder 30 µl dd-H₂O (DNA) gelöst.

Je nach Patientenprobe variierte die Größe des Zellpellets teilweise sehr deutlich. Dies führt im Verlauf zu Konzentrationsunterschieden zwischen den einzelnen Proben. Da in den folgenden Versuchen mit fest definierten RNA- und DNA-Mengen gearbeitet wurde,

3. Methoden

war es notwendig, die jeweilige RNA- und DNA-Konzentration zu bestimmen. Durch die Verwendung unterschiedlicher Volumina konnten nun Konzentrationsunterschiede ausgeglichen werden, die im Laufe der Experimente zu Verzerrungen geführt hätten.

Die Konzentrationsbestimmung erfolgte durch eine spektrometrische Messung mittels NanoDrop. Hierbei wurde die Absorption von 1µl der Probe bei einer Wellenlänge von 260nm bestimmt. Zuvor wurde das Gerät unter Einbeziehung eines spezifischen Extinktionskoeffizienten geeicht, welcher zwischen RNA und DNA variiert. Auf dieser Grundlage errechnete der Nanodrop die RNA- bzw. DNA-Konzentration der Proben.

3.4 Analyse der Genexpression

3.4.1 Reverse Transkription

Um anschließend die Expression bestimmter Gene bestimmen zu können, nutzten wir die Technik der Reversen Transkription (RT). Diese Technik ermöglichte es Genexpressionen auf mRNA-Ebene für bestimmte Gene mithilfe der RT-qPCR darzustellen. Die Reverse Transkription schrieb zunächst mRNA in complementary-DNA (cDNA) um. Diese wurde anschließend für die Messung der Genexpression mittels RT-qPCR genutzt. Hierbei wurde ein bestimmtes Enzym, die *Moloney Maus Leukämie Virus-Reverse Transkriptase (MMLV-RT)*, verwendet. Für die Durchführung der RT verwendeten wir folgendes 11µl Mastermix:

| | |
|-----------------|-----|
| MMLV-Buffer | 4µl |
| dNTPs | 5µl |
| Hexamer-Primer | 1µl |
| Oligo-dT-Primer | 1µl |

Anschließend wurde die RNA diesem Mastermix hinzugegeben. Um sicherzugehen, dass für jede Probe dieselbe Menge RNA für die Umschreibung in cDNA verwendet wurde, erfolgte eine Hochrechnung des jeweils benötigten Volumens auf 600ng RNA. Im nächsten Schritt wird das Gesamtvolumen für jeden Ansatz auf 20µl mit dd-Wasser aufgefüllt. Hierfür nutzten wir die folgende Formel: $9\mu\text{l} - \text{Volumen RNA in } \mu\text{l} = X \mu\text{l dd-H}_2\text{O}$. Anschließend folgte eine 10-minütige Inkubation des Ansatz bei 65 Grad Celsius. Jeder Probe wurden 0,5 µl RNase-Inhibitor und 1 µl *RT-Polymerase* hinzugefügt und nach folgendem Protokoll inkubiert. Die entstandene cDNA wurde bei -20 °C gelagert.

| | |
|-----------------|-------|
| 42 Grad Celsius | 60min |
| 90 Grad Celsius | 5min |
| 4 Grad Celsius | ∞ |

3.4.2 Genexpressionsanalyse mittels RT-qPCR

Um Genexpressionen in einzelnen Proben zu ermitteln, nutzten wir die RT-qPCR. Hierzu wurde eine gängige PCR durchgeführt, die um einige weitere Funktionen ergänzt war. Im SYBR-GREEN-Mastermix, den wir für die Durchführung unserer RT-qPCR nutzten, war ein ungebunden-vorliegender Farbstoff enthalten, der an doppelsträngige DNA (dsDNA) band und daraufhin zu fluoreszieren begann. Dieses Fluoreszenzsignal konnte durch eine Kamera detektiert werden und wurde nach jedem Zyklus der PCR bestimmt. Die Software untersuchte anschließend, nach wie vielen Zyklen der PCR ein bestimmter Schwellenwert überschritten wurde. Ab diesem Schwellenwert hob sich das Fluoreszenzsignal vom Grundrauschen vorheriger Messungen ab. Es folgte eine exponentielle Zunahme des Fluoreszenzsignals bis gegen Ende der RT-qPCR ein Plateau erreicht wurde. Den Punkt, an dem der Schwellenwert überschritten wurde, bezeichnet man als sogenannten CT-Wert. Dieser Wert wurde für jede Probe in Doppelbestimmung ermittelt, um das Risiko etwaiger Fehlmessungen zu minimieren.

Die Qualität der RNA in unterschiedlichen Proben konnte trotz Messung mittels NanoDrop variieren. Da somit nicht immer die exakt selbe Menge intakter cDNA umgeschrieben wurde, benötigten wir eine Referenz, um eine Verzerrung zu bereinigen. Hier eignete sich die Verwendung sogenannter Housekeeper-Gene. Diese Gene werden in nahezu allen Zelltypen unabhängig von Erkrankungen in gleichem Maße exprimiert. Der Anteil der transkribierten mRNA dieses Housekeeper-Gens an der gesamten mRNA war also von Probe zu Probe ungefähr identisch. Durch die RT-qPCR wurde neben den zu untersuchenden Genen also für jede Probe immer ein Housekeeper-Gen mituntersucht. Die ermittelten CT-Werte der untersuchten Gene wurden anschließend ins Verhältnis zum CT-Wert dieses Housekeeper-Gens gesetzt. Hierbei wurde eine möglichst optimale Ausschaltung von Unterschieden im Ausgangsmaterial erzielt. Im Rahmen der Studie verwendeten wir als Housekeeper-Gen *GAPDH*.

Im Vergleich zur gängigen PCR ist die RT-qPCR um einen weiteren Schritt ergänzt. Nach Abschluss der 45 PCR-Zyklen, bestehend aus Annealing-, Elongation- und Denaturationsphase, folgte eine weitere Phase. Hierbei wurde ein fest definierter Temperaturgradient durchlaufen, der sich von 65 bis 90 °C erstreckte. Die Temperatur wurde ausgehend von 65 °C in Abständen von 15 s jeweils um 0,5 °C erhöht. Anschließend wurde jeweils eine Detektion der Fluoreszenz mittels Fluoreszenzkamera vorgenommen. Der zugrundeliegende Gedanke für dieses Vorgehen bestand darin, dass dsDNA bei einer ganz bestimmten Temperatur seine Doppelbindung aufgibt und zu zwei Einzelsträngen zerfällt. Da der im Mastermix enthaltene Farbstoff nur an dsDNA binden konnte, wurde er durch diese Denaturierung freigesetzt und es kam zu einem

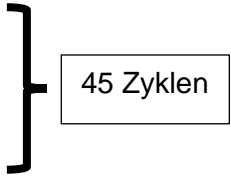
3. Methoden

Fluoreszenzsignal. Diese Fluoreszenzsignale entstanden immer bei derselben, für den Strang spezifischen Temperatur und werden als Melting Curve bezeichnet. Ursächlich sind die spezifischen chemischen und physikalischen Eigenschaften von DNA-Strängen aufgrund ihrer unterschiedlichen Basensequenz. Hieraus schlossen wir, ob eine PCR das gewünschte DNA-Produkt amplifizierte. Im Verlauf entfiel hierdurch die Überprüfung jeder PCR mittels Agarosegel.

Bei Testung neuer Primer wurde zu Beginn der Versuche mittels Agarosegel-Elektrophorese untersucht, welche Basenlänge die PCR-Produkte auf Agarose-Gel aufwiesen. Hierbei wurde verglichen, ob die prognostizierte Länge mit der Länge des Produkts auf dem Gel übereinstimmt. Stimmt die Längen überein, wurde fortan die zuvor ermittelte Melting Curve als Maß dafür genutzt, ob die RT-qPCR funktionierte oder nicht. Im Zweifelsfall führten wir bei uneindeutigen Melting Curves eine Agarosegel-Elektrophorese durch, um die PCR gegebenenfalls zu wiederholen.

Im Zuge der Studie verwendeten wir unter anderem Primer, die entweder aus Publikationen anderer Forschungsgruppen stammten oder durch unsere Forschungsgruppe designt wurden. Vor Verwendung dieser Primer prüften wir mittels der Primer Blast-Software des NCBI, ob der zu amplifizierende DNA-Strang tatsächlich mit dem gewünschten Gen übereinstimmt und ob der Primer spezifisch für das Gen war. Darüber hinaus verwendeten wir lediglich Exon-überspannende Primer, da diese nur mRNA amplifizierten und etwaige DNA-Verunreinigungen die Ergebnisse nicht verfälschten. Ursächlich war die fehlende Bindungsstelle der Primer auf DNA-Strängen aufgrund der dort enthaltenen Introns. Die Primer, der zuvor explorierten Sequenzen wurden anschließend über ThermoFisher bestellt. Die molare Masse eines Primers wurde mit 10 multipliziert und um das errechnete Volumen dd-H₂O ergänzt. Der dadurch entstandene 10X-Ansatz wurde vor Verwendung in der RT-qPCR mit dd-H₂O weiter auf 1X verdünnt. Die RT-qPCR erfolgte mit dem folgenden 10µl RT-qPCR-Mix und Schema:

| | |
|-------|--------|
| 95 °C | 5 min |
| 95 °C | 30 s |
| 60 °C | 30 s |
| 72 °C | 30 s |
| 72 °C | 10 min |



45 Zyklen

| | |
|----------------------|--------|
| SYBR-GREEN-Mastermix | 5 µl |
| dd-Wasser | 3 µl |
| Forward-Primer | 0,5 µl |

3. Methoden

| | |
|----------------|--------|
| Reverse Primer | 0,5 µl |
| cDNA | 1 µl |

Die Berechnung der Genexpression erfolgte mittels der Delta-Delta-Ct-Methode ($\Delta\Delta Ct$). Hierbei wurde zunächst für jede Probe die Differenz der CT-Werte des analysierten Gens und des Housekeeper-Gens gebildet: $\Delta Ct = Ct(\text{analysiertes Gen}) - Ct(\text{Housekeeper-Gen})$. Anschließend wurde der $\Delta\Delta Ct$ gebildet. Dazu wurde der Mittelwert aller ΔCt -Werte aus den Proben der Kontrollgruppe gebildet und anschließend von den ΔCt -Werten jeder Probe subtrahiert: $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct(\text{Probe}) - \Delta Ct(\Delta Ct\text{-Mittelwert der Kontrollgruppe})$. Um nun die Genexpression des analysierten Gens zu berechnen, wurde der $\Delta\Delta Ct$ in die folgende Formel eingesetzt: $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

3.4.3 Agarosegel-Elektrophorese

Um zu überprüfen, ob das im Zuge einer PCR entstandene Produkt dem gewünschten Produkt entsprach, führten wir eine Elektrophorese mittels 2 %-Agarosegel durch. Die DNA-Stücke wanderten abhängig von ihrer Größe unterschiedlich schnell durch ein Agarosegel, nachdem daran eine elektrische Spannung angeschlossen wurde. Im elektrischen Feld bewegte sich DNA aufgrund ihrer eigenen negativen Ladung immer in Richtung des Plus-Pols. Kleine DNA-Stränge waren in der Lage, schneller durch das kleinporige Gel zu wandern als Größere. Durch diese Eigenschaft entstanden im Gel verschiedene Banden, die jeweils DNA-Stränge unterschiedlicher Größe repräsentierten. Neben den PCR-Produkten ließen wir im Gel immer eine sogenannte Hyperladder mitlaufen, die als Kontrollbande diente. Darin waren festdefinierte DNA-Fragmente unterschiedlicher Größe enthalten. Diese dienten als Referenz für die Größe der einzelnen DNA-Banden der PCR-Produkte. So verglichen wir, ob die prognostizierte Größe des PCR-Produkts mit dem tatsächlich amplifizierten Produkt übereinstimmte.

Um ein 2 %-Agarosegel herzustellen, wurden zunächst 2 g Agarose in 100 ml 1X TAE-Puffer gelöst und anschließend mittels Mikrowelle für 1 bis 2 min erhitzt. Bevor das Gel anschließend zum Trocknen in die entsprechend mit Gel-Kämmen vorbereitete Kammer gegossen wurde, fügten wir 3µl Ethidiumbromid hinzu. Nach 30-minütigem Trocknen war das Gel bereit für die Verwendung in der Elektrophorese. Hierzu wurde die Kammer zunächst mit 1X TAE-Puffer aufgefüllt. Im nächsten Schritt wurden 3 µl des PCR-Produktes mit 2,5 µl Orange G durch Auf- und Abpipettieren vermischt. Orange G ist ein Azofarbstoff, den wir zur Überwachung der PCR-Produkte während der Elektrophorese nutzten. Anschließend wurde das Gemisch aus Orange G und PCR-Produkt in die

3. Methoden

Geltaschen des Agarosegels überführt und die Elektrophorese gemäß den folgenden Einstellungen gestartet: 30 min, 130 mV, 300 mA, 300 W.

Nach Abschluss der Elektrophorese wurde das Gel unter UV-Licht mittels LICOR analysiert. Hierbei nutzten wir die fluoreszierenden Eigenschaften von Ethidiumbromid nach Bindung an DNA. Im Zuge der LICOR-Messung wurde so die Fluoreszenz der einzelnen DNA-Banden dargestellt. Nun war die Verifizierung der PCR-Produkte möglich. Der Ansatz für die Herstellung von 1 l des 10X TAE-Puffers lautete wie folgt:

| | |
|-------------|---------|
| TRIS-Puffer | 48,4 g |
| Eisessig | 11,42 g |
| EDTA 0,5Mol | 20 ml |
| dd-Wasser | 500 ml |

Dieser Ansatz wurde unter Verwendung eines pH-Meters auf einen pH-Wert von 8,2 eingestellt. Hierzu wurde initial der pH-Wert des Ansatzes gemessen und unter ständiger Kontrolle mittels pH-Meter feinjustiert. Die Feinjustierung erfolgte unter Hinzugabe von NaOH und HCl bis ein pH-Wert von 8,2 vorlag. Zum Abschluss wurde der Ansatz auf insgesamt 1 l mit dd-H₂O aufgefüllt. Für die Verwendung in der Elektrophorese und zur Herstellung eines Gels wurde der Ansatz weiter um den Faktor 1:10 mit ddH₂O verdünnt.

3.5 Analyse der Promotormethylierung

Neben der Analyse der Genexpression auf RNA-Ebene untersuchten wir die Regulation unterschiedlicher Gene auf DNA-Ebene. Hierbei analysierten wir sogenannte CpG-Inseln in der Promotorregion auf deren Methylierung. Eine Hypermethylierung in dieser Region kann zu einer Herabregulation der Transkription des folgenden Gens führen. Durch eine Hypomethylierung kommt es dementsprechend zu einer verstärkten Expression des Gens. Im Zuge der Methylierung wird Cytosin zu Methyl-Cytosin. Um zu untersuchen, ob in der entsprechenden CpG-Region nun unmodifiziertes Cytosin oder Methyl-Cytosin vorliegt, können verschiedene labortechnische Verfahren genutzt werden. Wir verwendeten im Rahmen der Studie mit COBRA und Pyrosequencing zwei unterschiedliche Techniken. Beiden Techniken ist gemein, dass ihnen eine sogenannte Bisulfit-Behandlung vorausgeht. Durch diese Konvertierung kam es bei unmodifiziertem Cytosin zu einer hydrolytischen Desaminierung und es entstand Uracil. Diese Reaktion war jedoch nicht möglich, wenn ein Cytosin zuvor bereits als Methyl-Cytosin vorlag. In diesem Fall lag Methyl-Cytosin auch nach Konvertierung noch als Methyl-Cytosin vor. Nach Abschluss der Bisulfit-Konvertierung folgte eine PCR, in welcher der zu untersuchende DNA-Abschnitt amplifiziert wurde. Wurde ein unmethyliertes Cytosin

3. Methoden

zuvor im Rahmen der Konvertierung zu Uracil desaminiert, so wurde es im Rahmen der PCR zu Thymin umgeschrieben. Methyliertes Cytosin wurde hierbei wie auch unmodifiziertes Cytosin zu Guanin umgeschrieben. Eine Darstellung dieser Basensequenz-Unterschiede war mittels COBRA und Pyrosequenzierung möglich.

3.5.1 Bisulfit-Konvertierung

Vor der eigentlichen Promotormethylierungsanalyse erfolgte zu Beginn die Behandlung der DNA mit Bisulfit. Dabei handelte es sich um einen Prozess aus mehreren Schritten, der sich über 2 Tage erstreckte und eine 16-stündige Inkubation beinhaltete. Bei dem verwendeten Kit handelte es sich um das EZ DNA Methylation-Kit von ZymoSpin. Zunächst wurde in einem ersten Schritt das CT-Covergent-Reagent hergestellt. Das von ZymoSpin bereitgestellte Reagenz wurde mit 750 µl dd-H₂O und 210 µl M-Dilution-Buffer aufgelöst. Dafür wurde es bei Raumtemperatur für 10 min bei 1100 rpm auf der Schüttelplatte belassen. Die Menge des dadurch entstandenen CT-Covergent-Reagent konnte für die Bisulfit-Konvertierung von 11 Proben verwendet werden. Parallel wurde ein Ansatz aus DNA und M-Dilution-Buffer vorbereitet. Hierfür wurden zunächst in ein 200 µl Eppendorf-Tube 5 µl M-Dilution-Buffer gegeben und anschließend 1000 ng DNA hinzugegeben. Das dafür benötigte Volumen wurde analog zu dem Vorgehen bei der RT nach der folgenden Formel errechnet: $1000 \text{ ng/Konzentration DNA ng/}\mu\text{l} = X \mu\text{l DNA}$

Anschließend wurde das Gesamtvolumen des Ansatzes auf 50 µl aufgefüllt. Die zugehörige Formel lautete: $45 \mu\text{l} - \text{Volumen benötigte DNA in Y } \mu\text{l} = X \mu\text{l dd-H}_2\text{O}$

Der entsprechende Ansatz wurde gut vermischt und für 15 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde jeder DNA-Ansatz mit 100 µl des vorbereiteten CT-Covergent-Reagents vermischt und über Nacht für 16 Stunden bei 50 °C inkubiert. Während dieser Inkubation erfolgte die oben beschriebene chemische Reaktion der eigentlichen Bisulfit-Konvertierung und es entstand bisulfitbehandelte DNA (BS-DNA). Am nächsten Tag folgte in mehreren Schritten die Extraktion und weitere Reinigung der BS-DNA. Zunächst wurden die bereitgestellten ZymoSpin IC Columns in einem dafür vorgesehenen Sammelgefäß platziert und mit 400 µl M-Binding-Buffer befüllt. Anschließend wurde der vollständige Ansatz der zuvor konvertierten BS-DNA hinzupipettiert und durch Schwenken mit dem M-Binding-Buffer vermischt. Nun folgte eine 30-sekündige Zentrifugation bei 13000 rpm. Im Anschluss wurde der Durchfluss aus dem Sammelbehälter verworfen und es folgte ein Waschschriff. Hierzu wurden 100 µl des bereitgestellten M-Wash-Buffer in das Column gegeben und bei 13000 rpm für 30 s zentrifugiert. Im nächsten Schritt folgte eine Inkubation mit M-Desulphonation-Buffer. Dazu wurden 200 µl des Puffers in das Column gegeben und für 20 min bei

3. Methoden

Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurde wieder für 30 s bei 13000 rpm zentrifugiert. Bevor abschließend die BS-DNA isoliert werden konnte, schlossen sich zwei Waschzyklen an. Hierbei wurden jeweils 200 µl M-Washbuffer in das Column gegeben und bei 13000 rpm zentrifugiert. Für den letzten Schritt wurde das Column in einem 1,5 ml Eppendorf-Tube platziert und 20 µl M-Elution-Buffer auf die Filtersäule pipettiert. Es folgte eine letzte 30-sekündige Zentrifugation bei 13000 rpm. Die gelöste BS-DNA wurde nun bei -20 °C gelagert.

3.5.2 Promotormethylierungsanalyse mittels Pyrosequenzierung

Zur quantitativen Analyse des Methylierungsstatus unterschiedlicher CpG-Regionen verwendeten wir die Pyrosequenzierung. Bei dieser Technik wurde unter Zuhilfenahme von Biolumineszenz eine Sequenzierung des zu untersuchenden DNA-Abschnitts durchgeführt. Im Zuge dieser Sequenzierung wurde quantitativ bestimmt, welcher Prozentsatz Cytosin in der zugrundeliegenden CpG-Region methyliert vorlag. Zuvor musste der entsprechende DNA-Abschnitt mittels PCR vervielfältigt werden. Anschließend folgte die eigentliche Pyrosequenzierung. Hierzu wurden insgesamt zwei verschiedene Primerpaare benötigt. Zum einen das Primerpaar, welches zur Amplifizierung des DNA-Abschnitts mittels PCR verwendet wurde, zum anderen ein Primerpaar, das im Zuge der eigentlichen Sequenzierung zum Einsatz kam. Wegen der Biotinylierung der PCR-Primer lag auch der amplifizierte DNA-Strang biotinyliert vor, was in der Folge von Bedeutung war. Vor Verwendung der Primer im PCR- und Sequenzierungsabschnitt wurden diese entsprechend der Anleitung aufgelöst. Für die PCR-Primer wurden zum Auflösen jeweils 550 µl TE-Puffer verwendet. Der dabei entstehende 10X-Primeransatz konnte direkt der PCR zugeführt werden. Zum Auflösen der Sequenzierungsprimer wurden je 1175 µl Annealing-Buffer verwendet. Der nach Auflösung vorliegende 10X-Primeransatz wurde für die Sequenzierung mit Annealing-Buffer auf 1X verdünnt. Für die PCR wurden neben der bisulfitbehandelten DNA und den beiden Primern zwei weitere Reagenzien benötigt: ein Mastermix und einen Coral-Load, der neben seiner Puffereigenschaft auch das direkte Auftragen des PCR-Produkts auf ein Gel ermöglichte. Die PCR verlief mit folgendem 25µl Ansatz und Schema:

| | |
|-----------------------------|---------|
| Pyromark PCR Mastermix (2x) | 12,5 µl |
| Primeransatz (10x) | 2,5 µl |
| Coral Load (10x) | 2,5 µl |
| BS-DNA | 3 µl |
| dd-H ₂ O | 4,5 µl |

3. Methoden

| | |
|-------|--------|
| 95 °C | 5 min |
| 95 °C | 30 s |
| 60 °C | 30 s |
| 72 °C | 30 s |
| 72 °C | 10 min |

} 45 Zyklen

Im Anschluss wurden 5µl des PCR-Produkts auf ein Agarosegel gegeben, um zu überprüfen, ob die PCR für alle Proben funktionierte. Falls im Zuge der Gelelektrophorese die Bande einer Probe zu schwach oder überhaupt nicht vorhanden war, wiederholten wir die PCR für die jeweilige Probe mit einer größeren BS-DNA-Menge im PCR-Ansatz: 5 µl BS-DNA und 2,5 µl dd-H₂O. Bis zur abschließenden Verwendung im Zuge der Pyrosequenzierung wurden die PCR-Produkte bei -20 °C gelagert. Nach Verifizierung mittels Gelelektrophorese folgte die eigentliche Pyrosequenzierung. Hierfür wurden zunächst einige Vorbereitungen getroffen. Die Wärmeplatte wurde auf 80°C erhitzt. Weitere später benötigte Reagenzien (dNTP, Enzymmix, Substratmix und PCR-Produkte) wurden langsam auf Raumtemperatur erwärmt. Parallel wurden Stationen des Pyromark mit den zugehörigen Lösungen befüllt: zwei Stationen mit dd-Wasser, eine Station mit 70 % Ethanol, eine Station mit Denaturation-Buffer und eine Station mit 1X Wash-Buffer. Anschließend wurde das Programm der jeweiligen Pyrosequenzierung mit der Probenaufteilung auf einem USB-Stick gespeichert und auf den Pyromark übertragen. Die PyroMark-Software berechnete die später benötigten Volumina für dNTP, Enzymmix und Substratmix. Gemeinsam mit dem Plattensetup wurde das spezifische Datenblatt ausgedruckt und diente als Anleitung für die folgenden Schritte.

Anschließend folgte die Übertragung der PCR-Produkte auf 34 µm Streptavidin-Sapharose-Beads (SSB). Dieser Schritt wurde vollzogen, um die Proben zuverlässig aufzureinigen. Wir machten uns hierbei die Tatsache zunutze, dass die BS-DNA aufgrund ihrer Biotinylierung sehr affin für Bindungen an Streptavidin ist und somit daran immobilisiert wurde. Der Ansatz für die Bindung der BS-DNA an SSB verlief wie folgt. Zunächst wurde ein 1500 µl Ansatz für 25 Proben hergestellt:

| | |
|------------------------------|---------|
| Binding-Buffer | 1000 µl |
| dd-H ₂ O | 400 µl |
| Streptavidin-Sapharose-Beads | 100 µl |

Nach einer sorgfältigen Vermischung durch Auf- und Abpipettieren, wurden jeweils 60 µl des Sammelansatz auf eine 96-Well-Platte überführt. Dabei wurden pro Durchlauf je 24

3. Methoden

Wells mit dem Sammelansatz vorbereitet. Anschließend wurden je 20 µl der PCR-Produkte hinzugegeben und die Platte durch eine Folie verschlossen. Es folgte eine 10-minütige Inkubation auf der Schüttelplatte bei 1200 rpm. Im Zuge dieser Inkubation erfolgte die Kopplung von biotinylierter DNA an die SSB.

Während der Inkubation wurde eine Patrone mit den berechneten Volumina an dNTPs, Enzymmix und Substratmix gemäß den Berechnungen des ausgedruckten Datenblattes befüllt. Zudem wurde in der Zwischenzeit die stark hydrophobe Q24-Sequencing-Platte mit den für die Pyrosequenzierung notwendigen Sequenzierungsprimern befüllt.

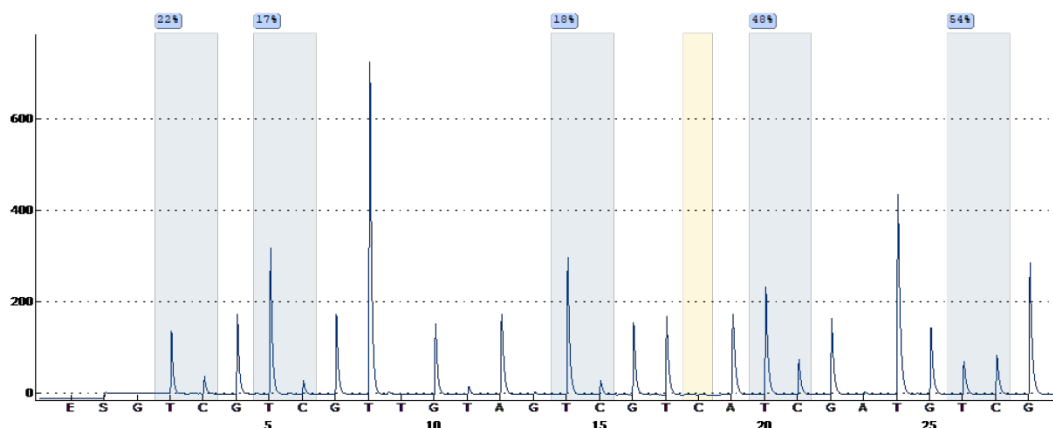
Nach Abschluss der 10-minütigen Inkubation folgte die letzte Aufarbeitung der Proben vor der Sequenzierung. Im Zuge dieser Aufarbeitung wurde der zuvor inkubierte Ansatz vollständig durch eine Vakuumpumpe angesaugt. Das Ansaugen erfolgte über 24 einzelne Filterstifte, wobei jeder Stift einem bestimmten Well und somit einer spezifischen Probe zugeordnet war. Da die 34 µm messenden SSB samt biotinylierter DNA zu groß waren, um die Filterstifte zu passieren, lagerten sie sich zu kleinen Häufchen auf der Spitze der Filterstifte zusammen. Diese waren auch mit bloßem Auge erkennbar. Nun wurden bei laufender Vakuumpumpe die Filterstifte in eine Reihe verschiedener Lösungen eingetaucht, um die Proben weiter aufzureinigen. Zunächst erfolgt ein Waschschrift in 70 % Alkohol für 5 s, ein Schritt für 5 s in Denaturation-Buffer und zuletzt ein 15-sekündiger Schritt in Wash-Buffer. Nun wurden die Filterstifte über die vorbereitete Q24-Sequencing-Platte gehalten und die Vakuumpumpe ausgeschaltet. Die Filterstifte wurden in die Wells der Platte abgesenkt und die Beads durch starkes Schütteln von den Filterstiften gelöst. Die so präparierte Sequenzierungsplatte wurde für 2 min auf der Wärmeplatte bei 80 °C inkubiert, um eine Bindung der Sequenzierungsprimer an die DNA zu ermöglichen. Daraufhin folgte eine 5-minütige Inkubation bei Raumtemperatur.

Nun wurde die Sequenzierungsplatte in die zugehörige Vorrichtung des PyroMark gestellt und das auf dem USB-Stick gespeicherte Programm wurde gestartet. Entsprechend der Sequenz, der zu untersuchenden DNA, wurden nacheinander dNTPs gemeinsam mit Enzym- und Substratmix aus der befüllten Patrone auf die Sequenzierungsplatte appliziert. Es erfolgte eine Amplifizierung der zu untersuchenden DNA-Stränge. Die Technik, die wir uns hierbei zunutze machten, basiert auf Biolumineszenz. Jedes Mal, wenn ein dNTP in ein Well gegeben wurde und durch die im Enzymmix vorhandenen Polymerasen in den DNA-Strang eingebaut wurde, entstand Pyrophosphat. Dieses wurde freigesetzt und durch die ebenfalls im Enzym-Mix befindliche *Adenosintriphosphat-Sulfurylase* in ATP umgewandelt. ATP stellte nun das

3. Methoden

Substrat für die letzte entscheidende chemische Reaktion dar. Im Zuge dieser Reaktion katalysierte die Luciferase, die Reaktion von Luciferin mit ATP, zu einem energiereicheren, aber auch sehr instabilen Produkt. Bei Zerfall dieses Produkts kam es zur Freisetzung von Licht, welches mit einer Kamera detektiert wurde. Aufgrund der eben genannten Reaktionsabläufe bestand ein direkt proportionaler Zusammenhang zwischen der Menge an eingebauten dNTPs und dem abschließend detektierten Licht. Auf dieser Basis konnte ein Rückschluss auf die Sequenz der amplifizierten DNA erfolgen und mittels Pyrosequenzierung eine quantitative Aussage über die Methylierung der entsprechenden Promotorabschnitte getroffen werden.

Die Darstellung der Ergebnisse erfolgte, wie in Abb. 4 gezeigt, mit Angabe der Methylierung in %. Repräsentativ sei hier die Promotorregion von CALCA dargestellt. Die fünf blau markierten Regionen stellen die auf Methylierung untersuchten Cytosine dar. Im Fall der dargestellten Probe 58 zeigten sich die Positionen 1 bis 5 wie folgt methyliert: Pos 1: 22 %, Pos 2: 17 %, Pos 3: 18 %, Pos 4: 48 % und Pos 5: 54 %. Wir analysieren sowohl einzelne Positionen als auch die durchschnittliche Methylierung über alle Positionen. Probe 58 wies somit eine durchschnittliche Methylierung von 31,8 % auf.



Sequence to analyze:

YGTGGTTTTGATYGTATYGTTTGCGGA

| Position | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|----------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Quality | Passed | Passed | Passed | Passed | Passed |
| Meth (%) | 22 | 17 | 18 | 48 | 54 |

Abbildung 4 **Auswertung Pyrosequencing.** Die Graphik zeigt die Pyrosequenzierung anhand von Probe 58. Anhand der Ausschläge bei den einzelnen Nucleotiden und der jeweiligen Höhe kann auf die Sequenz des untersuchten DNA-Strangs geschlossen werden. Die blau markierten Areale repräsentieren die Positionen, an denen Cytosin methyliert vorliegen kann. Entsprechend der gemessenen Lichtreaktion errechnet die Software, basierend auf dem detektierten Signal, eine Methylierung in %, die für jede Position einzeln abgelesen werden kann.

3.5.3 Combined bisulfite restriction analysis (COBRA)

Neben der quantitativen Analyse von Promotorregionen führten wir im Fall von *TNF α* eine weitere Technik durch, die eine semiquantitative Aussage über die Methylierung

3. Methoden

eines CpG-Areals ermöglicht. Im Gegensatz zur Pyrosequenzierung war keine Aussage über die prozentuale Methylierung möglich. Es wurde bei der Analyse lediglich in nicht-methyliert, schwach methyliert und stark methyliert unterschieden. Wir nutzten im Fall von *TNF α* diese Technik zum einen, weil keine Primerpaare für die quantitative Analyse mittels Pyrosequenzierung verfügbar waren. Zum anderen war eine COBRA für diese CpG-Region bereits an Ejakulat- und Blutproben in unserer Forschungsgruppe etabliert.

Ähnlich wie bei der Pyrosequenzierung ging auch der eigentlichen COBRA eine PCR der BS-DNA voraus. Auch hier machten wir uns die oben beschriebenen chemischen Reaktionen der DNA nach Bisulfit-Behandlung zu Nutze. Zunächst erfolgte ein DNA-Verdau mittels *Tail*. Hierbei handelt es sich um ein Restriktionsenzym, welches immer an der exakt gleichen DNA-Sequenz schneidet. Dadurch kam es zu einer Fragmentierung der DNA-Stränge in mehrere kleine Stücke. Im Fall von *Tail* wurde die Pallindromsequenz ACGT erkannt und die DNA direkt hinter der Base Thymin zerschnitten. Wie bereits erklärt, kommt es nach der Bisulfit-Konvertierung zu Unterschieden in der Basensequenz je nach Methylierungsstatus. Während nicht-methylierte DNA-Abschnitte nach PCR als ATGT vorlagen und folglich nicht durch *Tail* verdaut wurden, so lagen methylierte DNA-Abschnitte nach PCR als ACGT vor und wurden im Zuge des Verdau fragmentiert. Je stärker die DNA methyliert war, desto intensiver fiel die Fragmentierung der entsprechenden Probe aus. Die Unterschiede in der Fragmentierung konnten nach dem Verdau mittels Agarose-Gelelektrophorese dargestellt werden. Dies erfolgte nach visuellem Eindruck.

Initial arbeiteten wir mit der DNA-Polymerase *myTaq* Bionline. Da sich jedoch zeigte, dass diese Polymerase nicht sensitiv genug für die geringen Mengen BS-DNA aus ExUr-Pellets ist, wechselten wir auf den *HS-MyTaq-Mix* von Bionline. Zunächst wurde der folgende 25 μ l Ansatz pipettiert und das dargestellte PCR-Programm durchlaufen:

| | |
|-------|--------|
| 95 °C | 5 min |
| 95 °C | 30 s |
| 60 °C | 30 s |
| 72 °C | 30 s |
| 72 °C | 10 min |
| 95 °C | 5 min |

} 45 Zyklen

| | |
|--------------------------|--------------|
| <i>HS-MyTaq-Mix</i> (2x) | 12,5 μ l |
| Forward-Primer | 1 μ l |

3. Methoden

| | |
|----------------|--------------|
| Reverse-Primer | 1 μ l |
| BS-DNA | 10,5 μ l |

Falls Proben nicht unmittelbar dem folgenden Versuchsteil zugeführt wurden, erfolgte eine Lagerung bei -20 °C für maximal 2 Tage. Nach PCR erfolgte wie üblich eine Überprüfung der PCR-Produkte mittels Agarosegel-Elektrophorese. Hierzu wurden 5 μ l PCR-Produkt mit 2,5 μ l Orange G vermischt. Falls die PCR bei einer Probe nicht funktionierte, wiederholten wir diese mit doppelter Menge BS-DNA (Anhang Figure 1).

Im Anschluss an diese Verifizierung führten wir einen Verdau der PCR-Produkte mit *Tail* durch. Für jede Probe wurde neben dem Ansatz mit dem Restriktionsenzym auch immer ein zweiter Ansatz getestet, der als Negativkontrolle fungierte und kein *Tail* enthielt. Neben den regulären Proben führten wir bei jeder PCR sowie dem folgenden Verdau die Prostatakarzinom-Zelllinien DU145 oder PC3 mit. Sie dienten während der COBRA als Positivkontrolle, da sie im Zuge des Verdau eine vollständige Methylierung zeigten.

Für alle ExUr-Pellet-Proben wurde der folgende 10ul-Verdau durchgeführt:

| | Tail-Verdau | Tail-Verdau-Negativkontrolle |
|------------------------------|-------------|------------------------------|
| PCR-Produkt | 8 μ l | 8 μ l |
| <i>Tail</i> -Fast-Digest(2x) | 1 μ l | - |
| FastDigestGreenBuffer(10x) | 1 μ l | 1 μ l |
| dd-Wasser | - | 1 μ l |

Für alle Prostatakarzinom-Zelllinien nutzten wir den folgenden Ansatz mit weniger PCR-Produkt, da die Qualität der DNA in diesem Probenmaterial deutlich höher war:

| | Tail-Verdau | Tail-Verdau-Negativkontrolle |
|------------------------------|-------------|------------------------------|
| PCR-Produkt | 4 μ l | 4 μ l |
| <i>Tail</i> -Fast-Digest(2x) | 1 μ l | - |
| FastDigestGreenBuffer(10x) | 1 μ l | 1 μ l |
| dd-Wasser | 4 μ l | 5 μ l |

Der Ansatz wurde einer 30-minütigen Inkubation bei 65 °C zugeführt und im letzten Schritt auf ein Agarosegel aufgetragen (siehe Abb. 5). Anschließend erfolgte die Einteilung des Verdau verblindet gegenüber der Gruppenzugehörigkeit nach visuellem Eindruck. Eine Unterteilung in nicht-fragmentiert, leicht-fragmentiert und stark-fragmentiert war hierdurch möglich. In der obigen Abbildung sind die Ergebnisse eines

3. Methoden

Verdau beispielhaft dargestellt. Hier ist zu sehen, dass im Fall der Prostatakarzinom-Zelllinie DU145 eine vollständige Fragmentierung stattfand. In der mit (-) gekennzeichneten Negativkontrolle ist noch das PCR-Produkt mit einer Basenlänge von 223 bp zu erkennen. Im zugehörigen Verdauprodukt (+) verschwand die entsprechende Bande vollständig und es bildeten sich neue Banden kleinerer Basenlänge. Der Verdau wurde in diesem Fall als vollständig verdaut und dementsprechend als vollständig-methyliert bezeichnet. Neben DU145 wurden auf das Gel weitere Proben aus der gesunden Kontrollgruppe aufgetragen. Im Fall von Probe 72 kam es zu keinem Verdau in der Positivkontrolle (+), da sich im Vergleich zur Negativkontrolle (-) keine neuen Banden kürzerer Basenlänge auf dem Gel darstellten. Die Probe wurde folglich als nicht verdaut und somit nicht-methyliert bezeichnet. Demgegenüber zeigten sich bei Probe 45 im Verdau (+) zahlreiche neue Banden kürzerer Basenlänge und die ursprüngliche Bande bei 223 bp stellte sich im Vergleich mit der zugehörigen Negativkontrolle (-) deutlich intensitätsgemindert dar. Die Probe wurde dementsprechend als stark fragmentiert beziehungsweise stark-methyliert kategorisiert. Für Probe 78 zeigte sich nur eine leichte Fragmentierung (leichte Methylierung) im Vergleich von Verdau (+) zu Negativkontrolle (-). Die Kategorisierung erfolgte entsprechend, da nur eine weitere kleine DNA-Bande kürzerer Basenlänge im Verdau zu sehen war. Im Verdau besaß die Bande bei 223 bp noch fast die gleiche Intensität wie die Bande in der Negativkontrolle.

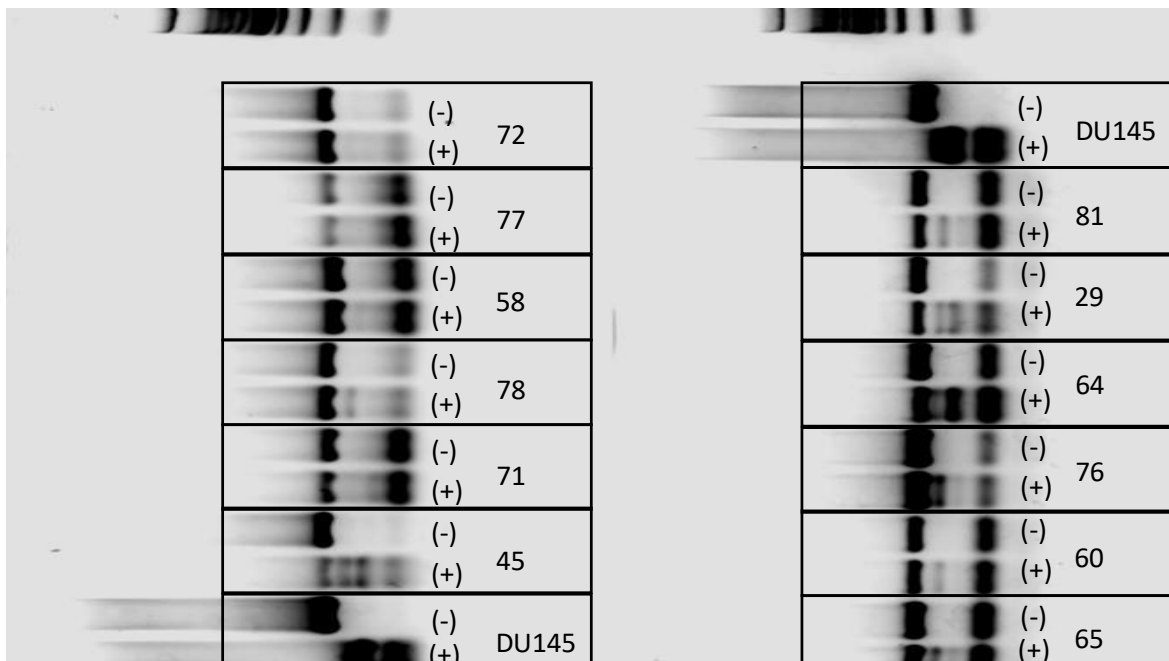


Abbildung 5 **Agarosegel-Elektrophorese der COBRA von *TNF α*** . In der Abbildung ist eine Agarosegel-Elektrophorese nach COBRA von *TNF α* dargestellt. Es wurden je 10 μ l Verdauprodukt (+) und unverdaute Negativkontrolle (-) mehrerer Proben auf Agarosegel aufgetragen. Nun wurde die Fragmentierung im Verdau mit der Negativkontrolle verglichen. Exemplarisch wurden vier der Proben wie folgt bewertet: DU145 vollständig-fragmentiert, Probe 45 stark-fragmentiert, Probe 78 leicht-fragmentiert und Probe 58 nicht-fragmentiert.

3.6 Proteinmessung mittels Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Nach den Analysen der Regulationen auf DNA- und RNA-Ebene schlossen sich Proteinkonzentrationsmessungen mittels ELISA an. Wir verwendeten hierzu SimpleStep ELISA-Kits von Abcam für Messungen an ExUr, Seminalplasma und Blutserum. Bei allen verwendeten SimpleStep ELISA-Kits handelte es sich um sogenannte Sandwich-ELISA. Diese folgten im Versuchsablauf dem gleichen Schema. Zunächst wurden die Proben auf eine mit Antikörpern vorbeschichtete 96-Well-Platte aufgetragen. Anschließend wurde ein Cocktail aus zwei verschiedenen Antikörpern hinzu pipettiert, bestehend aus dem Capture- und dem Detector-Antikörper. Beide Antikörper waren in der Lage, das zu untersuchende Protein mit ihren Fab-Fragmenten zu binden. Dadurch entstand die namensgebende Sandwich-Form, bei der sich die Antikörper von beiden Seiten wie ein Sandwich an das Protein binden. Während der Capture-Antikörper mit seinem Fc-Fragment an die 96-Well-Platte gebunden wurde, befand sich am Fc-Fragment des Detector-Antikörpers ein gebundenes Enzym, die sogenannte Meerrettichperoxidase (kurz HRP). Diese ist in der Lage, den Farbstoff 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (kurz TMB) zu einem bläulichen Produkt umzuformen. Durch Hinzugabe einer schwefelhaltigen Stop-Lösung wurde die Peroxidasereaktion unterbunden und es fand eine Farbreaktion von blau zu gelb statt. Anschließend wurde die Lichtstärke der Proben mittels Photometer bestimmt. Hierbei existierte für jeden ELISA ein jeweiliger Zusammenhang zwischen der Proteinkonzentration im Medium und der ermittelten Leuchtstärke. Dieser Zusammenhang wurde durch eine Standardverdünnungsreihe ermittelt, welche die Grundlage für die Berechnung der Proteinkonzentrationen darstellte. Vor Beginn des Versuchs wurde diese Standardverdünnungsreihe bei jedem ELISA neu aufgesetzt und wie für alle Proben in Doppelbestimmung durchgeführt. Hierfür wurde zunächst das bereitgestellte lyophilisierte Protein auf der Schüttelplatte für 10 min in Sample Diluent NS aufgelöst. Die Ansätze der Verdünnungsreihen lauteten wie folgt:

CCL2: Auflösung von lyophilisiertem Protein in 100 µl Sample Diluent NS, wodurch eine Stammlösung mit einer Konzentration von 4000 pg/ml entstand. Währenddessen wurden acht 2 ml Eppendorf-Tubes durchnummeriert und in Nummer 1 370 µl Sample Diluent NS sowie Nummer 2 acht 150 µl Sample Diluent NS pipettiert. Anschließend wurden 30 µl der Stammlösung in Tube Nummer 1 pipettiert und für 10 s gevortext.

NGF: Auflösung von lyophilisiertem Protein in 100 µl Sample Diluent NS, wodurch eine Stammlösung mit einer Konzentration von 17,5 ng/ml entstand. Währenddessen wurden acht 2 ml Eppendorf-Tubes durchnummeriert und in Nummer 1 450 µl Sample Diluent NS sowie Nummer 2 acht 150 µl Sample Diluent NS pipettiert. Anschließend wurden 50 µl der Stammlösung in Tube Nummer 1 pipettiert und für 10 s gevortext.

3. Methoden

S100A12: Auflösung von lyophilisiertem Protein in 500 µl Sample Diluent NS, wodurch eine Stammlösung mit einer Konzentration von 20.000 pg/ml entstand. Währenddessen wurden acht 2 ml Eppendorf-Tubes durchnummeriert und in Nummer 1 390 µl Sample Diluent NS sowie Nummer 2 acht 150 µl Sample Diluent NS pipettiert. Anschließend wurden 10 µl der Stammlösung in Tube Nummer 1 pipettiert und für 10s gevortext.

CCL3: Auflösung von lyophilisiertem Protein in 338 µl Sample Diluent NS, wodurch eine Stammlösung mit einer Konzentration von 200 pg/ml entstand. Währenddessen wurden acht 2 ml Eppendorf-Tubes durchnummeriert und in jedes Tube 150 µl Sample Diluent NS pipettiert. Anschließend wurden 150 µl der Stammlösung in Tube Nummer 1 pipettiert und für 10 s gevortext.

Im Folgenden wurden bei allen Standardverdünnungsreihen jeweils 150 µl aus der jeweils vorherigen Tube der Reihe nach von Nummer 1 bis Nummer 7 in das folgende Tube pipettiert und durch Vortexen vermischt. Tube Nummer 8 blieb frei von Protein und bildete bei der folgenden ELISA-Messung eine Leerkontrolle. Durch dieses Vorgehen entstand eine Verdünnungsreihe in von Nummer 1 bis 7 absteigenden Konzentrationen. Neben der Präparation der Standardverdünnungsreihe wurden vor Beginn des ELISA noch der Antikörper-Cocktail sowie der Waschpuffer vorbereitet. Die im Folgenden aufgeführten Mengen sind jeweils auf eine Durchführung des ELISA mit 48 Wells bezogen. Für den Waschpuffer wurden dafür zunächst 5 ml des 10X Waschpuffer in 45 ml dd-Wasser zu 1X Waschpuffer verdünnt. Für die Herstellung von 3 ml Antikörper-Cocktail wurden 2,4 ml Antikörper-Diluent in ein 25 ml Falcon gegeben und anschließend jeweils 300 µl Detector-Antikörper und 300 µl Capture-Antikörper hinzupipettiert und durch Vortexen vermischt.

Nach Abschluss dieser Vorbereitungen wurden 50 µl der jeweiligen Probe in ein Well gegeben. Wir führten alle ELISA-Messungen in Doppelbestimmung durch. Die Messungen an ExUr für CCL2 und NGF sowie an Blutseren für CCL3 wurden unverdünnt durchgeführt. Für S100A12 war eine vorherige Verdünnung mit dd-H₂O von 1:200 im Blutserum und 1:250 bis zu 1:1000 im Seminalplasma notwendig. Anschließend wurden 50 µl des vorbereiteten Antikörper-Cocktails zu jeder Probe hinzugegeben und es folgte eine 1-stündige Inkubation auf der Schüttelplatte mit 400 rpm. Nun wurde die Flüssigkeit aus den Wells durch Ausklopfen entfernt. Daraufhin folgten drei Waschschrte mit je 350 µl Waschpuffer/Well. Im Anschluss wurde dieser durch Ausklopfen entfernt. Im nächsten Schritt wurde in jedes Well 100 µl der TMB-Farblösung pipettiert, wodurch es zu einem bläulichen Farbumschlag kam. Es folgte eine 10-minütige Inkubation auf der Schüttelplatte bei 400 rpm. Die Platte wurde hierbei mit Alufolie vor direktem Lichtkontakt

3. Methoden

geschützt. Nach Abschluss der Inkubation wurden zusätzlich 100 µl Stop-Lösung in jedes Well pipettiert, um die Farbreaktion zu unterbinden. Abschließend folgte die photometrische Messung der Absorption bei 450 nm. Die mittels Standardverdünnungsreihe erzeugte Funktion wurde durch die Software CurveExpert ermittelt und zur Berechnung der Proteinkonzentrationen verwendet.

3.7 Messung der Calciumkonzentrationen im Seminalplasma

Zur Messung von Calciumkonzentrationen im Seminalplasma verwendeten wir das Calcium Assay Kit (Colorimetric) (ab102505) von Abcam. Dem Versuch lag eine chromogene Reaktion zugrunde. Diese war in ihrer Intensität abhängig von der vorliegenden Konzentration freier Calciumionen. Analog zu den bereits beschriebenen Proteinmessungen mittels ELISA wurde zu Versuchsbeginn jeweils eine Standardverdünnungsreihe angesetzt. Zunächst wurden 500 µl eines 5 mM Calcium Standards hergestellt, indem 5 µl einer bereitgestellten 500 mM Calcium-Lösung in 495 µl dd-Wasser gelöst wurden. Anschließend wurden für die Standardverdünnung fünf 2 µl-Tubes mit je 6 µl, 12 µl, 18 µl, 24 µl und 30 µl des 5 mM Calcium Standards befüllt und auf jeweils insgesamt 150 µl mit dd-Wasser aufgefüllt. Ein sechstes Tube wurde lediglich mit dd-H₂O befüllt und diente bei den folgenden Messungen als Blank. Parallel wurden die Seminalplasmen auf Raumtemperatur erwärmt. Für jede Probe wurde ein 50 µl Ansatz erstellt, indem je 20 µl Seminalplasma mit 30 µl dd-Wasser verdünnt wurden. Nun wurden sowohl die Standardverdünnungsreihe inklusive Blank als auch die Seminalplasma-Ansätze auf die 96-Well-Platte aufgetragen. Im Anschluss wurden zu jedem Well 90 µl eines Chromogenic Reagent und 60 µl eines Calcium Assay Buffer hinzugefügt. Es folgte eine 10-minütige lichtgeschützte Inkubation auf der Schüttelplatte. Nach 10 min erfolgte eine Messung der Absorption im Photometer bei 575 nm. Mittels Curve Expert wurden mittels Standardverdünnungsreihe die Calciummengen in µg/Well ermittelt, welche wir folgendermaßen in Calciumkonzentrationen umrechneten: (Calciummengen in µg/Well / Seminalplasma in µl/Well) * Verdünnungsfaktor

3.8 Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung der Versuche nutzten wir IBM SPSS Statistics 27 und GraphPad PRISM Version 8.0. Zunächst prüften wir mittels Kolmogorov-Smirnov-Test und Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung. Aufgrund der geringen Fallzahl zeigten sich unsere Datensätze nicht normalverteilt. Zur Testung der Signifikanz in den anschließenden Berechnungen verwendeten wir den Mann-Whitney-U-Test. Bei Abweichungen von diesem Vorgehen, erfolgte eine Darstellung im jeweiligen Ergebnisteil. Für die Korrelationsanalysen verwendeten wir Spearman-Rho, da eine Normalverteilung in unseren Datensätzen nicht gegeben war.

4. Ergebnisse

Zunächst führten wir Untersuchungen an einer großen unselektierten CP/CPPS-Kohorte durch, um das heterogene Kollektiv von CP/CPPS-Patienten möglichst vollständig abzubilden. Die Ergebnisse aus diesem Abschnitt der Studie sind unter 4.1 dargestellt. Aufgrund des erheblichen Altersunterschiedes zwischen den beiden Kohorten schlossen wir dieser Untersuchung eine weitere Analyse mit Matching gegenüber dem Alter an. Assoziationen mit der in CP/CPPS vorbeschriebenen Subfertilität sollen so möglichst unverfälscht dargestellt werden. Die Ergebnisse aus diesem Abschnitt der Studie finden sich unter 4.2. Im abschließenden Teil der Studie führten wir einige Untersuchungen an einer selektionierten Patientenkohorte mit höchsten Schmerzen durch, um den Faktor Schmerz genauer zu analysieren. Dieser Studienabschnitt ist unter 4.3 dargestellt.

4.1 Gesamtanalyse CP/CPPS

4.1.1 Charakterisierung des gesamten Studienkollektivs anhand von Fragebögen, Spermogramm und Labordiagnostik

Insgesamt schlossen wir 267 CP/CPPS-Patienten und 151 Kontrollpersonen in die Studie ein. Der Altersmedian der Patientenkohorte lag bei 39,13 Jahren und in der Kontrollgruppe bei 27,75 Jahren. Das Alter der Patienten reichte von 16 bis 68 Jahren, während bei den Gesunden eine Spannweite von 19 bis 60 Jahren vorlag. Zunächst erfolgte eine Charakterisierung des Studienkollektivs mit Fragebögen (siehe Tabelle 12). Im Anschluss erstellten wir ein Spermogramm gemäß WHO-Kriterien (siehe Tabelle 13). Die Patienten unterzogen wir zudem einer weiteren Labordiagnostik (siehe Tabelle 14).

Tabelle 12 **Ergebnisse der andrologischen Fragebögen.** In der folgenden Tabelle sind die Ergebnisse der andrologischen Fragebögen aufgezeigt. Analysiert wurden der CPSI (Chronic Prostatitis Symptome Index), der IPSS (International Prostate Symptome Score) und der IIEF (International Index of Erectile Function). Ermittelt wurden jeweils die Fallzahl (n), der Median und die Spannweite sowie die Signifikanz (p) im Mann-Whitney U-Test.

| Fragebogen | CP/ CPPS | | | Kontrollgruppe | | | p |
|--|----------|--------|------------|----------------|--------|------------|------|
| | n | Median | Spannweite | n | Median | Spannweite | |
| IPSS | 222 | 11 | 0-45 | 101 | 2 | 0-15 | ,000 |
| CPSI-Kategorie1 Schmerz-Symptomatik | 232 | 12 | 0-19 | 146 | 0 | 0-10 | ,000 |
| CPSI-Kategorie2 Miktions-Symptomatik | 232 | 3 | 0-10 | 146 | 1 | 0-8 | ,000 |
| CPSI-Kategorie3 Einfluss auf die Lebensqualität | 232 | 9 | 1-12 | 146 | 0 | 0-6 | ,000 |
| CPSI-Gesamtpunktzahl | 232 | 24 | 3-40 | 146 | 1 | 0-19 | ,000 |
| IIEF | 130 | 28 | 5-30 | 59 | 29 | 8-30 | ,066 |

4. Ergebnisse

Tabelle 13 **Charakterisierung der CP/CPPS- und Kontrollkohorte mittels Spermogramm.** In der folgenden Tabelle sind die Ergebnisse der Spermogramme abgebildet. Ermittelt wurden die Fallzahl (n), der Median und die Spannweite sowie die Signifikanz (p) im Mann-Whitney U-Test.

| | CP/CPPS | | | Gesunde | | | p |
|--------------------------|---------|--------|------------|---------|--------|-------------|------|
| | n | Median | Spannweite | n | Median | Spannweite | |
| Volumen (ml) | 267 | 2,5 | 0,15-8,5 | 150 | 3,1 | 0,45-10 | ,000 |
| pH-Wert | 266 | 8,00 | 6,8-9,3 | 150 | 8,30 | 7,2-8,8 | ,000 |
| Spermien-Dichte(Mio/ml) | 265 | 55 | 0-566,5 | 150 | 45,8 | 1,6-256,5 | ,167 |
| Spermien-Anzahl (Mio) | 265 | 133,8 | 0-2002,00 | 148 | 170,4 | 3,5-1415,15 | ,112 |
| Sperm-Mot.A (%) | 263 | 19 | 0-54 | 150 | 37 | 0-72 | ,000 |
| Sperm-Mot.B (%) | 263 | 28 | 0-55 | 150 | 22 | 3-52 | ,000 |
| Sperm-Mot.C (%) | 263 | 8 | 0-30 | 150 | 11 | 1-29 | ,000 |
| Sperm-Mot.D (%) | 262 | 41 | 0-100 | 150 | 26 | 10-82 | ,000 |
| Progressive Spermien (%) | 264 | 50 | 0-76 | 150 | 60 | 4-86 | ,000 |
| Vitalität (%) | 75 | 58 | 4-89 | 130 | 87 | 40-98 | ,000 |
| Normale Spermien (%) | 258 | 10 | 0-20 | 150 | 12 | 0-52 | ,000 |
| Kopfdefekte(%) | 259 | 68 | 42-100 | 150 | 76 | 1-99 | ,000 |
| Mittelstückdefekte (%) | 259 | 8 | 1-22 | 150 | 40 | 6-77 | ,000 |
| Flaggelendefekte (%) | 259 | 43 | 16-89 | 150 | 18 | 2-56 | ,000 |
| Leukozyten (Mio.) | 258 | 0,00 | 0-42 | 130 | 0,00 | 0-9 | ,000 |
| PPZ (Mio.) | 266 | 0,10 | 0-16,2 | 150 | 0,00 | 0-10,4 | ,000 |
| Zink (mg/dl/Ej) | 221 | 8,7 | 0,8-60,2 | 52 | 18,08 | 3,2-103,2 | ,000 |
| α-Glucosidase (mU/Ej) | 130 | 56,1 | 4,6-320,6 | 70 | 67,1 | 12,1-549,8 | ,018 |
| Fructose(mmol/L/Ej) | 130 | 32,3 | 0,4-158,9 | 69 | 66,7 | 7,7-571,4 | ,000 |
| Elastase (ng/ml) | 263 | 32,0 | 10-2178 | 77 | 20,2 | 10-2000 | ,095 |
| IL-8 (pg/ml) | 236 | 3562,5 | 162-28957 | 51 | 1640,0 | 165-22946 | ,000 |

Tabelle 14 **Ergebnisse der labortechnischen Routinediagnostik an CP/CPPS-Patienten.** In der folgenden Tabelle sind die Ergebnisse der urologischen Routinediagnostik abgebildet. Ermittelt wurden jeweils die Fallzahl (n), der Median und die Spannweite.

| | n | Median | Spannweite | Referenz |
|--|-----|--------|------------|----------|
| CRP (mg/dl) | 263 | 1,92 | 0,5-51,28 | <5 |
| PSA (ng/ml) | 262 | 0,89 | 0,1-6,58 | <2,5 |
| Leukozyten im Anfangsurin (Anzahl/Gesichtsfeld in der Mikroskopie) | 262 | 1,42 | 0-35 | 0 |
| Leukozyten im ExUr (Anzahl/Gesichtsfeld in der Mikroskopie) | 264 | 2,00 | 0-25 | 0 |

4.1.2 Promotormethylierungsanalyse und Genexpressionsanalyse von Calcitonin-related peptide (CALCA)

4.1.2.1 Promotormethylierung von CALCA in Leukozyten aus ExUr

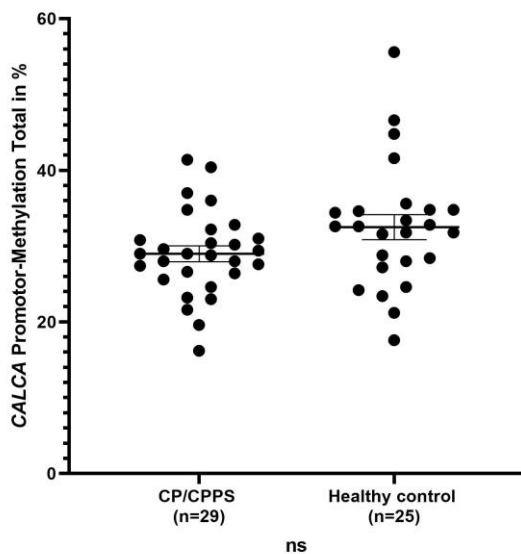


Abbildung 6 **Durchschnittliche Promotormethylierung CpG-Region CALCA.** Abgebildet ist die Promotormethylierungsanalyse von CALCA aus Leukozyten in ExUr. Mittels Pyrosequenzierung untersuchten wir 29 Patienten und 25 Kontrollen in einer regulierenden Promotorregion von CALCA an 5 Positionen auf ihren Methylierungsstatus. Der Boxplot zeigt die durchschnittliche Methylierung über alle fünf Positionen der CpG-Region hinweg. Hier zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen Patienten und Gesunden. Die durchschnittliche Methylierung in Patienten lag bei 28,99 % und reichte von 16,2 % bis 41,4 %. In der Kontrollgruppe lag sie bei 32,51 % und reichte von 17,6 % bis 55,6 %.

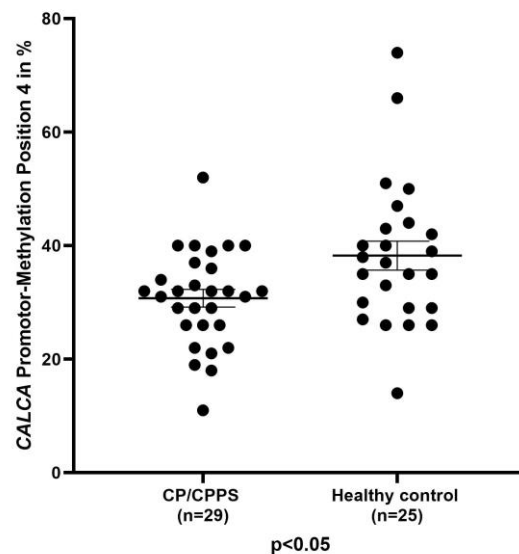


Abbildung 7 **Promotormethylierungsanalyse CpG-Region CALCA an Position 4.** Abgebildet ist die Promotormethylierungsanalyse von CALCA aus Leukozyten in ExUr. Mittels Pyrosequenzierung untersuchten wir 29 Patienten und 25 Kontrollen in einer regulierenden Promotorregion von CALCA an fünf Positionen. Der Boxplot repräsentiert den Methylierungsstatus an Position 4 der CpG-Region. Hier zeigte sich eine signifikant niedrigere Methylierung in der Patientenkohorte ($p < 0,05$). Die durchschnittliche Methylierung in Patienten an dieser Position lag bei 30,72 % und reichte von 11 % bis 52 %. In den Kontrollen lag sie bei 38,24 % und reichte von 14 % bis 74 %.

Für die quantitative Bestimmung der Promotormethylierung von CALCA in Leukozyten aus ExUr verwendeten wir Pyrosequenzierung. In der von uns untersuchten CpG-Region fand sich kein signifikanter Unterschied in der durchschnittlichen Promotormethylierung von CALCA in CP/CPPS. Die untersuchte CpG-Region umfasste fünf Positionen mit potenziellen Methylierungen von Cytosin. An Position 4 fand sich in CP/CPPS-Patienten eine signifikant niedrigere Promotormethylierung verglichen mit der Kontrollkohorte ($p < 0,05$). Die Ergebnisse für die durchschnittliche Methylierung über alle fünf Positionen und die Methylierung an Position 4 sind in den Abb. 6 und 7 dargestellt.

Die Promotormethylierung an Position 4 zeigte eine negative Korrelation mit den Kategorien 1 ($\rho = -,277$; $p < 0,05$) und 3 ($\rho = -,297$; $p < 0,05$) des CPSI-Scores. Eine

4. Ergebnisse

ebenfalls negative Korrelation fand sich mit der Anzahl von Leukozyten im Ejakulat ($\rho = -,314$; $p < 0,05$). Zudem korrelierte die Methylierung an Position 4 positiv mit der Anzahl schnell-motiler Spermien (Spermien-Motilität-A) ($\rho = ,273$; $p < 0,05$), gesamt-progressiver Spermien (Spermien-Motilität-A+B) ($\rho = ,278$; $p < 0,05$) und der Spermiovitalität ($\rho = ,393$; $p < 0,05$). Auch die durchschnittliche Methylierung der CpG-Region zeigte eine positive Korrelation mit der Anzahl schnell-motiler Spermien (Spermien-Motilität-A) ($\rho = ,324$; $p < 0,05$), gesamt-progressiver Spermien (Spermien-Motilität-A+B) ($\rho = ,306$; $p < 0,05$) und der Vitalität der Spermien ($\rho = ,360$; $p < 0,05$). Eine negative Korrelation bestand für die Anzahl immotiler Spermien (Spermien-Motilität-D) mit der Methylierung an Position 4 ($\rho = -,358$; $p < 0,01$) und der durchschnittlichen Methylierung ($\rho = -,298$; $p < 0,05$).

Bei der isolierten Betrachtung der Patientenkohorte zeigte sich eine negative Korrelation zwischen der durchschnittlichen Promotormethylierung von *CALCA* und dem Anteil immotiler Spermien (Spermien-Motilität-D) ($\rho = -,433$; $p < 0,05$) und dem Anteil von Spermien mit einem Flaggelumdefekt ($\rho = -,405$; $p < 0,05$). Auch für die Promotormethylierung an Position 4 bestand eine negative Korrelation mit dem Anteil immotiler Spermien (Spermien-Motilität-D) ($\rho = -,388$; $p < 0,05$) und dem Anteil von Spermien mit einem Flaggelumdefekt ($\rho = -,308$; $p < 0,05$). In CP/CPSP-Patienten fand sich zudem eine positive Korrelation zwischen dem pH-Wert im Ejakulat und der Promotormethylierung an Position 4 ($\rho = ,437$; $p < 0,05$; Abb. 8).

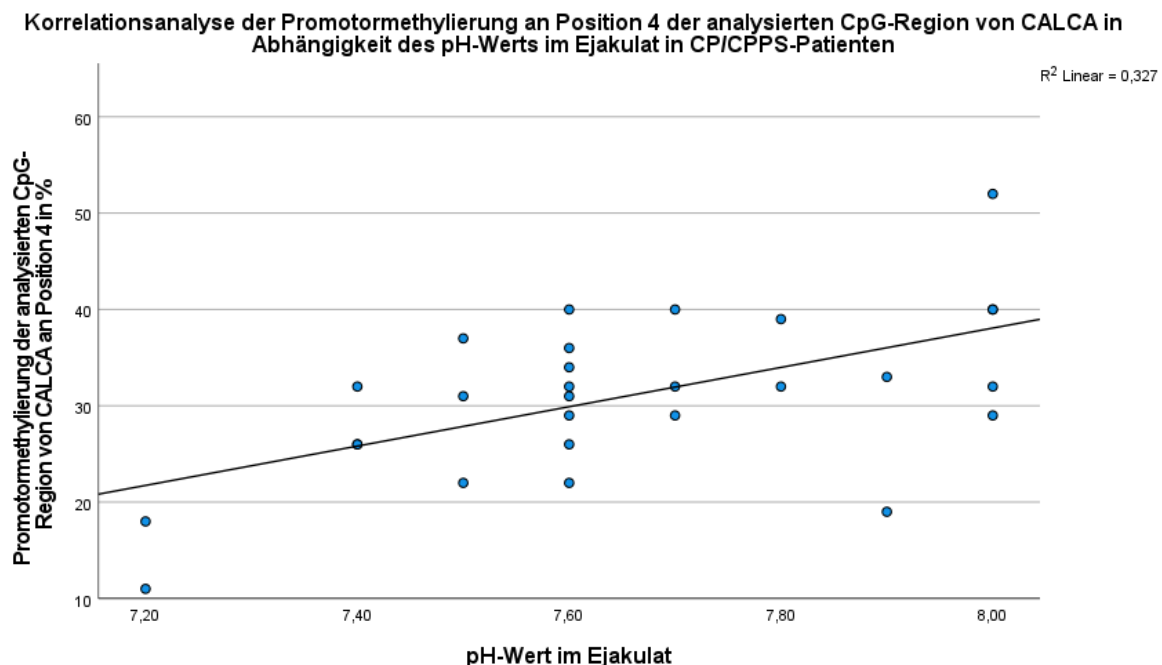


Abbildung 8 **Korrelationsanalyse der Promotormethylierung von *CALCA* Position 4 und dem pH-Wert im Ejakulat.** Analysiert wurde die Korrelation in einer Kohorte von 28 CP/CPSP-Patienten mittels Spearman-Rho. Es zeigte sich eine positive Korrelation ($p < 0,01$; $\rho = ,437$).

4. Ergebnisse

4.1.2.2 Genexpressionsanalyse von *CALCA* in Leukozyten aus ExUr

In der folgenden Genexpressionsanalyse von *CALCA* in Leukozyten aus ExUr untersuchten wir 27 CP/CPPS-Patienten und 26 gesunde Kontrollen. Es zeigte sich eine signifikant höhere Genexpression in der Patientenkohorte ($p < 0,0001$) (siehe Abb. 9).

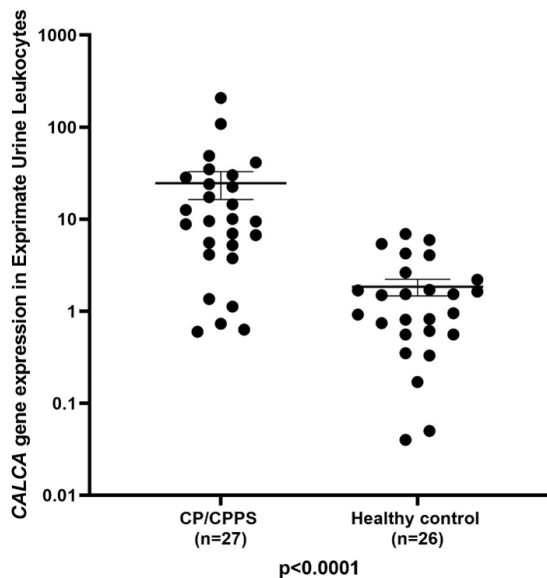


Abbildung 9 **Genexpression von *CALCA* in Leukozyten aus ExUr.** In der Abbildung sind die Genexpressionen von *CALCA* in Leukozyten aus ExUr für die Gruppe der CP/CPPS-Patienten gegenüber der gesunden Kontrollgruppe dargestellt. Untersucht wurden 27 Patienten und 26 gesunde Kontrollen. Es zeigte sich eine signifikant höhere Genexpression von *CALCA* in CP/CPPS-Patienten verglichen mit der gesunden Kontrollgruppe ($p < 0,0001$).

Die Genexpression von *CALCA* in Leukozyten aus ExUr zeigte eine stark-positive Korrelation mit den Kategorien I ($\rho = ,696$; $p < 0,0001$; Anhang Figure 2) und III ($\rho = ,587$; $p < 0,0001$), sowie der Gesamtpunktzahl des CPSI-Scores ($\rho = ,580$; $p < 0,0001$). Eine positive Korrelation bestand zudem mit der Gesamtpunktzahl des IPSS-Fragebogens ($\rho = ,457$; $p < 0,001$). Auch bei isolierter Betrachtung der reinen Patientenkohorte zeigte sich eine Korrelation zwischen der Genexpression von *CALCA* in Leukozyten aus ExUr und der Schmerzkategorie des CSPI-Scores ($\rho = ,487$; $p = 0,01$; Abb. 10).

4. Ergebnisse

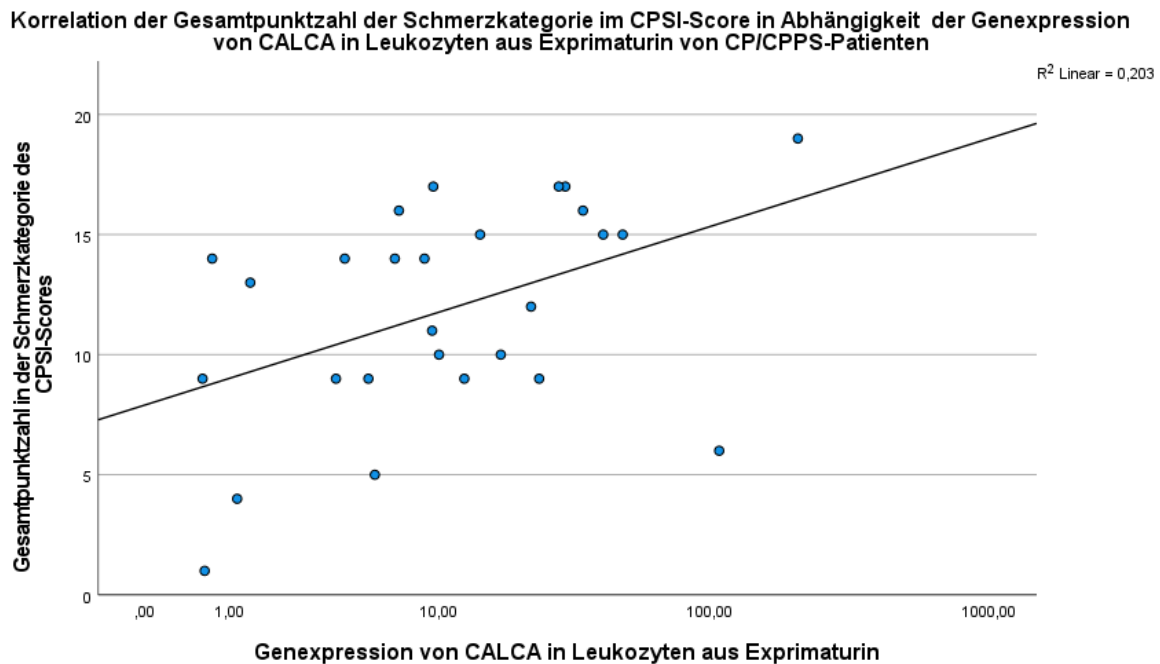


Abbildung 10 **Korrelationsanalyse der Gesamtpunktzahl in der Schmerzategorie des CPSI-Fragebogens in Abhängigkeit der Genexpression von CALCA in Leukozyten aus ExUr.** Abgebildet sind nur CP/CPPS-Patienten (n=27). In der Korrelationsanalyse mittels Spearman-Rho bestand eine positive Korrelation ($p=0.01$; $\rho=,487$).

Darüber hinaus zeigte sich eine negative Korrelation der Genexpression von CALCA in Leukozyten aus ExUr mit dem pH-Wert im Ejakulat ($\rho= -,466$; $p=0,001$; Abb. 11). Demgegenüber bestand eine positive Korrelation mit der Genexpression von CALCA in Epithelzellen aus ExUr ($\rho= ,506$; $p<0,0001$). Zudem stellte sich bei Betrachtung der Gesamtkohorte eine negative Korrelation der Genexpression von CALCA in Leukozyten aus ExUr und der zugrundeliegenden Promotormethylierung an den Positionen 2 ($\rho= -,258$; $p<0,05$) und 4 ($\rho= -,260$; $p<0,05$) dar. Da von einer gerichteten negativen Korrelation zwischen Promotormethylierung und zugehöriger Genexpression auszugehen ist, testen wir dies mittels einseitiger Spearman-Analyse.

Bei Betrachtung der reinen CP/CPPS-Kohorte fand sich zudem eine negative Korrelation der Genexpression von CALCA in Leukozyten aus ExUr mit der Konzentration von IL-8 im Ejakulat ($\rho= -,555$; $p<0,01$; Anhang Figure 3). Mit dem Anteil der Spermien mit Kopfdefekt bestand eine positive Korrelation ($\rho= ,409$; $p<0,05$).

Bei isolierter Betrachtung der gesunden Kontrollgruppe zeigten sich negative Korrelationen zwischen der Genexpression von CALCA in Leukozyten aus ExUr und dem Alter ($\rho= -,410$; $p<0,05$), sowie dem Anteil der Spermien mit einem Kopfdefekt ($\rho= -,578$; $p<0,01$). Zudem fanden sich in der gesunden Kohorte positive Korrelationen mit dem pH-Wert ($\rho= ,392$; $p<0,05$) und dem Anteil normaler Spermien ($\rho= ,502$; $p<0,01$).

4. Ergebnisse

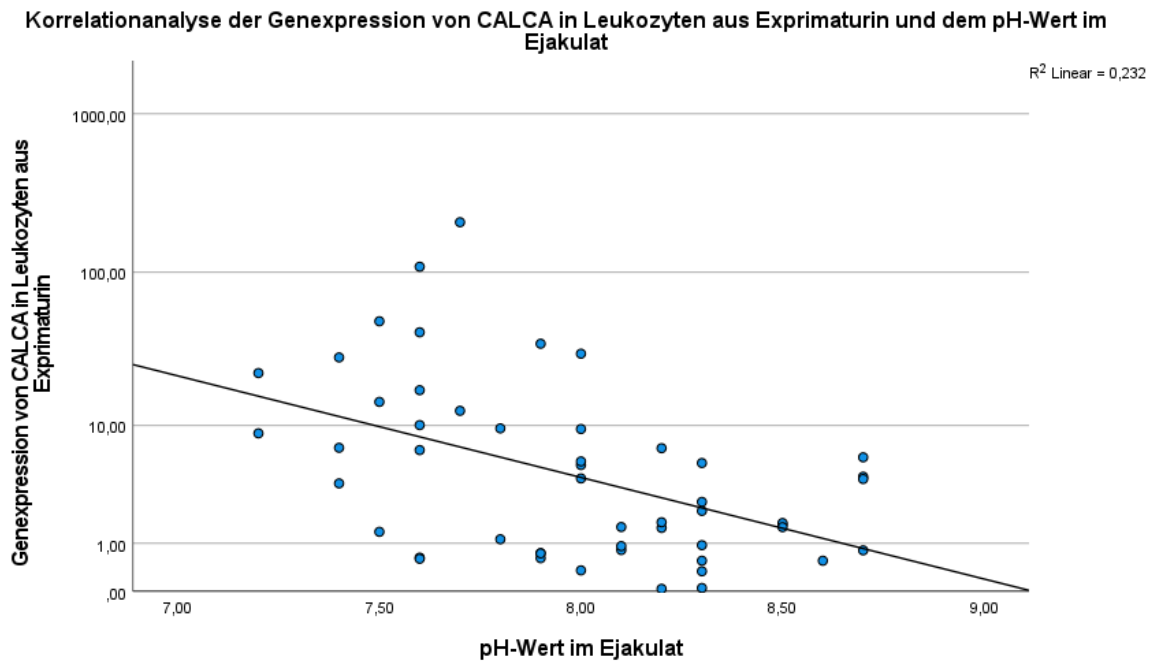


Abbildung 11 **Korrelationsanalyse der Genexpression von CALCA in Leukozyten aus ExUr in Abhängigkeit des zugrundeliegenden pH-Werts im Ejakulat.** Analysiert wurde die Korrelation in einer Gesamtkohorte aus CP/CPPS-Patienten und gesunden Kontrollpersonen mittels Spearman-Rho ($n=51$). Es zeigte sich eine negative Korrelation ($p=0.001$; $\rho= -,466$).

4.1.2.3 Genexpressionsanalyse von CALCA in Epithelzellen aus ExUr

In der Genexpressionsanalyse von CALCA in Epithelzellen aus ExUr zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen CP/CPPS-Patienten und der gesunden Kontrollgruppe. Untersucht wurden 27 CP/CPPS-Patienten und 25 gesunde Kontrollen. (siehe Anhang Figure 4). Die Genexpressionen von CALCA in Epithelzellen aus ExUr korrelierten positiv mit den Genexpressionen von CALCA aus Leukozyten in ExUr ($\rho= ,506$; $p<0,0001$; Anhang Figure 5) und Leukozyten aus Ejakulat ($\rho= ,312$; $p<0,05$), sowie der Genexpression von RAGE in Leukozyten aus ExUr ($\rho= ,371$; $p=0,01$). Bei isolierter Betrachtung der Patienten zeigte sich zudem eine positive Korrelation mit der Punktzahl in der Schmerzkategorie des CPSI-Scores ($\rho= ,471$; $p<0,05$; Anhang Figure 6). Bei isolierter Betrachtung der gesunden Kontrollgruppe zeigten sich negative Korrelationen mit dem Anteil von Spermien mit einem Mittelstückdefekt ($\rho= -,469$; $p<0,05$) und den langsam-progressiven Spermien (Spermien-Motilität-B) ($\rho= -,402$; $p<0,05$).

4.1.2.4 Genexpressionsanalyse von CALCA in Leukozyten aus Ejakulat

In der Genexpressionsanalyse von CALCA in Epithelzellen aus ExUr zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen CP/CPPS-Patienten und der gesunden Kontrollgruppe. Untersucht wurden 22 Patienten und 22 Gesunde (siehe Anhang Figure 7). Die Genexpressionen von CALCA in Leukozyten aus Ejakulat korrelierten positiv mit den Genexpressionen von CALCA aus Epithelzellen in ExUr ($\rho= ,312$; $p<0,05$).

4.1.3 Genexpressionsanalyse und Proteinmessung von S100 Calcium Binding Protein A12 (S100A12)

4.1.3.1 Genexpressionsanalyse von S100A12 in Leukozyten aus ExUr und Ejakulat

In der Genexpressionsanalyse von *S100A12* in Leukozyten aus ExUr und Ejakulat zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen Patienten und Kontrollen. Untersucht wurden 22 Patienten und 25 Gesunde auf die Genexpression von *S100A12* in Leukozyten aus ExUr (siehe Anhang Figure 8). Für die Genexpressionsanalyse von *S100A12* in Leukozyten aus Ejakulat analysierten wir 21 CP/CPPS-Patienten und 24 gesunde Kontrollpersonen (siehe Anhang Figure 9). Die Genexpression von *S100A12* in Leukozyten aus ExUr korrelierte positiv mit der Gesamtpunktzahl des IIEF-Fragebogens ($\rho = ,506$; $p < 0,05$). Demgegenüber korrelierte die Genexpression von *S100A12* in Leukozyten aus Ejakulat positiv mit der Genexpression von *CALCA* in Leukozyten aus Ejakulat ($\rho = ,842$; $p < 0,0001$).

4.1.3.2 Proteinmessung von S100A12 im Blutserum

Die ELISA-Messungen von S100A12 im Blutserum zeigten signifikant höhere Proteinkonzentrationen in CP/CPPS-Patienten verglichen mit der Kontrollgruppe ($p < 0,0001$). Untersucht wurden Blutseren von 44 Patienten und 24 gesunden Kontrollen. Die Proteinkonzentration in CP/CPPS lag im Median bei 49,41 ng/ml und reichte von 11,01 ng/ml bis 251,24 ng/ml. In der gesunden Kontrollgruppe lag der Median bei 16,79 ng/ml mit einer Spannweite von 3,08 ng/ml bis 49,72 ng/ml (siehe Abb. 12).

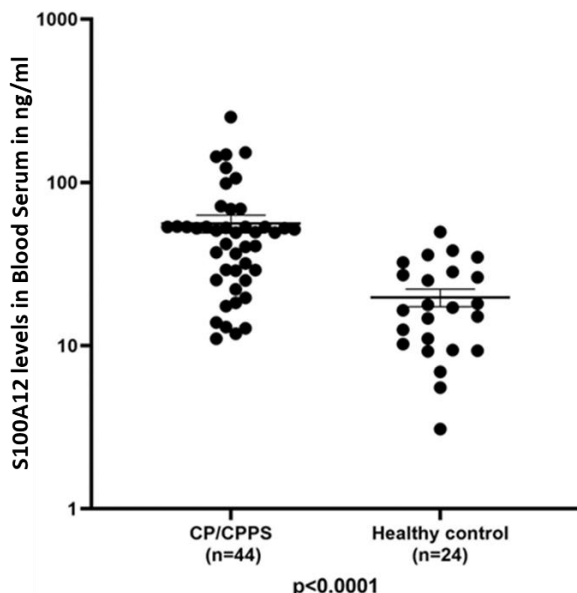


Abbildung 12 **Proteinkonzentration von S100A12 im Blutserum.** In der Abbildung sind die Proteinkonzentrationsmessungen mittels ELISA von S100A12 im Blutserum dargestellt. Untersucht wurden 44 CPPS-Patienten und 24 Kontrollen. Es zeigten sich signifikant höhere Spiegel von S100A12 im Blutserum der CP/CPPS-Patienten ($p < 0,0001$). Die Spiegel in CP/CPPS lagen im Median bei 49,41 ng/ml und reichten von 11,01 ng/ml bis 251,24 ng/ml. In der Kontrollgruppe lagen sie im Median bei 16,79 ng/ml und reichten von 3,08 ng/ml bis 49,72 ng/ml.

4. Ergebnisse

Spiegel von S100A12 korrelierten positiv mit den Punktzahlen der Kategorien 1 ($\rho = ,454$; $p < 0,0001$; Abb. 13) und 3 ($\rho = ,416$; $p < 0,0001$), sowie der Gesamtpunktzahl des NIH-CPSI ($\rho = ,418$; $p < 0,0001$) und dem Alter ($\rho = ,417$; $p < 0,0001$; Anhang Figure 10). In der Kontrollgruppe zeigten sich demgegenüber negative Korrelationen mit den Punktzahlen der Kategorie 3 des NIH-CPSI ($\rho = ,471$; $p < 0,05$).

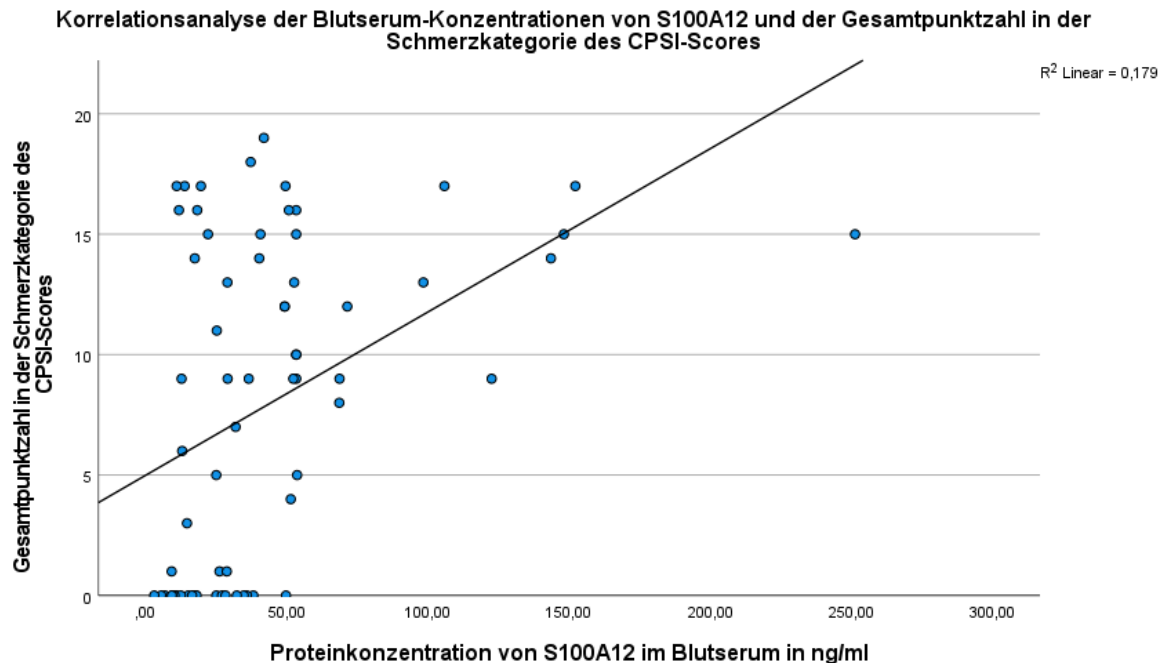


Abbildung 13 **Korrelationsanalyse der Gesamtpunktzahl in der Schmerzkatgorie des CPSI-Fragebogens und der Proteinkonzentration von S100A12 im Blutserum.** Abgebildet sind sowohl CP/CPPS-Patienten als auch gesunde Kontrollpersonen ($n=67$). In der Korrelationsanalyse mittels Spearman-Rho besteht eine signifikante positive Korrelation zwischen den beiden Variablen ($p < 0,0001$; $\rho = ,454$).

Es bestanden des Weiteren Korrelationen mit Parametern des SpermioGRAMMS. Hier zeigte sich eine negative Korrelation mit dem pH-Wert im Ejakulat ($\rho = -,522$; $p < 0,0001$; Abb. 14) und der Spermien-Vitalität ($\rho = -,522$; $p = 0,001$; Anhang Figure 11). Auch bei isolierter Betrachtung der gesunden Kontrollgruppe zeigte sich eine negative Korrelation zwischen pH-Wert im Ejakulat und der Proteinkonzentration von S100A12 im Blutserum ($\rho = -,460$; $p < 0,05$; Anhang Figure 12). Positive Korrelationen bestanden darüber hinaus mit Spiegeln von Interleukin 8 im Ejakulat ($\rho = ,278$; $p < 0,05$), sowie der Genexpression von RAGE in Leukozyten aus ExUr ($\rho = ,418$; $p < 0,01$; Abb.15).

Bei isolierter Betrachtung der CP/CPPS-Kohorte zeigte sich eine positive Korrelation mit der Zinkkonzentration im Ejakulat ($\rho = ,499$; $p < 0,05$; Anhang Figure 13) sowie der Genexpression von S100A12 in Leukozyten aus ExUr ($\rho = ,501$; $p < 0,05$; Anhang Figure 14). Des Weiteren fand sich eine negative Korrelation mit der Genexpression von CCL3 in Leukozyten aus ExUr ($\rho = -,462$; $p < 0,05$).

4. Ergebnisse

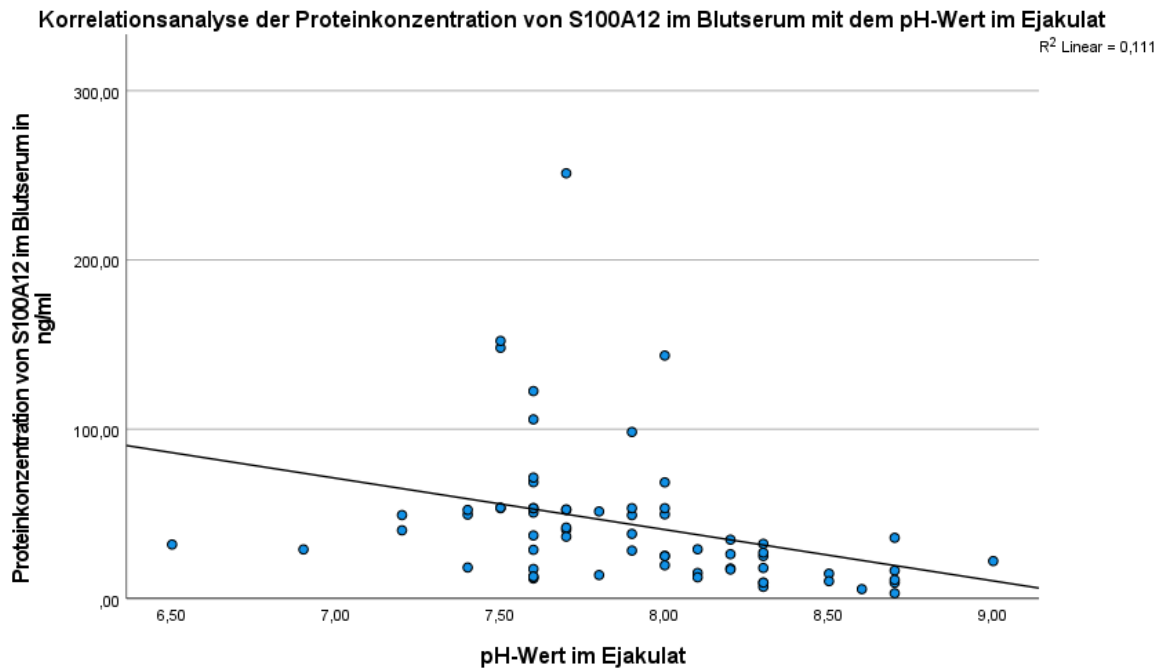


Abbildung 14 **Korrelationsanalyse der Proteinkonzentration von S100A12 im Blutserum und dem pH-Wert im Ejakulat.** Abgebildet sind sowohl CP/CPPS-Patienten als auch gesunde Kontrollpersonen (n=67). In der Korrelationsanalyse mittels Spearman-Rho bestand eine signifikante negative Korrelation ($p < 0.0001$; $\rho = -0,522$).

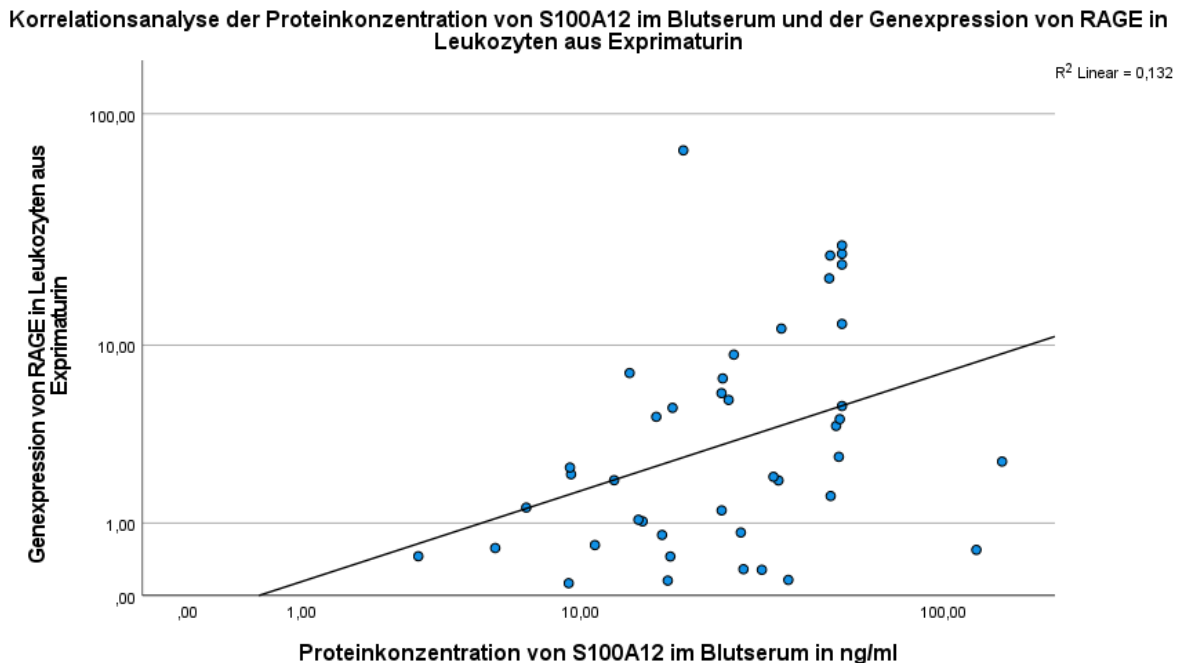


Abbildung 15 **Korrelationsanalyse der Proteinkonzentration von S100A12 im Blutserum und der Genexpression von RAGE in Leukozyten aus ExUr.** Abgebildet sind sowohl CP/CPPS-Patienten als auch gesunde Kontrollpersonen (n=42). In der Korrelationsanalyse mittels Spearman-Rho bestand eine signifikante positive Korrelation ($p < 0.01$; $\rho = 0,418$).

4. Ergebnisse

4.1.3.3 Proteinmessung von S100A12 im Seminalplasma

Die ELISA-Messungen von S100A12 im Seminalplasma zeigten signifikant höhere Proteinkonzentrationen in CP/CPPS verglichen mit der Kontrollgruppe ($p < 0,0001$). Untersucht wurden Seminalplasmen von 99 Patienten und 51 Gesunden. Die Proteinkonzentration in CP/CPPS lag im Median bei 53,66 ng/ml und reichte von 0,00 ng/ml bis 803,25 ng/ml. In der Kontrollgruppe lag die Proteinkonzentration im Median bei 2,29 ng/ml und reichte von 0,07 ng/ml bis 76,5 ng/ml.

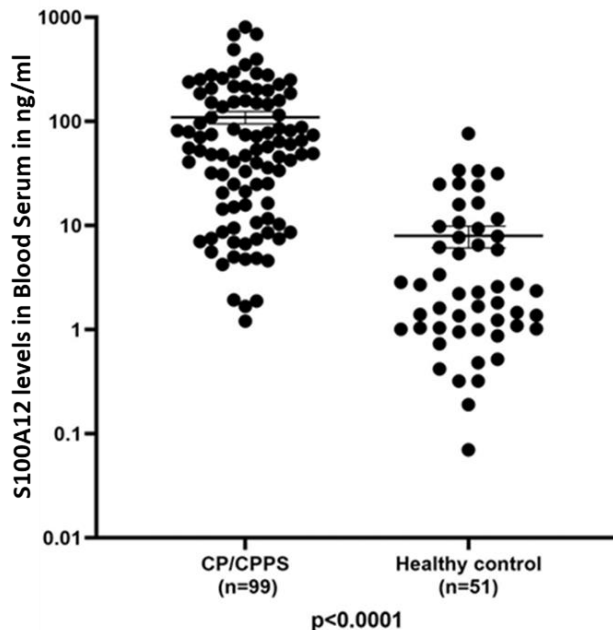


Abbildung 16 **Proteinkonzentration von S100A12 im Seminalplasma**. In der Abbildung sind die Proteinkonzentrationsmessungen mittels ELISA von S100A12 im Seminalplasma dargestellt. Untersucht wurden 99 CPPS-Patienten und 51 gesunde Kontrollen. Es zeigten sich signifikant höhere Proteinkonzentrationen von S100A12 im Seminalplasma der CP/CPPS-Patienten verglichen mit der gesunden Kontrollgruppe ($p < 0,0001$). Die Proteinkonzentration in CP/CPPS lag im Median bei 53,66 ng/ml und reichte von 0,00 ng/ml bis 803,25 ng/ml. In der Kontrollgruppe lag die Proteinkonzentration im Median bei 2,29 ng/ml und reichte von 0,07 ng/ml bis 76,5 ng/ml.

Es zeigten sich positive Korrelationen der Proteinkonzentration von S100A12 im Seminalplasma mit den Gesamtpunktzahlen im IPPS ($\rho = ,373$; $p < 0,0001$) und NIH-CPSI ($\rho = ,510$; $p < 0,0001$). Auch in den 3 Subkategorien des CPSI-Fragebogens fanden sich jeweils positive Korrelationen: Kategorie 1 ($\rho = ,486$; $p < 0,0001$; Abb.17), 2 ($\rho = ,326$; $p < 0,0001$) und 3 ($\rho = ,551$; $p < 0,0001$).

Weitere positive Korrelationen von S100A12 im Seminalplasma fanden sich mit inflammatorischen Markern. Hier zeigten positive Korrelationen mit der Anzahl von Leukozyten im Anfangsurin ($\rho = ,349$; $p < 0,0001$) sowie auch im ExUr ($\rho = ,243$; $p < 0,05$). Noch stärker korrelierten Spiegel von S100A12 im Seminalplasma mit den Entzündungsmarkern im Ejakulat. Positive Korrelationen fanden sich hier mit der Anzahl von Leukozyten ($\rho = ,533$; $p < 0,0001$) und Peroxidase-positiven Zellen (PPZ) ($\rho = ,594$;

4. Ergebnisse

$p < 0,0001$; Anhang Figure 15) sowie den Konzentrationen von Elastase ($\rho = ,741$; $p < 0,0001$; Abb.18) und Interleukin-8 ($\rho = ,619$; $p < 0,0001$; Anhang Figure 16).

Korrelationsanalyse der Proteinkonzentration von S100A12 im Seminalplasma mit der Gesamtpunktzahl der Schmerzkatgorie im CPSI-Score

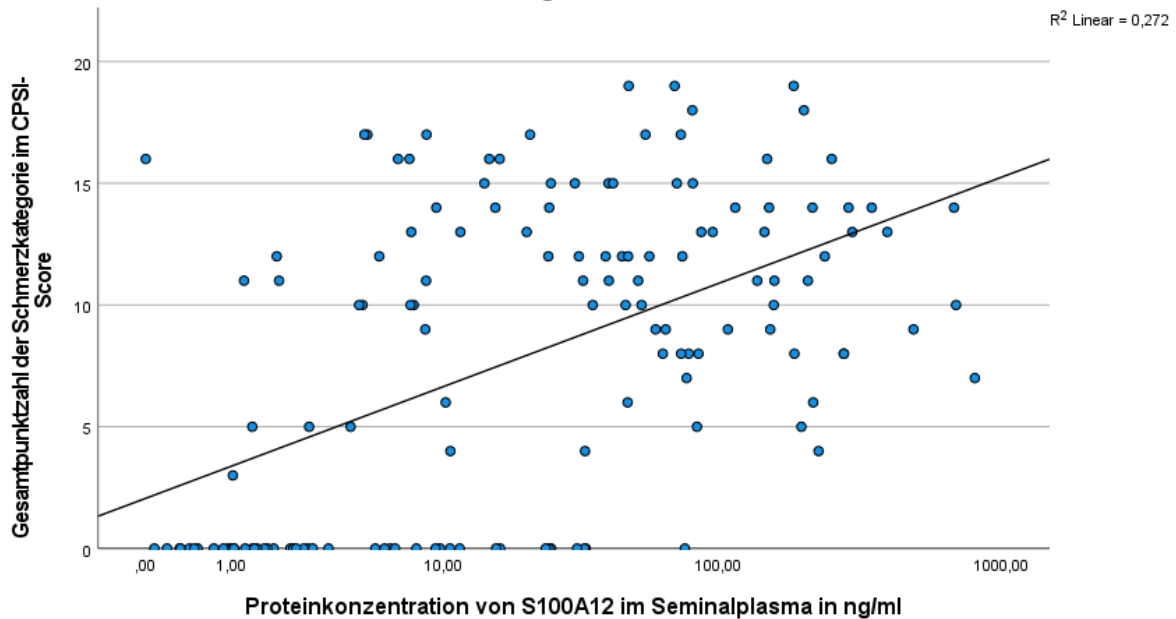


Abbildung 17 **Korrelationsanalyse der Gesamtpunktzahl in der Schmerzkatgorie des CPSI-Fragebogens in Abhängigkeit der Proteinkonzentration von S100A12 im Seminalplasma.** Abgebildet sind sowohl CP/CPPS-Patienten als auch gesunde Kontrollpersonen (n=143). In der Korrelationsanalyse mittels Spearman-Rho bestand eine signifikante positive Korrelation zwischen den beiden Variablen ($p < 0,0001$; $\rho = ,486$).

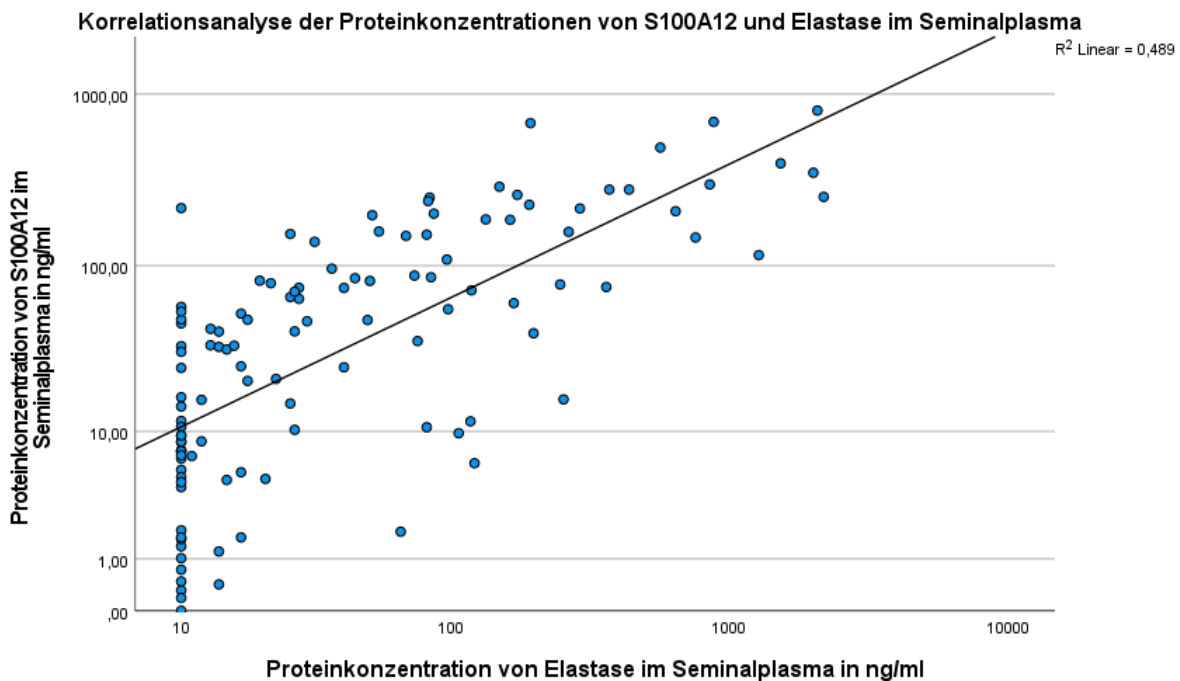


Abbildung 18 **Korrelationsanalyse der Konzentration von Elastase im Ejakulat und der Proteinkonzentration von S100A12 im Seminalplasma.** Abgebildet sind sowohl CP/CPPS-Patienten als auch gesunde Kontrollpersonen (n=150). In der Korrelationsanalyse mittels Spearman-Rho bestand eine signifikante positive Korrelation ($p < 0,0001$; $\rho = ,741$).

4. Ergebnisse

Auch bei isolierter Betrachtung der reinen CP/CPPS-Kohorte zeigte sich eine positive Korrelation der Proteinkonzentration von S100A12 im Seminalplasma mit den Entzündungsmarkern im Spermogramm: Leukozyten ($\rho = ,541$; $p < 0,0001$), PPZ ($\rho = ,603$; $p < 0,0001$), Elastase ($\rho = ,798$; $p < 0,0001$) und Interleukin-8 ($\rho = ,583$; $p < 0,0001$). Bei alleiniger Betrachtung der gesunden Kontrollgruppe zeigten sich ebenfalls positive Korrelationen mit den Entzündungsmediatoren im Ejakulat. Positive Korrelationen fanden sich hier mit der Anzahl von Leukozyten ($\rho = ,382$; $p < 0,01$) und der Proteinkonzentration von Elastase ($\rho = ,534$; $p < 0,05$).

Neben den entzündlichen Ejakulatparametern fanden sich in der Gesamtkohorte auch Korrelationen von S100A12 im Seminalplasma mit Markern der Fertilität. Hier zeigte sich eine negative Korrelation mit der Sperminenvitalität ($\rho = -,537$; $p < 0,0001$; Anhang Figure 17) sowie dem Anteil schnell-progressiver Spermien (Spermien-Motilität-A) ($\rho = -,427$; $p < 0,0001$) und dem Anteil gesamt-progressiver Spermien (Spermien-Motilität-A+B) ($\rho = -,397$; $p < 0,0001$). Eine positive Korrelation zeigte sich demgegenüber zwischen S100A12 und dem Anteil immotiler Spermien ($\rho = ,445$; $p < 0,0001$; Anhang Figure 19) sowie Spermien mit Flagellumdefekt ($\rho = ,555$; $p < 0,0001$, Anhang Figure 18).

Des Weiteren zeigten sich bei isolierter Betrachtung der reinen Patientenkohorte Korrelationen von S100A12 im Seminalplasma mit Fertilitätsmarkern im Spermogramm. Hier fand sich eine negative Korrelation mit dem Anteil schnell-progressiver Spermien (Spermien-Motilität-A) ($\rho = -,231$; $p < 0,05$) und dem Anteil gesamt-progressiver Spermien (Spermien-Motilität-A+B) ($\rho = -,221$; $p < 0,05$). Eine positive Korrelation zeigte sich demgegenüber mit dem Anteil immotiler Spermien (Spermien-Motilität-D) ($\rho = ,208$; $p < 0,05$) sowie dem Anteil von Spermien mit einem Flagellumdefekt ($\rho = ,207$; $p < 0,05$). Der PSA-Wert im Blut korrelierte in der Kohorte der CP/CPPS-Patienten positiv mit den Proteinkonzentrationen von S100A12 im Seminalplasma ($\rho = ,330$; $p = 0,001$). Bei Betrachtung der gesunden Kontrollgruppe zeigte sich ebenfalls eine negative Korrelation mit dem Anteil schnell-progressiver Spermien (Spermien-Motilität-A) ($\rho = -,316$; $p < 0,05$) sowie gesamt-progressiver Spermien (Spermien-Motilität-A+B) ($\rho = -,285$; $p < 0,05$).

Darüber hinaus fanden sich Korrelationen von S100A12 mit den Konzentrationen der beiden Ionen Zink und Calcium im Seminalplasma. Hier zeigte sich eine negative Korrelation bei isolierter Betrachtung der CP/CPPS-Patienten mit der Seminalplasmakonzentration von Calcium ($\rho = -,385$; $p < 0,05$). Bei isolierter Betrachtung der gesunden Kontrollgruppe zeigte sich eine positive Korrelation mit der Seminalplasmakonzentration von Zink ($\rho = ,567$; $p < 0,05$; Anhang Figure 20). Sowohl in der Gesamtkohorte als auch in der CP/CPPS-Kohorte zeigte sich hier keine Korrelation.

4. Ergebnisse

Die Proteinkonzentration von S100A12 im Seminalplasma zeigte zudem eine positive Korrelation mit dem Alter in der Gesamtkohorte aus Patienten und Kontrollpersonen ($\rho = ,435$; $p < 0,0001$; Abb. 19). Auch bei isolierter Betrachtung der CP/CPPS-Kohorte fand sich eine positive Korrelation ($\rho = ,257$; $p = 0,01$), nicht aber in der Kontrollgruppe.

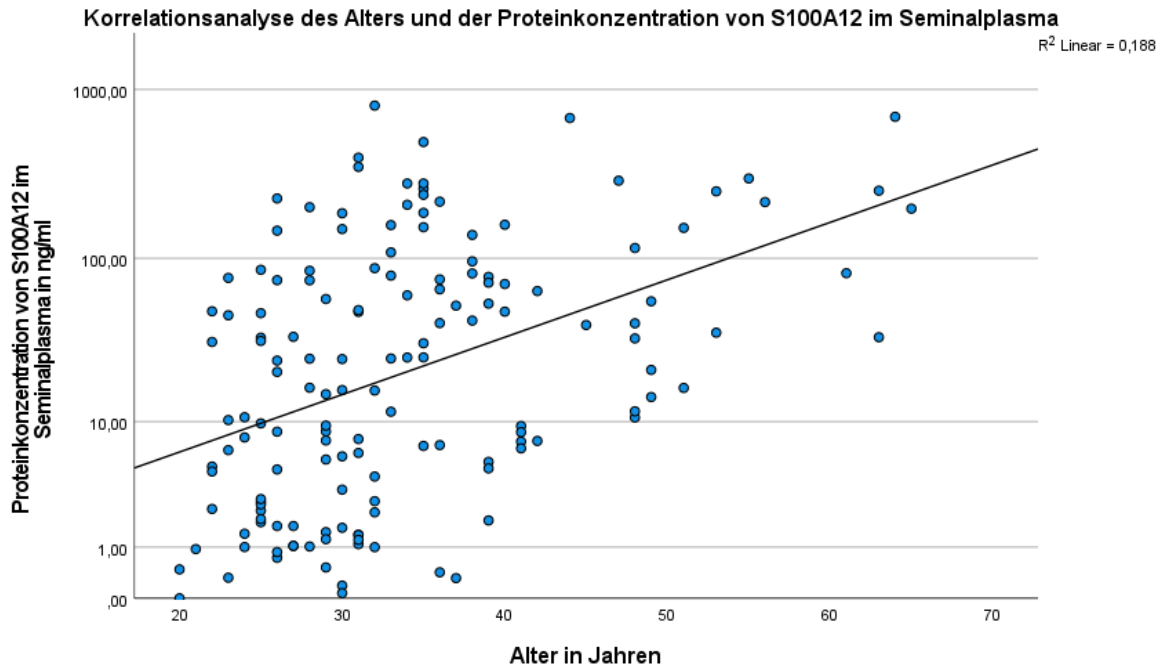


Abbildung 19 **Korrelationsanalyse des Alters mit der Proteinkonzentration von S100A12 in ng/ml im Seminalplasma.** Abgebildet sind sowohl CP/CPPS-Patienten als auch Kontrollpersonen ($n=150$). In der Korrelationsanalyse mittels Spearman-Rho bestand eine signifikante positive Korrelation zwischen den beiden Variablen ($p < 0,0001$; $\rho = ,435$).

4.1.4 Genexpressionsanalyse von Receptor For Advanced Glycation End-Products (RAGE)

4.1.4.1 Genexpressionsanalyse von RAGE in Leukozyten aus ExUr

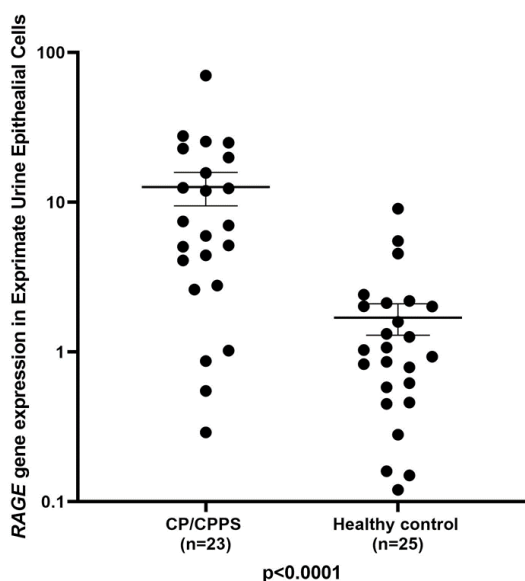


Abbildung 20 **Genexpression von RAGE in Leukozyten aus ExUr.** In der Abbildung sind die Genexpressionen von RAGE in Leukozyten aus ExUr für die Gruppe der CP/CPPS-Patienten

4. Ergebnisse

gegenüber der Kontrollgruppe dargestellt. Untersucht wurden 23 Patienten und 25 Kontrollen. Es zeigte sich eine signifikant höhere Genexpression von *RAGE* in CP/CPPS-Patienten ($p < 0,0001$).

In der Genexpressionsanalyse von *RAGE* in Leukozyten aus ExUr zeigte sich eine signifikant höhere Genexpression in der Patientenkohorte ($p < 0,0001$). Untersucht wurden 23 Patienten und 25 gesunde Kontrollen (siehe Abb. 20)

Die Genexpression von *RAGE* in Leukozyten aus ExUr zeigte eine positive Korrelation mit den Gesamtpunktzahlen im IPPS- ($\rho = ,455$; $p = 0,001$) und CPSI-Fragebogen ($\rho = ,552$; $p < 0,0001$). Zudem bestand eine positive Korrelation mit den Punktzahlen aus den Subkategorien 1 ($\rho = ,647$; $p < 0,0001$; Anhang Figure 21) und 3 ($\rho = ,578$; $p < 0,0001$) des NIH-CPSI. Auch bei isolierter Betrachtung der CP/CPPS-Kohorte zeigte sich eine Korrelation zwischen der Genexpression von *RAGE* in Leukozyten aus ExUr und der Gesamtpunktzahl in der Schmerzkategorie des NIH-CPSI ($\rho = ,452$; $p < 0,05$; Abb.21).

Korrelationsanalyse der Genexpression von *RAGE* in Leukozyten aus Exprimaturin und der Gesamtpunktzahl in der Schmerzkategorie des CPSI-Fragebogens in der Kohorte der CP/CPPS-Patienten

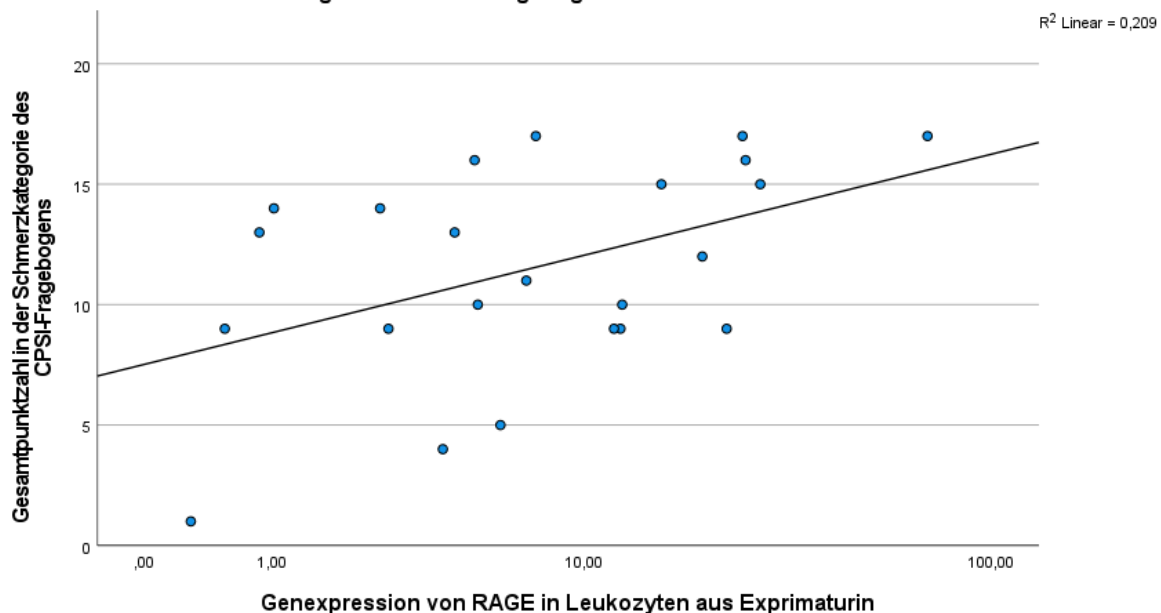


Abbildung 21 **Korrelationsanalyse der Genexpression von *RAGE* in Leukozyten aus ExUr mit der Gesamtpunktzahl in der Schmerzkategorie des CPSI-Fragebogens.** Abgebildet ist lediglich die Kohorte der CP/CPPS-Patienten ($n=23$). In der Korrelationsanalyse mittels Spearman-Rho bestand eine signifikante positive Korrelation ($p < 0,05$; $\rho = ,452$).

Eine positive Korrelation bestand zudem in der Gesamtkohorte mit der Konzentration von S100A12 im Blutserum ($\rho = ,418$; $p < 0,01$). Im Spermogramm zeigte sich eine negative Korrelation mit dem pH-Wert ($\rho = ,371$; $p = 0,01$) sowie eine positive Korrelation mit dem Anteil immotiler Spermien (Spermien-Motilität-D) ($\rho = ,298$; $p < 0,05$).

Bei isolierter Betrachtung der CP/CPPS-Patienten zeigte sich eine positive Korrelation der Genexpression von *RAGE* in Leukozyten aus ExUr mit dem Anteil der Spermien mit

4. Ergebnisse

einem Kopfdefekt ($\rho = ,431$; $p < 0,05$). Demgegenüber fand sich in der Kontrollgruppe eine negative Korrelation mit dem Anteil von Spermien mit Kopfdefekten ($\rho = -,522$; $p < 0,01$).

In der Gesamtkohorte aus CP/CPPS-Patienten und gesunden Kontrollpersonen bestand darüber hinaus eine negative Korrelation mit der Promotormethylierung von *CALCA* in Leukozyten aus ExUr an Position 2. Auf Genexpressionsebene fand sich entsprechend eine positive Korrelation mit *CALCA* in Epithelzellen aus ExUr ($\rho = ,371$; $p = 0,01$). Eine noch stärkere Korrelation zeigte sich mit der Genexpression von *CALCA* in Leukozyten aus ExUr ($\rho = ,924$; $p < 0,0001$, Anhang Figure 22). Da die Spearman-Korrelationsanalyse einen derart hohen Korrelationskoeffizient ergab, schlossen wir eine partielle Korrelationsanalyse an. Diese führten wir unter der Annahme durch, dass Unterschiede im Ausgangsmaterial zu einer Verzerrung der Genexpressionen führen können. Hierbei prüften wir die Korrelationen der Genexpressionen von *CALCA* und *RAGE* in Leukozyten aus ExUr unter Ausschluss der Beeinflussung durch die Genexpression des Housekeeper-Gens *GAPDH*. Zwar bestanden positive Korrelationen zwischen den Genexpressionen von *GAPDH* mit *CALCA* beziehungsweise *RAGE*. Jedoch zeigte sich auch nach partieller Korrelation von *CALCA* und *RAGE* unter Ausschluss dieser Konfounder-Variable eine stark positive Korrelation (siehe Abb. 22)

| Kontrollvariablen | | | calca | rage |
|-------------------|-------|--------------------------|-------|-------|
| gapdh | calca | Korrelation | 1,000 | ,741 |
| | | Signifikanz (zweiseitig) | . | ,000 |
| | | Freiheitsgrade | 0 | 43 |
| | rage | Korrelation | ,741 | 1,000 |
| | | Signifikanz (zweiseitig) | ,000 | . |
| | | Freiheitsgrade | 43 | 0 |

Abbildung 22 **Korrelationsanalyse der Genexpressionen von *CALCA* und *RAGE***. In der Abbildung ist die partielle Korrelationsanalyse der Genexpressionen von *CALCA* und *RAGE* in Leukozyten aus ExUr dargestellt. Die Korrelation der Genexpressionen von *CALCA* und *RAGE* wurde unter Ausschluss des Einflusses einer Kontrollvariable durchgeführt. Als Kontrollvariable wählten wir die Genexpression des Housekeeper-Gens *GAPDH*, um eventuelle Verzerrungen durch Unterschiede in der Ausgangsmenge der cDNA im Rahmen der Genexpressionsanalyse auszuschließen. Auch nach Ausschluss dieser Kontrollvariable zeigte sich eine positive Korrelation der Genexpressionen von *CALCA* und *RAGE* in Leukozyten aus ExUr ($p < 0,0001$).

4.1.5 Genexpressionsanalyse von Macrophage Inflammatory Protein 1 Alpha (*CCL3*)

4.1.5.1 Genexpressionsanalyse von *CCL3* in Leukozyten aus ExUr

In der Genexpressionsanalyse von *CCL3* in Leukozyten aus ExUr zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen CP/CPPS-Patienten und der gesunden Kontrollgruppe. Untersucht wurden 27 Patienten und 23 Kontrollen (siehe Anhang Figure 23). Es zeigte sich eine positive Korrelation der Genexpression von *CCL3* in Leukozyten

4. Ergebnisse

aus ExUr mit der Anzahl von Leukozyten im Ejakulat ($\rho = ,389$; $p < 0,01$). Darüber hinaus stellte sich eine negative Korrelation mit dem pH-Wert im Ejakulat dar ($\rho = -,296$; $p < 0,05$).

4.1.6 Messung der Calciumkonzentrationen im Seminalplasma

Neben den Versuchen auf DNA-, RNA- und Proteinebene bestimmten wir die Konzentrationen von Calcium im Seminalplasma. Wir analysierten hierbei die Seminalplasmen von 42 Patienten und 30 gesunden Kontrollpersonen. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Kohorten. Die durchschnittliche Calciumkonzentration bei CP/CPPS-Patienten lag bei 37,77 mg/dl mit einer Range von 17 mg/dl bis 60,25 mg/dl. In der Kontrollgruppe lag die durchschnittliche Konzentration von Calcium bei 37,12 mg/dl mit einer Range von 21 mg/dl bis 57,75 mg/dl (Abb. 23).

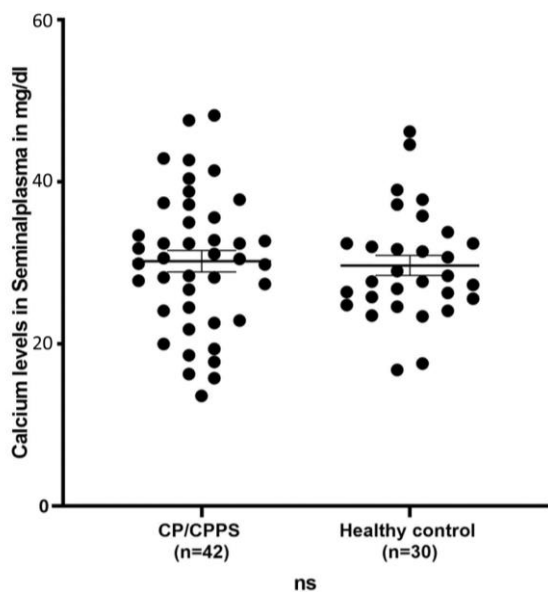


Abbildung 23 **Calciumkonzentration im Seminalplasma.** In der Abbildung sind die Calciumkonzentrationen im Seminalplasma dargestellt. Wir untersuchten mittels colormetrischer Messung die Seminalplasmen von 42 CP/CPPS-Patienten und 30 gesunden Kontrollpersonen auf ihre Calciumkonzentrationen. Es fand sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Kohorten. Die durchschnittliche Calciumkonzentration von Patienten lag bei 37,77mg/dl mit einer Range von 17mg/dl bis 60,25mg/dl. In der Kontrollgruppe lag die durchschnittliche Calciumkonzentration bei 37,12 mg/dl mit einer Range von 21mg/dl bis 57,75mg/dl.

In der Gesamtkohorte zeigten sich im Seminalplasma positive Korrelationen zwischen den Konzentrationen von Zink und Calcium ($\rho = ,491$; $p < 0,0001$; Anhang Figure 24). Auch bei isolierter Betrachtung der Patienten fand sich eine positive Korrelation ($\rho = ,643$; $p < 0,0001$; Anhang Figure 25). Mit einem Korrelationskoeffizient von $\rho = ,643$ stellte sich diese noch stärker dar als in der Gesamtkohorte ($\rho = ,491$) dar. Darüber hinaus zeigte sich bei isolierter Betrachtung der CP/CPPS-Patienten eine negative Korrelation mit verschiedenen inflammatorischen Markern. Die Konzentrationen von Calcium im Seminalplasma korrelierten hierbei negativ mit der Anzahl von Leukozyten im Anfangsurin ($\rho = -,381$; $p < 0,05$) sowie dem ExUr ($\rho = -,423$; $p < 0,01$; Anhang Figure 26).

4. Ergebnisse

Zudem bestand im Spermogramm eine negative Korrelation mit der Anzahl von Leukozyten ($\rho = -,327$; $p < 0,05$) und PPZ ($\rho = -,405$; $p < 0,01$; Anhang Figure 27) sowie der Konzentration von S100A12 ($\rho = -,385$; $p < 0,05$) und Elastase im Seminalplasma ($\rho = -,374$; $p < 0,05$). Eine ebenfalls negative Korrelation zeigte sich in der CP/CPPS-Kohorte zudem mit dem pH-Wert ($\rho = -,341$; $p < 0,05$).

4.1.7 Korrelation des Alters mit klinischen und laborchemischen Parametern

Im Folgenden sind die Korrelationen des Alters mit klinischen und laborchemischen Parametern tabellarisch dargestellt. Wir führten diese Korrelationsanalyse durch, da es einen erheblichen Altersunterschied zwischen der Patientenkohorte und der gesunden Kontrollgruppe gab. Zum einen sind die Korrelationen mit dem Alter für die Gesamtkohorte aus Patienten und Gesunden gemeinsam aufgeführt. Zum anderen sind die Korrelationen des Alters für die reine CP/CPPS-Kohorte dargestellt.

Tabelle 15 **Korrelation des Alters mit laborchemischen Parametern.** In der abgebildeten Tabelle sind die Korrelationen labortechnischer Parameter aus Routinediagnostik, Spermogramm und Versuchen im Rahmen der Promotion dargestellt. Zum einen für die Kohorte der CP/CPPS-Patienten und zum anderen für die Gesamtkohorte aus Patienten und gesunden Kontrollen.

| Parameter | Gesamt | | | CP/CPPS | | |
|------------------------------|--------|---------------------------------|------|---------|---------------------------------|------|
| | n | Korrelations-Koeffizient ρ | p | n | Korrelations-Koeffizient ρ | p |
| CRP (mg/dl) | 263 | ,090 | ,144 | 263 | ,090 | ,144 |
| PSA (ng/ml) | 262 | ,148 | ,016 | 262 | ,148 | ,016 |
| Leukozyten Anfangsurin | 262 | ,119 | ,054 | 262 | ,119 | ,054 |
| Leukozyten ExUr | 264 | ,191 | ,002 | 264 | ,191 | ,002 |
| Volumen in ml | 417 | -,234 | ,000 | 267 | -,184 | ,003 |
| pH-Wert | 416 | -,088 | ,071 | 266 | ,194 | ,002 |
| Spermien-Dichte (Mio/ml) | 415 | -,060 | ,225 | 265 | -,107 | ,083 |
| Spermien-Anzahl (Mio) | 413 | -,207 | ,000 | 265 | -,194 | ,001 |
| Spermien-Motilität A (in %) | 413 | -,393 | ,000 | 263 | -,298 | ,000 |
| Spermien-Motilität B (in %) | 413 | ,006 | ,905 | 263 | -,247 | ,000 |
| Spermien-Motilität C (in %) | 413 | -,093 | ,059 | 263 | -,022 | ,721 |
| Spermien-Motilität D (in %) | 412 | ,446 | ,000 | 262 | ,322 | ,000 |
| Progressive Spermien (%) | 414 | -,418 | ,000 | 264 | -,373 | ,000 |
| Spermien-Vitalität (in %) | 205 | -,554 | ,000 | 75 | -,429 | ,000 |
| Normale Spermien (%) | 408 | -,351 | ,000 | 258 | -,309 | ,000 |
| Kopfdefekte (in %) | 409 | ,082 | ,096 | 259 | ,245 | ,000 |
| Mittelstück-defekte (in %) | 409 | -,460 | ,000 | 259 | -,041 | ,512 |
| Flaggelen-defekte (in %) | 409 | ,552 | ,000 | 259 | ,313 | ,000 |
| Leukozyten (Mio.) | 388 | ,220 | ,000 | 258 | ,125 | ,046 |
| PPL (Mio.) | 416 | ,192 | ,000 | 266 | ,107 | ,081 |
| Zink (mg/dl/Ej) | 273 | -,190 | ,002 | 221 | -,127 | ,059 |
| α Glucosidase (mU/Ej) | 200 | -,005 | ,947 | 130 | ,099 | ,262 |
| Fructose (mmol/L/Ej) | 199 | -,157 | ,027 | 130 | -,028 | ,755 |
| Elastase (ng/ml) | 340 | ,221 | ,000 | 263 | ,211 | ,001 |
| Interleukin-8 (pg/ml) | 287 | ,415 | ,000 | 236 | ,392 | ,000 |
| Calcium | 72 | ,018 | ,878 | 42 | -,060 | ,706 |
| S100A12 Seminalplasma | 150 | ,435 | ,000 | 99 | ,257 | ,010 |

4. Ergebnisse

| | | | | | | |
|----------------------------|----|-------|------|----|-------|------|
| S100A12 Blutserum | 68 | ,417 | ,000 | 44 | ,197 | ,199 |
| Genexpr. CCL3 ExU-Leu | 50 | ,044 | ,761 | 27 | -,219 | ,273 |
| Genexpr. CALCA ExU-Leu | 53 | ,152 | ,277 | 27 | -,181 | ,365 |
| Genexpr. CALCA ExU-Epi | 52 | ,181 | ,199 | 27 | ,144 | ,474 |
| Genexpr. RAGE ExU-Leu | 48 | ,279 | ,055 | 23 | ,171 | ,434 |
| Genexpr S100A12 ExU-Leu | 47 | ,122 | ,416 | 22 | ,059 | ,796 |
| Genexpr. CALCA Ej-Leu | 44 | ,082 | ,595 | 22 | -,017 | ,939 |
| Genexpr. S100A12 Ej-Leu | 45 | ,090 | ,557 | 24 | ,116 | ,588 |
| Promotormethylierung CALCA | 54 | -,112 | ,420 | 29 | -,186 | ,334 |

4.2 Subgruppenanalyse nach Matching der Kohorten nach dem Alter

In der oben dargestellten Tabelle zeigten sich starke Korrelationen des Alters mit den Spiegeln von S100A12 in Blutserum und Seminalplasma. Daneben korrelierten viele weitere Parameter mit dem Alter. Wir führten deshalb eine separate Analyse mit einem Matching der Gesunden und Patienten für den Faktor „Alter“ durch. Im Folgenden soll S100A12 unter Ausschluss etwaiger Verzerrung durch Altersunterschiede untersucht werden. Wir wählten hierzu zufällig 90 CP/CPPS-Patienten und 90 Kontrollpersonen aus der Gesamtkohorte aus. Der Median des Alters lag bei 29,4 Jahren und reichte von 20-48 Jahren. Die Charakterisierung dieser Alters-gematcheten Kohorte ist im folgenden Abschnitt dargestellt. Zunächst erfolgt die Darstellung der andrologischen Fragebögen (siehe Tabelle 16). Anschließend sind die Ergebnisse der Spermioogramme dargestellt (siehe Tabelle 17). Abschließend finden sich die Ergebnisse der labortechnischen Routinediagnostik an CP/CPPS-Patienten (siehe Tabelle 18).

4.2.1 Charakterisierung des Studienkollektivs nach Matching gegenüber dem Alter anhand von Fragebögen, Spermioogramm und Labordiagnostik

Tabelle 16 **Ergebnisse der andrologischen Fragebögen nach Matching der Kohorten bezüglich des Alters.** Abgebildet sind die Ergebnisse der andrologischen Fragebögen. Analysiert wurden der CPSI (Chronic Prostatitis Symptome Index), der IPSS (International Prostate Symptome Score) und der IIEF (International Index of Erectile Function). Dargestellt sind Fallzahl (n), Median und Spannweite sowie die Signifikanz (p) im Mann-Whitney U-Test.

| Fragebogen | CP/CPPS | | | Kontrollgruppe | | | p |
|---|---------|--------|--------|----------------|--------|--------|------|
| | n | Median | Spanne | n | Median | Spanne | |
| IPSS | 80 | 12 | 1-45 | 71 | 2 | 0-15 | ,000 |
| CPSI-Kategorie1 Schmerzsymptomatik | 82 | 12 | 1-19 | 88 | 0 | 0-10 | ,000 |
| CPSI-Kategorie2 Miktions-Symptomatik | 82 | 4 | 0-10 | 88 | 1 | 0-8 | ,000 |
| CPSI-Kategorie3 Einfluss auf die Lebensqualität | 82 | 9 | 1-12 | 88 | 0 | 0-6 | ,000 |
| CPSI- Gesamtpunktzahl | 82 | 25 | 8-40 | 88 | 1 | 0-19 | ,000 |
| IIEF | 51 | 29 | 6-30 | 39 | 29 | 8-30 | ,127 |

4. Ergebnisse

Tabelle 17 **Ergebnisse der labortechnischen Routinediagnostik an CP/CPPS-Patienten nach Matching der Kohorten bezüglich des Alters.** In der folgenden Tabelle sind die Ergebnisse der urologischen Routinediagnostik abgebildet. Ermittelt wurden jeweils die Fallzahl (n), der Median und die Spannweite.

| | n | Median | Spannweite | Referenzwerte |
|---|----|--------|------------|---------------|
| CRP (mg/dl) | 88 | 0,5 | 0,5-25,23 | <5 |
| PSA (ng/ml) | 87 | 0,64 | 0,2-3,14 | <2,5 |
| Leukozyten im Anfangsurin (Anzahl/ Gesichtsfeld in der Mikroskopie) | 88 | 0,5 | 0-35 | 0 |
| Leukozyten im ExUr (Anzahl/ Gesichtsfeld in der Mikroskopie) | 89 | 0,5 | 0-25 | 0 |

Tabelle 18 **Charakterisierung der CP/CPPS- und Kontrollkohorte mittels Spermogramm nach Matching der Kohorten bezüglich des Alters.** In der folgenden Tabelle sind die Ergebnisse der Spermogramme abgebildet. Ermittelt wurden jeweils die Fallzahl (n), der Median und die Spannweite sowie die Signifikanz (p) im Mann-Whitney U-Test.

| Parameter | CP/CPPS | | | Gesunde | | | p |
|--------------------------|---------|------------|-----------|---------|------------|-------------|------|
| | n | Mittelwert | Spanne | n | Mittelwert | Spanne | |
| Volumen in ml | 90 | 3,2 | 0,2-8,5 | 90 | 3,05 | 0,45-10,0 | ,716 |
| pH-Wert | 90 | 7,9 | 7,0-9,0 | 90 | 8,25 | 7,2-8,8 | ,000 |
| Spermien-Dichte (Mio/ml) | 90 | 64 | 2,3-524,5 | 90 | 47,8 | 2,9-256,5 | ,063 |
| Spermien-Anzahl (Mio) | 90 | 203,35 | 0,46-2002 | 88 | 172,58 | 7,8-1415,15 | ,367 |
| Sperm-Mot.A (%) | 90 | 23,0 | 0-48 | 90 | 33,5 | 0-72 | ,000 |
| Sperm-Mot.B (%) | 90 | 28,0 | 3-55 | 90 | 24,0 | 3-52 | ,001 |
| Sperm-Mot.C (%) | 90 | 8 | 2-26 | 90 | 12,0 | 1-28 | ,001 |
| Sperm-Mot.D (%) | 90 | 38 | 20-94 | 90 | 27,5 | 10-82 | ,000 |
| Progressive Spermien (%) | 90 | 53 | 3-76 | 90 | 60,5 | 4-86 | ,000 |
| Vitalität (in %) | 19 | 67 | 24-82 | 83 | 87 | 62-98 | ,000 |
| Normale Spermien (%) | 88 | 11 | 0-20 | 90 | 12 | 0-52 | ,476 |
| Kopfdefekte (%) | 89 | 65 | 47-99 | 90 | 77,5 | 8-99 | ,000 |
| Mittelstückdefekte (%) | 89 | 9 | 1-20 | 90 | 37 | 6-74 | ,000 |
| Flaggelendefekte (in %) | 89 | 40 | 16-81 | 90 | 18 | 2-56 | ,000 |
| Leukozyten (Mio) | 89 | 0,00 | 0-36 | 83 | 0,00 | 0-9 | ,006 |
| PPL (Mio.) | 90 | 0,10 | 0-16,2 | 90 | 0,00 | 0-10,4 | ,000 |
| Zink (mg/dl/Ej) | 72 | 10,3 | 1,1-59,4 | 32 | 18,98 | 3,9-88,2 | ,003 |
| α-Glucosidase (mU/Ej) | 69 | 57,0 | 4,6-251,6 | 51 | 66,8 | 20-393,8 | ,126 |
| Fructose (mmol/L/ Ej) | 68 | 32,0 | 1,3-158,9 | 50 | 66,4 | 7,7-571,4 | ,000 |
| Elastase (ng/ml) | 88 | 26,0 | 10-2068 | 53 | 16,0 | 10-2000 | ,227 |
| IL-8 (pg/ml) | 84 | 2820,5 | 162-21370 | 38 | 1679,5 | 165-22946 | ,007 |

4.2.2 Proteinkonzentration von S100 Calcium Binding Protein A12 (S100A12)

4.2.2.1 S100A12 im Seminalplasma

Zunächst analysierten wir die Proteinkonzentration von S100A12 im Seminalplasma. Auch nach Matching gegenüber dem Alter fanden sich signifikant höhere Spiegel in der CP/CPPS-Kohorte ($p < 0,0001$). Untersucht wurden Proben von 53 Patienten und 38 Kontrollen. Die Spiegel in Patienten lagen im Median bei 47,84 ng/ml und reichten von 0,00 ng/ml bis 803,25 ng/ml. In der Kontrollgruppe lagen sie im Median bei 2,47 ng/ml und reichten von 0,07 ng/ml bis 33,42 ng/ml (siehe Abb. 24).

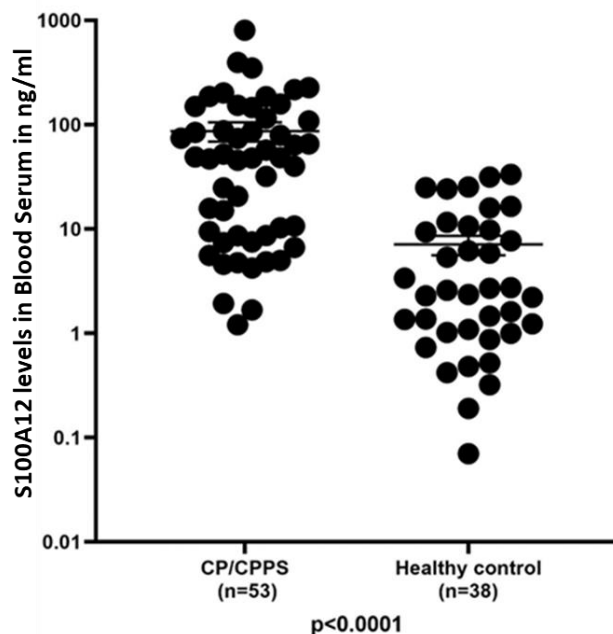


Abbildung 24 **Proteinkonzentrationen von S100A12 im Seminalplasma nach Matching der Kohorten gegenüber dem Alter.** In der Abbildung sind die Ergebnisse der Proteinkonzentrationen von S100A12 im Seminalplasma im Zuge der Subgruppenanalyse nach Matching der Kohorten gegenüber dem Alter dargestellt. Untersucht wurden 53 CPPS-Patienten und 38 gesunde Kontrollen. Es zeigten sich signifikant höhere Proteinkonzentrationen von S100A12 im Seminalplasma der CP/CPPS-Patienten verglichen mit der gesunden Kontrollgruppe ($p < 0,0001$). Die Proteinkonzentration in CP/CPPS-Patienten lag im Median bei 47,84 ng/ml und reichte von 0,00 ng/ml bis 803,25 ng/ml. In der gesunden Kontrollgruppe lag die Proteinkonzentration im Median bei 2,47 ng/ml und reichte von 0,07 ng/ml bis 33,42 ng/ml.

In der Korrelationsanalyse zeigte sich eine positive Korrelation mit den Gesamtpunktzahlen im IPSS ($\rho = ,342$; $p = 0,001$) und NIH-CPSI ($\rho = ,451$; $p < 0,0001$). Auch mit den drei Subkategorien des NIH-CPSI bestanden positive Korrelationen: Kategorie 1 ($\rho = ,454$; $p < 0,0001$; Anhang Figure 28), Kategorie 2 ($\rho = ,325$; $p < 0,01$) und Kategorie 3 ($\rho = ,486$; $p < 0,0001$). Zudem zeigte sich in der Gesamtkohorte aus Patienten und gesunden Kontrollen keine signifikante Korrelation der Proteinkonzentration von S100A12 im Seminalplasma mit dem Alter. Bei isolierter Betrachtung der Patienten fand sich jedoch eine positive Korrelation ($\rho = ,306$; $p < 0,05$). In der gesunden Kontrollgruppe zeigte sich demgegenüber keine Korrelation.

4. Ergebnisse

Des Weiteren bestanden Korrelationen von S100A12 im Seminalplasma mit verschiedenen Parametern des Spermioграмms. Negative Korrelationen bestanden mit dem Anteil schnell-progressiver Spermien (Spermien-Motilität-A) ($\rho = -,306$; $p < 0,01$) und dem Anteil gesamt-progressiver Spermien (Spermien-Motilität-A+B) ($\rho = -,293$; $p < 0,01$). Eine positive Korrelation zeigte sich demgegenüber zwischen S100A12 und dem Anteil immotiler Spermien (Spermien-Motilität-D) ($\rho = ,322$; $p < 0,01$).

Neben den Korrelationen zu Fertilitätsparametern zeigten sich auch in der Subgruppenanalyse signifikante Korrelationen von S100A12 im Seminalplasma mit Entzündungsmarkern im Spermioграмm. Positive Korrelationen fanden sich hier mit der Anzahl von Leukozyten ($\rho = ,419$; $p < 0,0001$; Anhang Figure 29) und PPZ ($\rho = ,551$; $p < 0,0001$; Anhang Figure 30) sowie den Ejakulat-Konzentrationen von Elastase ($\rho = ,686$; $p < 0,0001$; Anhang Figure 31) und Interleukin-8 ($\rho = ,647$; $p < 0,0001$; Anhang Figure 32). Auch bei der isolierten Betrachtung der CP/CPPS-Kohorte zeigten sich positive Korrelationen mit S100A12: Anzahl von Leukozyten ($\rho = ,439$; $p = 0,001$) und Peroxidase-positiver Zellen ($\rho = ,509$; $p < 0,0001$), Ejakulat-Konzentrationen von Elastase ($\rho = ,764$; $p < 0,0001$) und Interleukin-8 ($\rho = ,624$; $p < 0,0001$). Darüber hinaus zeigte die S100A12 im Seminalplasma in der CP/CPPS-Kohorte eine signifikante Korrelation mit der Proteinkonzentration von S100A12 im Blutserum ($\rho = ,700$; $p < 0,05$; Anhang Figure 33).

4.2.2.2 S100A12 im Blutserum

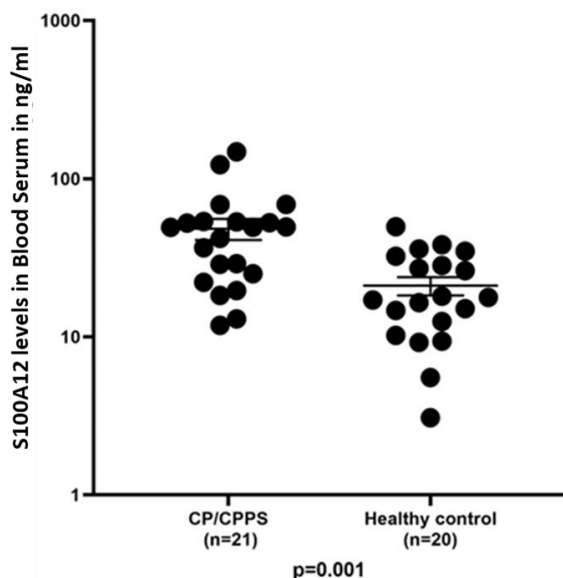


Abbildung 25 **Proteinkonzentrationen von S100A12 im Blutserum nach Matching der Kohorten gegenüber dem Alter.** In der Abbildung sind die Ergebnisse der Proteinkonzentrationen von S100A12 im Blutserum im Zuge der Subgruppenanalyse nach Matching der Kohorten gegenüber dem Alter dargestellt. Untersucht wurden 21 CPPS-Patienten und 20 gesunde Kontrollen. Es zeigten sich signifikant höhere Proteinkonzentrationen von S100A12 im Blutserum der CP/CPPS-Patienten verglichen mit der gesunden Kontrollgruppe ($p = 0,001$). Die Proteinkonzentration in CP/CPPS-Patienten lag im Median bei 49,24 ng/ml und reichte von 11,82 ng/ml bis 148,12 ng/ml. In der gesunden Kontrollgruppe lag die Proteinkonzentration im Median bei 17,42 ng/ml und reichte von 3,08 ng/ml bis 49,72 ng/ml.

4. Ergebnisse

Im Anschluss analysierten wir die Proteinkonzentration von S100A12 im Blutserum. Auch nach Matching gegenüber dem Alter fanden sich signifikant höhere Spiegel in der CP/CPPS-Kohorte ($p=0,001$). Untersucht wurden Blutseren von 21 Patienten und 20 Kontrollen. Die Spiegel in CP/CPPS lagen im Median bei 49,24 ng/ml und reichten von 11,82 ng/ml bis 148,12 ng/ml. In der Kontrollgruppe lag die Proteinkonzentration im Median bei 17,42 ng/ml und reichte von 3,08 ng/ml bis 49,72 ng/ml (Abb. 25).

Die Proteinkonzentration von S100A12 im Blutserum zeigte bei Betrachtung der Gesamtkohorte keine Korrelation mit dem Alter. Bei isolierter Betrachtung der CP/CPPS-Patienten zeigte sich hier jedoch eine positive Korrelation ($\rho= ,435$; $p<0,05$; Anhang Figure 34). In der gesunden Kontrollgruppe bestand keine signifikante Korrelation.

Des Weiteren zeigte die Proteinkonzentration von S100A12 im Blutserum eine positive Korrelation mit der Punktzahl im NIH-CPSI ($\rho= ,405$; $p<0,01$) sowie den einzelnen Subkategorien: Kategorie 1 ($\rho= ,426$; $p<0,01$; Anhang Figure 35), Kategorie 2 ($\rho= ,310$; $p<0,05$) und Kategorie 3 ($\rho= ,341$; $p<0,05$). Bei isolierter Betrachtung der gesunden Kontrollgruppe zeigte sich eine negative Korrelation mit der Punktzahl in der Kategorie 3 des CPSI-Fragebogens ($\rho= -,526$; $p<0,05$). In der reinen CP/CPPS-Kohorte zeigten sich keinerlei Korrelationen mit den Ergebnissen aus den Fragebögen.

Im Spermogramm zeigte sich für die Gesamtkohorte eine negative Korrelation zwischen der Proteinkonzentration von S100A12 im Blutserum und dem pH-Wert im Ejakulat ($\rho= -,569$; $p<0,0001$; Anhang Figure 36). Auch bei isolierter Betrachtung der gesunden Kontrollgruppe zeigte sich eine negative Korrelation zwischen den beiden Variablen ($\rho= -,471$; $p<0,05$; Anhang Figure 37). Bei Patienten fand sich keine signifikante Korrelation. Darüber hinaus zeigte sich in der Gesamtkohorte eine positive Korrelation mit den Spiegeln von Interleukin-8 im Ejakulat ($\rho= ,439$; $p<0,01$; Anhang Figure 38).

4.3 Selektionierte Schmerzkohorte

4.3.1 Selektionierung der Schmerzpatienten

Im letzten Teil der Studie untersuchten wir Patienten, die als NIH 3B kategorisiert wurden und im Bereich des CPSI I einen hohen Schmerzimpact aufwiesen. Um eine möglichst objektive Charakterisierung des Schmerzes zu generieren, nutzten wir die Schmerzkategorie des NIH-CPSI. Es wurden lediglich CP/CPPS-Patienten eingeschlossen, die höchste Schmerzen angaben (14-21 Punkte in Kategorie 1 des NIH-CPSI). In der Patientenkohorte reichten die Punktzahlen von 14 bis 20 Punkten. Demgegenüber reichten die Punktzahlen in der Kontrollgruppe von 0 bis 10. Der Median lag bei den Gesunden bei 0 Punkten, während er in Patienten bei 16 Punkten lag.

4. Ergebnisse

4.3.2 Charakterisierung der Schmerzkohorte anhand von Fragebögen, Spermogramm und Labordiagnostik

Das durchschnittliche Alter der Kontrollgruppe lag bei 28,39 Jahren mit einer Spannweite von 19-60 Jahren. In der selektionierten Patientenkohorte lag das durchschnittliche Alter bei 39,67 Jahren und reichte von 20-62 Jahren. Zunächst erfolgte eine Charakterisierung des Studienkollektivs mit Fragebögen (siehe Tabelle 19). Im Anschluss erstellten wir ein Spermogramm gemäß WHO-Kriterien (siehe Tabelle 20). Die CP/CPPS-Kohorte unterzogen wir zudem einer labortechnischen Routinediagnostik (siehe Tabelle 21).

Tabelle 19 **Ergebnisse der andrologischen Fragebögen für die Kohorte der CP/CPPS-Patienten mit starken Schmerzen.** Analysiert wurden der CPSI (Chronic Prostatitis Symptome Index), der IPSS (International Prostate Symptome Score) und der IIEF (International Index of Erectile Function). Abgebildet sind Fallzahl (n), Median und Spannweite sowie Signifikanz (p) im Mann-Whitney U-Test.

| Fragebogen | CP/CPPS | | | Kontrollgruppe | | | p |
|---|---------|--------|--------|----------------|--------|--------|------|
| | n | Median | Spanne | n | Median | Spanne | |
| IPSS | 43 | 16 | 0-33 | 73 | 2 | 0-11 | ,000 |
| CPSI-Kategorie1 Schmerz | 46 | 16 | 14-20 | 95 | 0 | 0-10 | ,000 |
| CPSI-Kategorie2 Miktion | 46 | 5,5 | 0-10 | 95 | 1 | 0-5 | ,000 |
| CPSI-Kategorie3 Einfluss auf die Lebensqualität | 46 | 11 | 2-12 | 95 | 0 | 0-6 | ,000 |
| CPSI-Gesamtpunktzahl | 46 | 32 | 20-40 | 95 | 1 | 0-17 | ,000 |
| IIEF | 25 | 19 | 4-30 | 52 | 29 | 8-30 | ,000 |

Tabelle 20 **Ergebnisse der labortechnischen Routinediagnostik an der CP/CPPS-Kohorte mit starken Schmerzen.** In der folgenden Tabelle sind die Ergebnisse der urologischen Routinediagnostik abgebildet. Ermittelt wurden jeweils die Fallzahl (n), der Median und die Spannweite.

| | n | Median | Spannweite | Referenzwerte |
|---|----|--------|------------|---------------|
| CRP (mg/dl) | 46 | 0,5 | 0,5-47 | <5 |
| PSA (ng/ml) | 45 | 0,63 | 0,2-3,88 | <2,5 |
| Leukozyten im Anfangsurin (Anzahl/ Gesichtsfeld in der Mikroskopie) | 46 | 0,5 | 0-25 | 0 |
| Leukozyten im ExUr (Anzahl/ Gesichtsfeld in der Mikroskopie) | 46 | 0,5 | 0-25 | 0 |

Tabelle 21 **Charakterisierung der CP/CPPS-Kohorte mit starken Schmerzen und Kontrollkohorte mittels Spermogramm.** Abgebildet sind die Ergebnisse der Spermogramme. Ermittelt wurden Fallzahl (n), Median und Spannweite sowie die Signifikanz (p) im Mann-Whitney U-Test.

| | Gesunde | | | CP/CPPS | | | p |
|---------|---------|--------|------------|---------|--------|------------|------|
| | n | Median | Spannweite | n | Median | Spannweite | |
| Volumen | 99 | 3,1 | 0,45-9,1 | 45 | 2,30 | 0,05-8,5 | ,025 |
| pH-Wert | 99 | 8,2 | 7,2-8,7 | 45 | 7,9 | 7,3-9,0 | ,000 |

4. Ergebnisse

| | | | | | | | |
|----------------------------|----|--------|------------|----|--------|-----------|------|
| Spermien-Dichte(Mio/ml) | 99 | 44,6 | 2,9-256,5 | 45 | 41,4 | 0-385 | ,338 |
| Spermien-Anzahl (Mio) | 97 | 165,75 | 7,8-787,32 | 45 | 95,22 | 0-1046,75 | ,033 |
| Spermien-Motilität A (%) | 99 | 40 | 0-72 | 40 | 19 | 0-46 | ,000 |
| Spermien-Motilität B (%) | 99 | 21 | 3-42 | 40 | 27 | 9-40 | ,000 |
| Spermien-Motilität C (%) | 99 | 11 | 1-28 | 40 | 8 | 4-40 | ,120 |
| Spermien-Motilität D (%) | 99 | 25 | 11-82 | 40 | 40 | 24-80 | ,000 |
| Progressive Spermien (%) | 99 | 62 | 4-86 | 30 | 49 | 12-72 | ,000 |
| Normale Spermien (%) | 99 | 13 | 0-52 | 42 | 5,5 | 0-18 | ,000 |
| Kopfdefekte(%) | 99 | 76 | 42-99 | 42 | 75,5 | 0-100 | ,480 |
| Mittelstück-defekte (in %) | 99 | 40 | 6-77 | 41 | 12 | 0-80 | ,000 |
| Flaggelen-defekte (in %) | 99 | 19 | 3-56 | 38 | 49 | 0-89 | ,000 |
| PPL (Mio.) | 99 | 0,00 | 0-10,4 | 44 | 0,10 | 0-2 | ,069 |
| Zink (mg/dl/Ej) | 46 | 18,0 | 3,2-103,2 | 41 | 5,1 | 1,1-42,2 | ,000 |
| Elastase(ng/ml) | 59 | 18,0 | 10-2000 | 42 | 17,0 | 10-640 | ,429 |
| IL-8 (pg/ml) | 40 | 1752,0 | 165-22946 | 38 | 2243,0 | 753-15737 | ,226 |

4.3.3 Promotormethylierungsanalyse und Genexpressionsanalyse von Tumornekrosefaktor-alpha (*TNF α*)

4.3.3.1 Promotormethylierung von *TNF α*

Um die epigenetische Regulation von *TNF α* auf DNA-Ebene zu analysieren, nutzten wir COBRA. Hierdurch war eine Unterscheidung in nicht-methyliert, leicht-methyliert, stark-methyliert und vollständig-methyliert möglich. Die Einteilung erfolgte nach visuellem Eindruck, ohne die Zugehörigkeit zur Patienten- oder Kontrollgruppe zu kennen. Entsprechend dieses Vorgehens analysierten wir 24 gesunde Kontrollen und verglichen sie mit 29 CP/CPPS-Patienten. Die Ergebnisse wurden anschließend statistisch mittels Fisher Exact Test untersucht. Die Resultate sind in der folgenden Tabelle dargestellt:

Tabelle 22 **Status der Promotormethylierung von *TNF α* nach Unterteilung in methyliert und nicht-methyliert.** Kreuztabelle aus der Promotormethylierungsanalyse mittels COBRA der untersuchten CpG-Region von *TNF α* in ExUr-Pellets. Unterteilung der Proben nach visuellem Eindruck verblindet in „methyliert“ und „nicht-methyliert“. Von 24 Gesunden zeigten sich 16 methyliert und 8 nicht-methyliert. Von 29 Patienten lagen 9 methyliert und 20 nicht-methyliert vor.

| | Status der Promotormethylierung | | Gesamt |
|-----------|---------------------------------|-------------|--------|
| | Nicht-Methyliert | Methyliert | |
| Gesunde | 8 (33,3 %) | 16 (66,7 %) | 24 |
| Patienten | 20 (69 %) | 9 (31 %) | 29 |
| Gesamt | 28 | 25 | 53 |

4. Ergebnisse

Insgesamt wurden auf dieser Grundlage von 24 Gesunden 16 als methyliert und 8 als nicht-methyliert eingestuft. Im Vergleich dazu wurden von 29 Patienten insgesamt 9 als methyliert und 20 als nicht-methyliert kategorisiert. Im Fisher Exact Test zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen Patienten und Gesunden ($p < 0,05$). Die CpG-Region lag in Patienten folglich signifikant weniger stark methyliert vor (siehe Abb. 26).

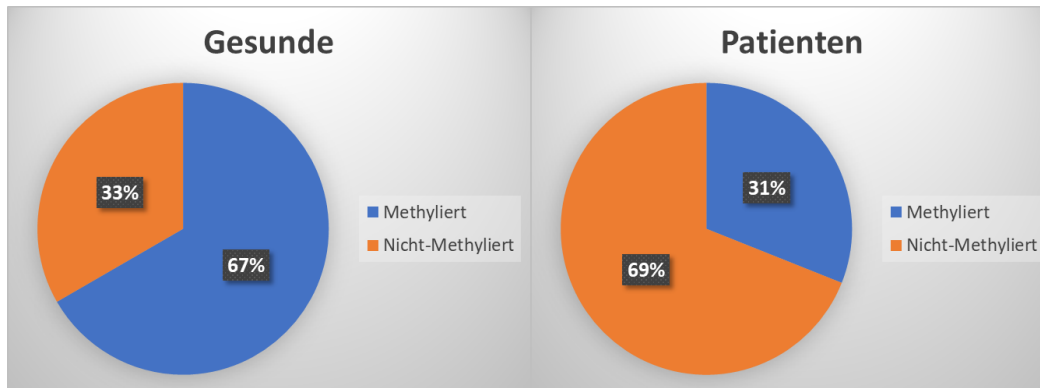


Abbildung 26 **Status der Promotormethylierung von *TNFα* nach Unterteilung in methyliert und nicht-methyliert.** Graphische Darstellung der COBRA-Ergebnisse aus der Promotormethylierungsanalyse der untersuchten CpG-Region von *TNFα* in ExUr-Pellets in Form eines Kreisdiagramms. Bei der Einteilung in „methyliert“ und „nicht-methyliert“ zeigten sich 33 % der Gesunden und 69 % der Patienten als nicht-methyliert. Demgegenüber wurden 67 % der Gesunden und 31 % der Patienten als methyliert kategorisiert.

Zusammenfassend wurden 33 % der Gesunden und 69 % der Patienten als nicht-methyliert eingeordnet. Demgegenüber wurden 67 % der Gesunden und 31 % der Patienten als methyliert kategorisiert. Im Anschluss erfolgte eine weitere Unterteilung der als methyliert gewerteten Proben, in leichte und starke Methylierungen. Auch hier zeigte sich im Fisher Exact Test ein signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) (siehe Abb. 27)

Tabelle 23 **Status der Promotormethylierung von *TNFα* nach Unterteilung in nicht-, leicht- und stark-methyliert.** Kreuztabelle der COBRA-Ergebnisse aus der Promotormethylierungsanalyse der CpG-Region von *TNFα* in ExUr-Pellets. Unterteilung der Proben nach visuellem Eindruck verblindet in „nicht-methyliert“ und „leicht-methyliert“ und „stark-methyliert“. Von 24 Gesunden zeigten sich 8 „nicht-methyliert“, 10 „leicht-methyliert“ und 6 „stark-methyliert“. In der Patientenkohorte lagen von insgesamt 29 Patienten 20 „nicht-methyliert“, 7 „leicht-methyliert“ und 2 „stark-methyliert“ vor. Im Fisher Exact Test stellte sich auch bei dieser Einteilung ein signifikanter Unterschied zwischen Patienten und Gesunden dar ($p < 0,05$).

| | Status der Promotormethylierung | | | Gesamt |
|-----------|---------------------------------|-------------------|------------------|--------|
| | Nicht-Methyliert | Leicht Methyliert | Stark Methyliert | |
| Gesunde | 8 (33,3 %) | 10 (41,7 %) | 6 (25 %) | 24 |
| Patienten | 20 (69 %) | 7 (24,1 %) | 2 (6,9 %) | 29 |
| Gesamt | 28 | 17 | 8 | 53 |

Insgesamt zeigten sich bei dieser Einteilung sowohl der Anteil der leicht-methylierten als auch der Anteil der stark-methylierten in der Kontrollgruppe höher. 42 % der Gesunden

4. Ergebnisse

und nur 24 % der Patienten zeigten eine leichte Methylierung. Ein noch größerer Unterschied fand sich in der Gruppe der stark-methylierten Proben. Insgesamt wurden 25 % der Gesunden und nur 7 % der Patienten als stark-methyliert gewertet.

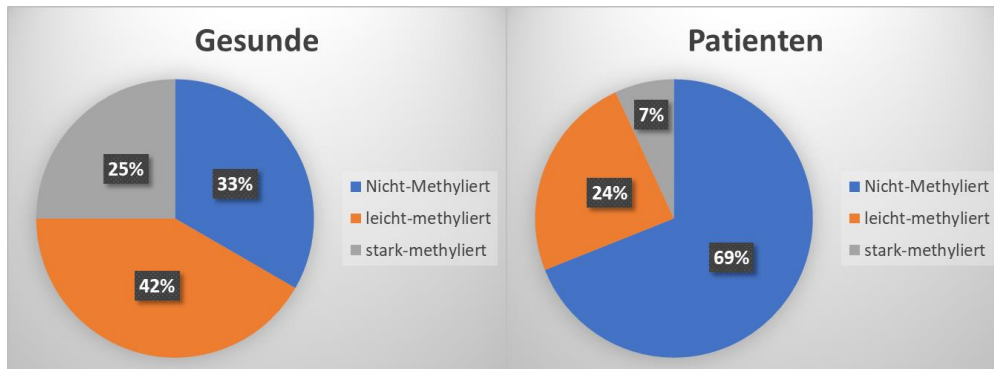


Abbildung 27 **Status der Promotormethylierung von *TNFα* nach Unterteilung in nicht-, leicht- und stark-methyliert.** Graphische Darstellung der COBRA-Ergebnisse aus ExUr-Pellets in Form eines Kreisdiagramms. Bei der Einteilung in „nicht-methyliert“, „leicht-methyliert“ und „stark-methyliert“ zeigten sich 33 % der Gesunden und 69 % der Patienten nicht-methyliert. 42 % der Gesunden und nur 24 % der Patienten zeigten eine leichte Methylierung. 25 % der Gesunden und nur 7 % der Patienten wurden als stark-methyliert gewertet. Im Fisher Exact Test stellte sich auch hier ein signifikanter Unterschied zwischen Patienten und Gesunden dar ($p < 0,05$).

4.3.3.2 Genexpression von *TNFα* im ExUr-Pellet

Im nächsten Schritt analysierten wir die Genexpression von *TNFα* im ExUr-Pellet von 22 Patienten und 21 Gesunden. Hier zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Kohorten ($p > 0,05$). (siehe Anhang Figure 39). In der Korrelationsanalyse mittels Spearman-Rho zeigte sich eine signifikante Korrelation der Genexpressionen von *TNFα* und *CCL3* im ExUr-Pellet ($\rho = ,426$; $p < 0,05$).

Nach den oben beschriebenen Analysen teilten wir die Genexpressionen von Patienten und Gesunden neu in die Kategorien „nicht-methyliert“ und „methyliert“ ein. Diese Einteilung erfolgte gemäß den oben beschriebenen Ergebnissen der COBRA von *TNFα*. Beide Kategorien enthielten anschließend sowohl Patienten als auch Gesunde. In der Genexpressionsanalyse dieser beiden Kohorten zeigte sich ein signifikanter Unterschied mit höheren Genexpressionen der „nicht-methylierten“ Kohorte ($p < 0,05$) (siehe Abb. 28).

Neben Unterschieden in der Genexpression von *TNFα* stellten sich bei Unterteilung in „Methyliert“ und „Nicht-Methyliert“ weitere Unterschiede dar. Die „nicht-methylierte“-Kohorte wies signifikant höhere Punktwerte im NIH-CPSI in den Kategorien 1 und 2 sowie der Gesamtpunktzahl auf ($p < 0,05$). Demgegenüber fanden sich in der „methylierten“-Kohorte höhere Promotormethylierungen von *SLC6A4* ($p < 0,05$).

4. Ergebnisse

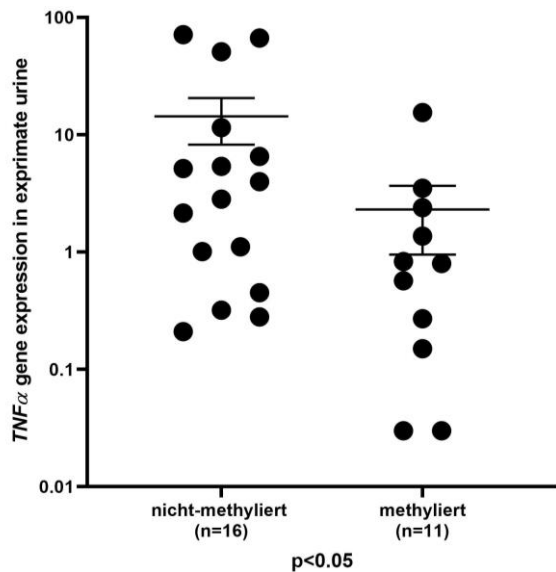


Abbildung 28 **Genexpressionsanalyse von *TNF α* im ExUr-Pellet nach Unterteilung in Nicht-Methyliert und Methyliert.** In der Abbildung sind die Genexpressionen von *TNF α* im ExUr-Pellet für die Kohorten „methyliert“ (n=11) und „nicht-methyliert“ (n=16) gemäß der Einteilung aus der Promotormethylierungsanalyse mittels COBRA dargestellt. Beide Gruppen enthielten sowohl Patienten als auch gesunde Kontrollen. In der statistischen Auswertung mittels Mann-Whitney-U-Test zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen. Die Genexpression von *TNF α* in der Kohorte der „nicht-methylierten“ fiel signifikant höher aus, verglichen mit der „methylierten“ Kohorte ($p < 0,05$).

4.3.4 Promotormethylierungsanalyse, Genexpressionsanalyse und Proteinmessung von Nerve-Growth-Factor (*NGF*)

4.3.4.1 Promotormethylierung von NGF im ExUr-Pellet

Die Promotormethylierung von NGF im ExUr-Pellet untersuchten wir mit Pyrosequenzierung. In der analysierten CpG-Region fanden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen Patienten und Gesunden. Die CpG-Region umfasste vier Positionen, an denen eine Methylierung vorliegen konnte. Weder an einer einzelnen Position noch bei der durchschnittlichen Methylierung fanden sich signifikante Unterschiede (siehe Abb. 29). Es zeigte eine positive Korrelation der Promotormethylierung von NGF im ExUr-Pellet mit der Konzentration von Zink im Ejakulat ($\rho = ,316$; $p < 0,05$) sowie dem Anteil immotiler Spermien ($\rho = ,283$; $p < 0,05$). Eine signifikante Korrelation mit dem BMI stellte sich ebenfalls dar ($\rho = ,584$; $p < 0,05$).

4.3.4.2 Genexpression von NGF im ExUr-Pellet

In der anschließenden Genexpressionsanalyse von NGF im ExUr-Pellet untersuchten wir 31 Patienten und 26 Kontrollen. Es zeigte sich eine signifikant niedrigere Genexpression in der Patientenkohorte ($p = 0,01$) (siehe Abb. 30). Es fanden sich keine signifikanten Korrelationen der Genexpression von NGF mit der zugehörigen Promotormethylierung oder der Proteinkonzentration im ExUr. Demgegenüber zeigten sich positive Korrelationen mit den Genexpressionen von TAC1R ($\rho = ,618$; $p < 0,0001$),

4. Ergebnisse

PTGS2 ($\rho = ,527$; $p < 0,0001$) und CCL3 ($\rho = ,370$; $p < 0,01$). Des Weiteren bestanden negative Korrelationen mit dem Alter ($\rho = -,310$; $p < 0,05$) sowie den Gesamtpunktzahlen im IPSS ($\rho = -,516$; $p < 0,0001$) und CPSI ($\rho = -,397$; $p < 0,01$).

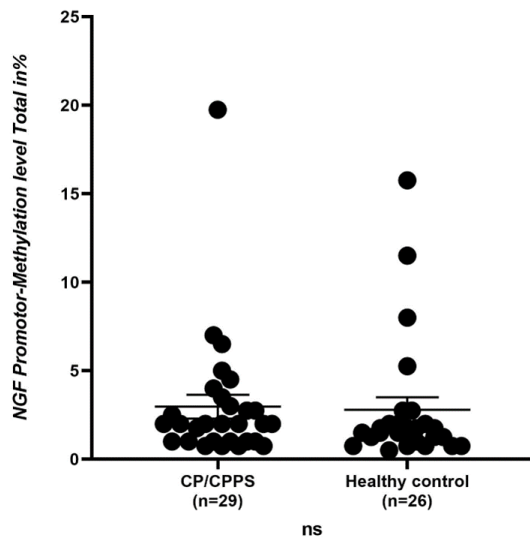


Abbildung 29 **Promotormethylierungsanalyse von NGF im ExUr-Pellet.** Abgebildet sind die Ergebnisse der Promotormethylierungsanalyse von NGF im ExUr-Pellet. Mittels Pyrosequenzierung untersuchten wir 29 Patienten und 26 Kontrollen auf Methylierungen in einer regulierenden CpG-Region von NGF an 4 Positionen. Der dargestellte Boxplot zeigt die durchschnittliche Methylierung über alle 4 Positionen hinweg. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied ($p > 0,05$).

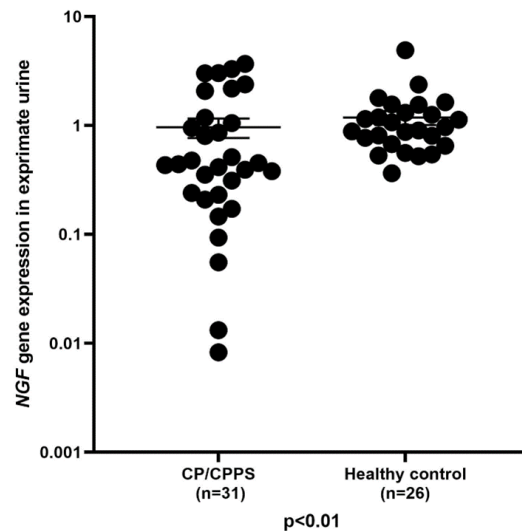


Abbildung 30 **Genexpressionsanalyse von NGF im ExUr-Pellet.** In der Abbildung sind die Genexpressionen von NGF im ExUr-Pellet für die Gruppe der CP/CPPS-Patienten gegenüber der gesunden Kontrollgruppe dargestellt. Untersucht wurden 31 Patienten und 26 gesunde Kontrollen. Es zeigte sich eine signifikante niedrigere Genexpression von NGF in CP/CPPS-Patienten verglichen mit der gesunden Kontrollgruppe ($p = 0,01$).

4.3.4.3 Proteinkonzentration von NGF im ExUr

Die Proteinkonzentration von NGF im ExUr von 24 Patienten und 24 Kontrollen zeigte sich in der Patientenkohorte signifikant erhöht ($p < 0,01$) (siehe Abb. 31). Die durchschnittliche Konzentration in Patienten lag bei 175,77 pg/ml und reichte von 0,00 pg/ml bis 726,75 pg/ml. In der Kontrollgruppe lag sie durchschnittlich bei 58,90 pg/ml und reichte von 0,00 pg/ml bis 208,13 pg/ml. Die Proteinkonzentration von NGF korrelierte positiv mit den Punktzahlen der einzelnen Kategorien des CPSI-Scores (Kategorie I ($\rho = ,347$; $p < 0,05$), Kategorie II ($\rho = ,400$; $p < 0,01$) und Kategorie III ($\rho = ,429$; $p < 0,01$)) sowie der Gesamtpunktzahl ($\rho = ,352$; $p = 0,001$). Darüber hinaus bestand eine negative Korrelation mit dem Anteil immotiler Spermien ($\rho = -,508$; $p < 0,05$).

4. Ergebnisse

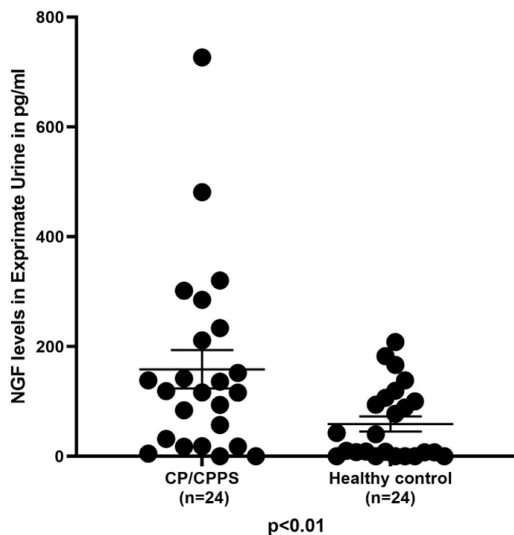


Abbildung 31 **Proteinkonzentration von NGF im ExUr.** In der Abbildung sind die Proteinkonzentrationen von NGF im ExUr dargestellt. Untersucht wurden 24 CPPS-Patienten und 24 Kontrollen mittels ELISA. Es zeigten sich signifikant höhere NGF-Spiegel in CP/CPPS-Patienten ($p < 0,01$). Die durchschnittliche Proteinkonzentration von Patienten lag bei 175,77 pg/ml und reichte von 0,00 pg/ml bis 726,75 pg/ml. In der Kontrollgruppe lag sie durchschnittlich bei 58,90 pg/ml und reichte von 0,00 pg/ml bis 208,13 pg/ml.

4.3.5 Promotormethylierungsanalyse und Genexpressionsanalyse von Cyclooxygenase-2 (*PTGS2*)

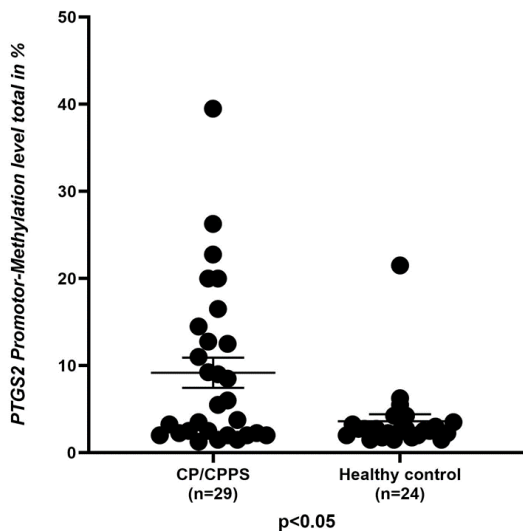


Abbildung 32 **Promotormethylierungsanalyse von *PTGS2* im ExUr-Pellet.** Dargestellt sind die Ergebnisse der Promotormethylierungsanalyse von *PTGS2* in ExUr-Pellets. Mittels Pyrosequenzierung untersuchten wir 29 Patienten und 24 gesunde Kontrollen auf Methylierungen in einer regulierenden Promotorregion von *PTGS2* an 4 Positionen. Der Boxplot zeigt die durchschnittliche Methylierung über alle 4 Positionen hinweg. Es fand sich durchschnittlich eine signifikant höhere Methylierung in Patienten ($p < 0,05$).

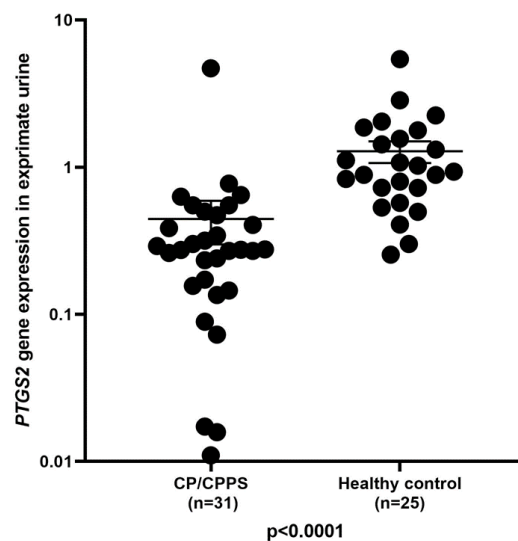


Abbildung 33 **Genexpressionsanalyse von *PTGS2* im ExUr-Pellet.** In der Abbildung sind die Genexpressionen von *PTGS2* in ExUr-Pellets von CP/CPPS-Patienten gegenüber der Kontrollgruppe dargestellt. Untersucht wurden 31 Patienten und 25 Gesunde. Es zeigte sich eine signifikante niedrigere Genexpression von *PTGS2* in CP/CPPS-Patienten verglichen mit der gesunden Kontrollgruppe ($p < 0,0001$).

4.3.5.1 Promotormethylierung von *PTGS2* im ExUr-Pellet

Für die quantitative Bestimmung der Promotormethylierung von *PTGS2* im ExUr-Pellet verwendeten wir Pyrosequenzierung. In der analysierten CpG-Region fand sich durchschnittlich eine signifikant höhere Promotormethylierung von *PTGS2* in der Patientenkohorte ($p < 0,05$). Untersucht wurden 29 CP/CPPS-Patienten und 24 Kontrollen. An vier Positionen dieser Region war eine Methylierung möglich. Das Ergebnis für die durchschnittliche Methylierung aller Positionen ist in Abb. 32 dargestellt.

Es fand sich eine positive Korrelation mit der Promotormethylierung von *SLC6A4* ($\rho = ,400$; $p < 0,0001$). Darüber hinaus stellte sich eine positive Korrelation mit den Punktzahlen der Kategorien I ($\rho = ,424$; $p < 0,01$) und III ($\rho = ,307$; $p < 0,05$), sowie der Gesamtpunktzahl des NIH-CPSI ($\rho = ,315$; $p < 0,05$) dar. Eine negative Korrelation zeigte sich dem gegenüber mit der Gesamtpunktzahl des IIEF-Index ($\rho = -,392$; $p < 0,05$).

4.3.5.2 Genexpression von *PTGS2* im ExUr-Pellet

In der anschließenden Genexpressionsanalyse von *PTGS2* im ExUr-Pellet untersuchten wir 31 Patienten und 25 Kontrollpersonen. Es zeigte sich eine signifikant niedrigere Genexpression in der Patientenkohorte ($p < 0,0001$) (siehe Abb. 33). In der einseitigen Spearman-Korrelationsanalyse zeigte sich des Weiteren eine negative Korrelation mit der zugehörigen Promotormethylierung in ExUr-Pellets ($\rho = -,292$; $p < 0,05$). Eine negative Korrelation zeigte sich zudem mit den einzelnen Kategorien des NIH-CPSI (Kategorie I ($\rho = -,587$; $p < 0,0001$), Kategorie II ($\rho = -,480$; $p < 0,0001$) und Kategorie III ($\rho = -,457$; $p = 0,001$)), sowie der Gesamtpunktzahl ($\rho = -,558$; $p < 0,0001$) und dem Alter ($\rho = -,543$; $p < 0,0001$). Mit der Gesamtpunktzahl im IIEFF zeigte sich demgegenüber eine positive Korrelation ($\rho = ,405$; $p < 0,05$). Weitere positive Korrelationen bestanden mit dem pH-Wert im Ejakulat ($\rho = ,358$; $p < 0,01$) sowie den Genexpressionen von *NGF* ($\rho = ,527$; $p < 0,0001$) und *TAC1R* ($\rho = ,484$; $p < 0,0001$).

4.3.6 Genexpressionsanalyse und Proteinmessung von Monocyte Chemoattractant Protein 1 (CCL2) und Macrophage Inflammatory Protein 1 Alpha (CCL3)

4.3.6.1 Die Genexpression von *CCL2* und *CCL3* im ExUr-Pellet

In den Genexpressionsanalysen von *CCL2* und *CCL3* im ExUr-Pellet zeigte sich eine signifikant höhere Genexpression von *CCL3* im ExUr-Pellet von CP/CPPS-Patienten ($p < 0,01$). Im Fall von *CCL3* untersuchten wir insgesamt 31 Patienten und 25 Kontrollen (siehe Abb. 35). Für die Genexpression von *CCL2* fanden sich im ExUr-Pellet keine signifikanten Unterschiede. Untersucht wurden hier 25 Patienten und 26 Kontrollen (siehe Abb. 34).

4. Ergebnisse

Die Genexpression von *CCL2* zeigte eine positive Korrelation mit der Genexpression von *IL1 β* in ExUr-Pellet ($\rho = ,491$; $p < 0,01$). Im Spermogramm bestand eine negative Korrelation mit dem Entzündungsmarker Elastase ($\rho = -,343$; $p < 0,05$). Eine positive Korrelation bestand zwischen der Genexpression von *CCL3* und den Genexpressionen von *TNF α* ($\rho = ,417$; $p < 0,05$), *IL1 β* ($\rho = ,504$; $p = 0,001$) und *NGF* ($\rho = ,370$; $p < 0,01$) in ExUr-Pellets. Zudem bestand eine positive Korrelation mit der Punktzahl in der Kategorie III ($\rho = ,351$; $p < 0,05$) sowie der Gesamtpunktzahl des NIH-CPSI ($\rho = ,289$; $p < 0,05$).

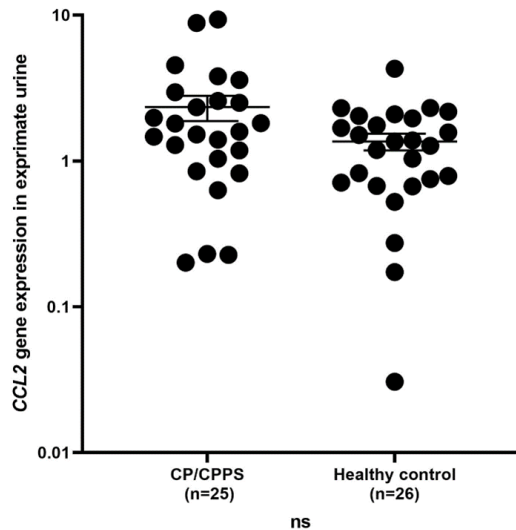


Abbildung 34 **Genexpressionsanalyse von *CCL2* im ExUr-Pellet.** In der Abbildung sind die Genexpressionen von *CCL2* in ExUr-Pellets für Patienten gegenüber der Kontrollgruppe dargestellt. Untersucht wurden 25 Patienten und 26 gesunde Kontrollen. Hier zeigte sich kein signifikanter Unterschied ($p > 0,05$).

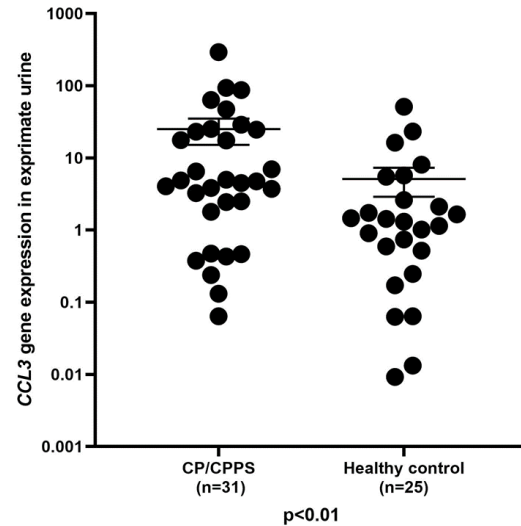


Abbildung 35 **Genexpressionsanalyse von *CCL3* im ExUr-Pellet.** In der Abbildung sind die Genexpressionen von *CCL3* in ExUr-Pellets von Patienten und Gesunden dargestellt. Untersucht wurden 31 Patienten und 25 gesunde Kontrollen. Es zeigte sich eine signifikant höhere Genexpression in der Patientenkohorte ($p < 0,01$).

4.3.6.2 Proteinkonzentrationen von *CCL2* im ExUr und *CCL3* im Blutserum

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration von *CCL2* im ExUr und *CCL3* im Blutserum nutzen wir ELISA. Die Messungen im ExUr zeigten keine signifikanten Unterschiede der *CCL2*-Konzentration zwischen Patienten und Gesunden ($p > 0,05$). Untersucht wurden 14 Patienten und 18 Kontrollen (siehe Abb. 36). Demgegenüber fanden sich signifikant höhere Spiegel von *CCL3* im Blutserum ($p < 0,01$). Untersucht wurden Blutseren von 20 Patienten und 20 Gesunden (siehe Abb. 37).

Die ExUr-Konzentration von *CCL2* wies eine negative Korrelation mit der Kategorie II ($\rho = -,464$; $p < 0,01$) und der Gesamtpunktzahl des CPSI-Scores auf ($\rho = -,416$; $p < 0,05$). Demgegenüber wies die Proteinkonzentration von *CCL3* eine negative Korrelation mit der Genexpression von *NGF* im ExUr-Pellet auf ($\rho = -,520$; $p < 0,05$). Des Weiteren bestanden positive Korrelationen mit dem Alter ($\rho = ,457$; $p < 0,01$), den

4. Ergebnisse

Gesamtpunktzahlen im IPSS ($\rho = ,356$; $p < 0,05$) und NIH-CPSI ($\rho = ,362$; $p < 0,05$), sowie dessen Kategorien II ($\rho = ,344$; $p < 0,05$) und III ($\rho = ,330$; $p < 0,05$).

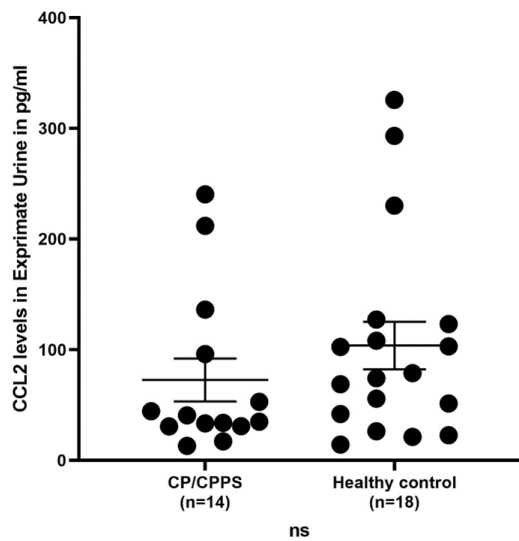


Abbildung 36 **Proteinkonzentration von CCL2 im ExUr**. In der Abbildung sind die Proteinkonzentrationen von CCL2 im ExUr mittels ELISA dargestellt. Untersucht wurden 14 Patienten und 18 Kontrollen. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied der CCL2-Konzentrationen ($p > 0,05$). Die durchschnittliche Proteinkonzentration in Patienten lag bei 72,67 pg/ml und reichte von 13,12 pg/ml bis 240,42 pg/ml. In der Kontrollgruppe lag die durchschnittliche Proteinkonzentration bei 103,84 pg/ml und reichte von 14,25 pg/ml bis 325,80 pg/ml.

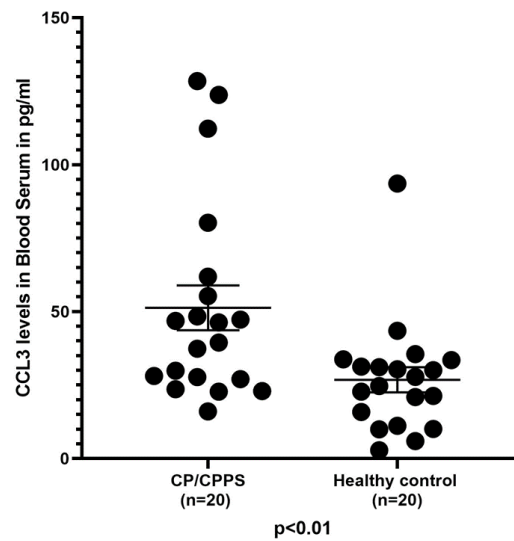


Abbildung 37 **Proteinkonzentration von CCL3 im Blutserum**. In der Abbildung sind die Proteinkonzentrationen von CCL3 im Blutserum dargestellt. Untersucht wurden 20 Patienten und 20 Kontrollen. Es zeigte sich signifikant höhere Proteinkonzentrationen in CP/CPSPS-Patienten ($p < 0,01$). Die durchschnittliche CCL3-Konzentration in CP/CPSPS lag bei 51,28 pg/ml und reichte von 16,06 pg/ml bis 128,47 pg/ml. In der Kontrollgruppe lag sie durchschnittlich bei 26,79 pg/ml und reichte von 2,81 pg/ml bis 93,61 pg/ml.

4.3.7 Genexpressionsanalyse von Interleukin-1 β (*IL1 β*)

4.3.7.1 Genexpression von *IL1 β* im ExUr-Pellet

In der Genexpressionsanalyse von *IL1 β* im ExUr-Pellet untersuchten wir 29 Patienten und 24 gesunde Kontrollen. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied ($p > 0,05$) (siehe Anhang Figure 40). Eine positive Korrelation bestand zwischen der Genexpression von *IL1 β* und den Genexpressionen von *CCL2* ($\rho = ,491$; $p < 0,01$) und *CCL3* ($\rho = ,504$; $p = 0,001$) in ExUr-Pellets. Zudem bestand in Patienten negative Korrelationen mit dem PSA ($\rho = -,479$; $p < 0,01$) und dem CRP ($\rho = -,390$; $p < 0,05$) im Blut.

4.3.8 Genexpressionsanalyse von Tachykinin-Rezeptor-1 (*TAC1R*)

4.3.8.1 Genexpression von *TAC1R* im ExUr-Pellet

Im Rahmen der Genexpressionsanalyse von *TAC1R* im ExUr-Pellet untersuchten wir 25 Patienten und 26 gesunde Kontrollen. In der Patientenkohorte zeigte sich eine signifikant niedrigere Genexpression ($p < 0,01$) (siehe Abb. 38). Eine negative Korrelation zeigte sich mit den Gesamtpunktzahlen des IPSS ($\rho = -,387$; $p < 0,01$) und NIH-CPSI ($\rho = -,375$;

4. Ergebnisse

$p < 0,01$) sowie dessen Kategorien 1 ($\rho = -,447$; $p < 0,01$) und 2 ($\rho = -,347$; $p < 0,05$). Mit den Genexpressionen von *NGF* ($\rho = ,618$; $p < 0,0001$) und *PTGS2* ($\rho = ,484$; $p < 0,0001$) zeigte sich eine positive Korrelation. Zudem zeigten sich Korrelationen mit Markern der Fertilität. Mit dem Anteil schnell-progressiver Spermien ($\rho = ,308$; $p < 0,05$), dem Anteil gesamt-progressiver Spermien ($\rho = ,333$; $p < 0,05$) und dem Anteil normaler Spermien ($\rho = ,294$; $p < 0,05$) bestand eine positive Korrelation. Demgegenüber fand sich mit dem Anteil immotiler Spermien ($\rho = -,317$; $p < 0,05$) und dem Anteil von Spermien mit Flaggelumdefekt ($\rho = -,300$; $p < 0,05$) eine negative Korrelation.

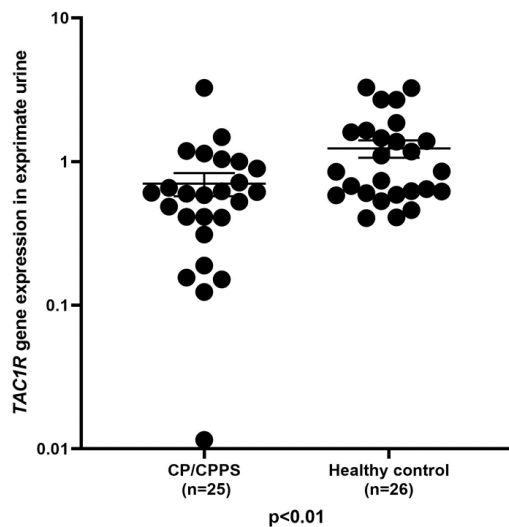


Abbildung 38 **Genexpressionsanalyse von *TAC1R* im ExUr-Pellet**. In der Abbildung sind die Genexpressionen von *TAC1R* im ExUr-Pellet für die Gruppe der CP/CPPS-Patienten gegenüber der Kontrollgruppe dargestellt. Untersucht wurden 25 Patienten und 26 Kontrollen. Es zeigte sich eine signifikant höhere Genexpression von *TAC1R* in der gesunden Kontrollgruppe ($p < 0,01$).

4.3.9 Promotormethylierungsanalyse von Solute Carrier Family 6 Member 4 (*SLC6A4*)

4.3.9.1 Promotormethylierungsanalyse *SLC6A4* im ExUr-Pellet

Zunächst analysierten wir eine regulierende CpG-Region für *SLC6A4* an 6 Positionen. Hierzu untersuchten wir 25 Patienten und 24 Kontrollen. Es zeigte sich eine signifikant höhere Promotormethylierung in der Patientenkohorte ($p < 0,0001$) (siehe Abb. 39).

In der Korrelationsanalyse fanden sich eine positive Korrelation mit dem Alter ($\rho = ,367$; $p < 0,01$) sowie den Ergebnissen der urologischen Fragebögen: IPSS ($\rho = ,558$; $p < 0,0001$), NIH-CPSI-Gesamtpunktzahl ($\rho = ,718$; $p < 0,0001$), Kat. 1 ($\rho = ,744$; $p < 0,0001$), Kat. 2 ($\rho = ,557$; $p < 0,0001$), Kat. 3 ($\rho = ,678$; $p < 0,0001$), IIEF ($\rho = -,698$; $p < 0,0001$). Eine negative Korrelation bestand mit dem pH-Wert im Ejakulat ($\rho = -,289$; $p < 0,05$). Zudem fanden sich negative Korrelationen mit Markern der Fertilität: Anteil schnell-progressiver Spermien ($\rho = -,591$; $p < 0,0001$), Anteil langsam-progressiver Spermien ($\rho = -,324$; $p < 0,05$), Anteil insgesamt-progressiver Spermien ($\rho = -,497$; $p < 0,0001$), Anteil normaler

4. Ergebnisse

Spermien ($\rho = -,443$; $p < 0,01$), Gesamtzahl Spermien im Ejakulat ($\rho = -,369$; $p < 0,01$). Positive Korrelationen bestanden mit dem Anteil immotiler Spermien ($\rho = ,599$; $p < 0,0001$) und dem Anteil von Spermien mit Flagellumdefekt ($\rho = ,509$; $p < 0,0001$).

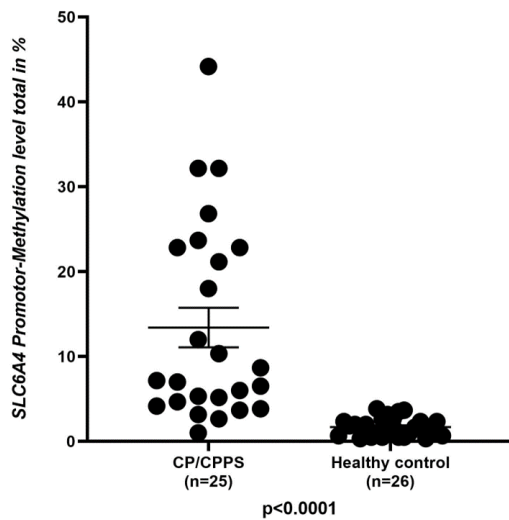


Abbildung 39 **Promotormethylierungsanalyse von *SLC6A4* im ExUr-Pellet**. Im obigen Boxplot sind die Ergebnisse der Promotormethylierungsanalyse von *SLC6A4* im ExUr-Pellet dargestellt. Mittels Pyrosequenzierung untersuchten wir 25 Patienten und 26 Kontrollen auf Methylierungen in einer regulierenden Promotorregion von *SLC6A4* an 6 Positionen. Es ist die durchschnittliche Methylierung über alle 6 Positionen dargestellt. Es zeigte sich durchschnittlich eine signifikant höhere Promotormethylierung in CP/CPPS-Patienten ($p < 0,0001$).

4.3.10 Promotormethylierungsanalyse von Calcitonin Gene-Related Peptide (*CALCA*)

4.3.10.1 Promotormethylierungsanalyse *CALCA* im ExUr-Pellet

Zudem analysierten wir eine regulierende CpG-Region für *CALCA* an vier Positionen. Hierzu untersuchten wir 29 Patienten und 29 Kontrollen. Hier bestand kein signifikanter Unterschied ($p > 0,05$) (siehe Anhang Figure 41). In der Korrelationsanalyse fand sich eine positive Korrelation mit der Promotormethylierung von *OPRM1* ($\rho = ,301$; $p < 0,05$).

4.3.11 Promotormethylierungsanalyse von Transient Receptor Potential Cation Channel Subfamily A Member 1 (*TRPA1*)

4.3.11 Promotormethylierungsanalyse *TRPA1* im ExUr-Pellet

Als nächstes analysierten wir eine regulierende CpG-Region für *TRPA1* an sechs Positionen. Hierzu untersuchten wir 29 CP/CPPS-Patienten und 26 Kontrollen. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied ($p > 0,05$) (siehe Anhang Figure 42). Zudem fand sich eine positive Korrelation mit der Konzentration von Zink im Ejakulat ($\rho = ,350$; $p < 0,05$).

4.3.12 Promotormethylierungsanalyse von Opioid Receptor Mu 1 (*OPRM1*)

4.3.12 Promotormethylierungsanalyse *OPRM1* im ExUr-Pellet

Zuletzt analysierten wir eine regulierende CpG-Region für *OPRM1* an drei Positionen. Hierzu untersuchten wir 29 Patienten und 28 Kontrollen. Es zeigte sich kein signifikanter

4. Ergebnisse

in der durchschnittlichen Promotormethylierung ($p > 0,05$) (siehe Anhang Figure 43). In der Korrelationsanalyse fanden positive Korrelationen mit der durchschnittlichen Promotormethylierung von *CALCA* im ExUr ($\rho = ,301$; $p < 0,05$) sowie der Anzahl von Leukozyten in Anfangs- ($\rho = ,508$; $p < 0,01$) und ExUr ($\rho = ,400$; $p < 0,05$).

5. Diskussion

5.1. Studienpopulation

Im Zuge der Studie untersuchten wir ein Gesamtkollektiv aus 267 Patienten und 151 gesunden Kontrollpersonen. Aufgrund der geringen Mengen des zur Verfügung stehenden Materials wurden Experimente jedoch immer nur an einzelnen Subgruppen dieser Gesamtkohorte durchgeführt. Eine Korrelationsanalyse der untersuchten Faktoren untereinander war dementsprechend nur begrenzt möglich. Die Gesamtzahl der eingeschlossenen Patienten und gesunden Kontrollen ist im Vergleich zu anderen Studien an CP/CPPS als hoch anzusehen. Für die Experimente zu den einzelnen Faktoren verwendeten wir jeweils nur einen Bruchteil aus der Gesamtkohorte. Dementsprechend sind die Fallzahlen der einzelnen Subkohorten gut vergleichbar mit den bisherigen Studien zu neuroinflammatorischen Faktoren in CP/CPPS (Desireddi et al. 2008; Miller et al. 2002). Hier sei hervorgehoben, dass dies die erste Studie zu CP/CPPS ist, die den Einfluss der neurogenen Inflammation auf die Fertilität untersucht.

In der Gesamtkohorte unserer Studie fand sich ein signifikanter Unterschied im Altersmedian zwischen Patienten (39,13 Jahre) und Kontrollgruppe (27,75 Jahre). Dies war im Wesentlichen auf die Rekrutierung der gesunden Kontrollgruppe über die Probandensuchfunktion der Universität zurückzuführen. Hierdurch kam es vermutlich zu einer Selektierung von tendenziell jüngeren Männern. Das Alter der Patientenkohorte glich demgegenüber dem üblichen Erkrankungsalter bei CP/CPPS (Krieger et al. 2008).

Es ist bereits ausgiebig erforscht, dass es im Alter physiologisch zu einer Abnahme der Fertilität kommt (Kidd et al. 2001). Um resultierende Verzerrungen aus Altersunterschieden zwischen den Kohorten auszuschließen, entschieden wir uns, ein Matching gegenüber dem Alter durchzuführen. Hierzu untersuchten wir eine Subgruppe von 90 CP/CPPS-Patienten und 90 gesunden Probanden, welche den zweiten Teil der Studie bildete. Der Altersmedian dieser Kohorte lag bei 29,4 Jahren und war somit deutlich niedriger als das klassische Alter von CP/CPPS-Patienten (Krieger et al. 2008). Hierdurch ist die Aussagekraft unserer Studie bezüglich der üblichen Patientenpopulation möglicherweise eingeschränkt. Das Alter als konfundierende Variable bei der Analyse der neurogenen Inflammation konnten wir dadurch jedoch ausschließen. In vergleichbaren Studien zu CP/CPPS wurde ein solches Matching gegenüber dem Alter bisher nicht durchgeführt.

Es erfolgte eine Charakterisierung der Studienteilnehmer anhand mehrerer Fragebögen. Maßgeblich für die Diagnostik von CP/CPPS ist insbesondere der NIH-CPSI. Patienten wiesen im Median im NIH-CPSI eine Gesamtpunktzahl von 24 Punkten auf. Der Median

in der Schmerzkategorie lag bei 12 Punkten, in der Kategorie der Miktionsbeschwerden bei 3 Punkten und in der Einschränkung auf die Lebensqualität bei 9 Punkten. Dies entspricht in etwa den Ergebnissen einer internationalen Metaanalyse mit 1563 CP/CPPS-Patienten. Hier wiesen Patienten im Median eine Gesamtpunktzahl von 21 Punkten im NIH-CPSI auf. Im Median wiesen sie in der Schmerzkategorie 9 Punkte, in der Miktionskategorie 4 Punkte und in der Einschränkung der Lebensqualität 7 Punkte auf. Die Angaben der deutschen Subkohorte aus dieser Studie decken sich vollständig mit den Angaben in unserer Studie (Wagenlehner et al. 2013b). Es ist dementsprechend davon auszugehen, dass unsere Studienpopulation gut die Symptomatik von CP/CPPS im Allgemeinen repräsentiert, insbesondere die der Patienten in Deutschland.

Im dritten Teil der Studie selektionierten wir nochmals eine Gruppe von CP/CPPS-Patienten der Kategorie IIIb, die höchste Schmerzen im CPSI-Score aufwiesen. Untersucht wurden 104 gesunde Kontrollpersonen und 46 Patienten. Auch hier zeigten sich wie in der Gesamtkohorte deutliche Unterschiede zwischen Altersmedian der Patienten (39,67 Jahre) und den gesunden Kontrollpersonen (28,39 Jahre). Verzerrungen der Ergebnisse hierdurch können dementsprechend nicht sicher ausgeschlossen werden. Im Vergleich mit anderen Studien zu neuroinflammatorischen Mediatoren, ist dies die erste Studie, die gezielt den Faktor Schmerz untersucht. In vergleichenden Studien wurde bereits der Schmerz und die Korrelation mit entsprechenden Mediatoren untersucht und nachgewiesen (Khadra et al. 2006; Miller et al. 2002; Desireddi et al. 2008). Die Selektion einer CP/CPPS-Kohorte mit stärksten Schmerzen wurde bisher jedoch noch nicht vorgenommen.

5.2 Veränderungen im Spermogramm bei CP/CPPS-Patienten

Zunächst analysierten wir Veränderungen von CP/CPPS-Patienten im Spermogramm. Hierzu existieren bereits einige Studien. Unsere Ergebnisse decken sich mit einem großen Teil der bisherigen Publikationen. In einigen Punkten fanden sich in unserer Studie jedoch abweichende Ergebnisse.

Die Analyse der Gesamtkohorten zeigte wie die vergleichenden Studien ein erniedrigtes Ejakulatvolumen in CP/CPPS (Condorelli et al. 2017). Im Gegensatz zu dieser Studie fand sich der Unterschied in unserer Studie hochsignifikant. Dies ist am ehesten auf die große Fallzahl zurückzuführen. Interessanterweise fanden wir in den Kohorten nach Matching gegenüber dem Alter keinerlei Unterschiede mehr zwischen Patienten und Gesunden. Eine Konfundierung der Ergebnisse durch den Altersunterschied der Kohorten wäre somit denkbar. Verringerte Ejakulatvolumina bereits im mittleren Lebensalter sind in zahlreichen Studien vorbeschrieben (Homonnai et al. 1982; Kidd et

al. 2001). In der Korrelationsanalyse von Alter und Ejakulatvolumen fand sich sowohl in CP/CPPS wie auch in der Gesamtkohorte eine signifikant-negative Korrelation zwischen den beiden Parametern. Unsere Ergebnisse widersprechen zudem einer Metanalyse an CP/CPPS-Patienten, die erhöhte Ejakulatvolumina in CP/CPPS beschreiben (Fu et al. 2014). Weitere Studien an nach dem Alter gemachten Kohorten scheinen somit sinnvoll.

Sowohl in den Gesamtkohorten als auch in den Kohorten nach Altersmatching fanden sich signifikant niedrigere pH-Werte im Ejakulat der Patienten. In bisherigen Studien zur Fertilität bei CP/CPPS wurde der pH-Wert größtenteils nicht ermittelt. Die Ergebnisse deckten sich jedoch mit vorherigen Studien zu diesem Thema aus unserer Arbeitsgruppe (Berg et al. 2021). Zu den Ursachen ist bisher nichts bekannt. Gegensätzlicher Weise kommt es im Zuge von bakteriellen Infektionen üblicherweise zu einer Erhöhung des pH-Werts im Ejakulat (Fair und Cordonnier 1978). Dies bestärkt die Hypothese, dass es sich bei CP/CPPS um eine nicht-infektiöse Genese handelt. Darüber hinaus konnten wir bei Patienten eine positive Korrelation von Alter und pH-Wert feststellen. In der Gesamtkohorte sowie bei der gesunden Kontrollgruppe fand sich diese Korrelation nicht signifikant. Bisherige Studien zu diesem Thema konnten bei gesunden Männern ebenfalls keine Veränderungen des Ejakulat-pH-Werts im Alter feststellen (Guo et al. 2022). Inwieweit der pH-Wert eine Rolle im Krankheitsverlauf von CP/CPPS spielt und ob eine Erhöhung im Alter zu einem spontanen Abklingen der Erkrankung beiträgt, sollte in weiteren Studien untersucht werden.

Spermiengesamtzahl und -dichte fanden sich sowohl in der Gesamtgruppe als auch Altersgematcheten Gruppe in CP/CPPS-Patienten unverändert vor. In Bezug auf die Spermiengesamtzahl deckt sich dies mit vorherigen Studien zur Fertilität bei CP/CPPS. Die Spermiendichte fand sich demgegenüber in vorherigen Metanalysen im Rahmen von CP/CPPS vermindert (Fu et al. 2014). Diese Ergebnisse decken sich mit den Resultaten der selektioniert NIH-IIIb-Schmerzkohorte unserer Studie. Auch hier fanden sich signifikant niedrigere Spermiengesamtzahlen in der CP/CPPS-Kohorte. Ob die Schmerzsymptomatik selbst mit der Spermiengesamtzahl interagiert und somit die Fertilität beeinflusst, ist fraglich und könnte in weiteren Studien abgeklärt werden. In der Korrelationsanalyse mit dem Alter fanden wir für die Spermiengesamtzahl eine signifikante negative Korrelation, während für die Spermienkonzentration keine Korrelation mit dem Alter bestand. Eine weitere Analyse der Spermiengesamtzahl unter Ausschluss des Faktor Alter in größeren Studien zu CP/CPPS erscheint somit sinnvoll.

Die Analyse der Spermienmotilität und -defekte nach WHO erfolgte für die Patientenkohorte und die gesunde Kontrollgruppe jeweils durch zwei unterschiedliche

Technische Assistentinnen. Wir entschieden uns deshalb, die vorgefundenen Gruppenunterschiede, wie in den Ergebnissen dargestellt, nicht auszuwerten. Zwar wurden die Spermioogramme jeweils nach Kriterien der WHO erstellt, dennoch wollten wir so die Gefahr einer subjektiven Verzerrung der Ergebnisse verhindern. Im Zuge der weiteren Diskussion wurden darum lediglich Korrelationen innerhalb der Patienten- oder Kontrollgruppe durchgeführt, nicht aber in der Gesamtkohorte.

Um die Funktion der sekretorischen Drüsen zu ermitteln, bestimmten wir im Spermioogramm die Konzentrationen von Zink, Fruktose und α -Glucosidase. Zink repräsentiert die sekretorische Funktion der Prostata (Kavanagh et al. 1983), Fruktose die der Samenblase (Ludwig et al. 1998) und α -Glucosidase die der Nebenhoden (Mahmoud et al. 1998). Bei der Untersuchung der biochemischen Marker fielen im Zuge unserer Studie deutliche Unterschiede zwischen CP/CPPS-Patienten und der gesunden Kontrollgruppe auf. Alle drei Marker fanden sich in der CP/CPPS-Kohorte signifikant erniedrigt. Dies steht teilweise im Kontrast zu bisherigen Studien. Zink fand sich bei CP/CPPS-Patienten in vergleichenden Metaanalysen ebenfalls erniedrigt (Condorelli et al. 2017). In Bezug auf Fruktose und α -Glucosidase ergaben sich in bisherigen Studien keine Unterschiede (Berg et al. 2021).

Zuletzt bestimmten wir im Zuge des Spermioogramms verschiedene Marker der Inflammation. Standardisiert erfasst wurden in diesem Rahmen die Zahl der Peroxidase-positiven-Zellen (PPZ) und Leukozyten, sowie die Entzündungsmediatoren Interleukin-8 und Elastase. In unserer Studie fanden sich bei CP/CPPS in der Gesamtkohorte, sowie in der Kohorte nach Matching gegenüber dem Alter signifikant höhere Konzentrationen von PPZ, Leukozyten und Interleukin-8. In Bezug auf Elastase zeigten sich demgegenüber keine Unterschiede für CP/CPPS-Patienten. Die Gesamtkohorte enthielt von 267 Patienten 44 vom Typ IIIa, während sich in der Kohorte nach Matching gegenüber dem Alter von 90 Patienten 13 vom Typ IIIa befanden. Dass Entzündungen im Urogenitaltrakt die Fertilität beeinträchtigen können, wurde bereits ausgiebig untersucht (Bachir und Jarvi 2014). Wie eingangs dargestellt, kommt es auch im Rahmen von CP/CPPS zu Einschränkungen der Fertilität (Fu et al. 2014). Ob etwaige entzündliche Vorgänge hierbei in CP/CPPS von Bedeutung sind, wurde bisher nur teilweise untersucht. Wir konnten nun in unserer Studie einige negative Auswirkungen ermitteln. Diese werden im Folgenden dargestellt.

In der Subkohorte der selektierten Schmerzpatienten fanden sich im Gegensatz dazu keine Unterschiede der Entzündungsparameter zwischen Gesunden und Patienten. Dies ist am ehesten auf den Ausschluss der Patienten vom Typ IIIa zurückzuführen. Der

Faktor Schmerz konnte in diesem Teil unserer Studie hierdurch möglichst unabhängig von einer konfundierenden Entzündungsreaktion molekularbiologisch untersucht werden. In bisherigen Studien erfolgte kein Ausschluss dieser konfundierenden Variable.

5.3 Calcitonin gene-related peptide (CALCA)

5.3.1 Promotormethylierung und Genexpression von CALCA in CP/CPPS

In Leukozyten aus ExUr fanden wir in der CP/CPPS-Kohorte eine erniedrigte Promotormethylierung von CALCA an Position 4 der analysierten CpG-Region. In CP/CPPS zeigte sich die Genexpression von CALCA in Leukozyten dementsprechend hochreguliert. Hier bestand eine negative Korrelation zwischen den Promotormethylierungen an Position 2 und 4 mit der folgenden Genexpression. Eine epigenetische Fehlregulation von CALCA wurde bereits im Kontext der Migräne untersucht. Die Autoren mutmaßen, dass epigenetische Fehlregulation von CALCA maßgeblich an der Entstehung der Schmerzsymptomatik bei Migränepatienten beteiligt sind (Fila et al. 2022). Ähnliche Prozesse wären auch bei CP/CPPS denkbar. Aufgrund der kleinen Fallzahl unserer Studie bleiben größere Untersuchungen abzuwarten.

In Epithelzellen aus ExUr zeigte sich demgegenüber kein signifikanter Unterschied in der Genexpression von CALCA in Patienten. Im direkten Vergleich wiesen Leukozyten aus ExUr höhere Genexpressionen von CALCA auf als Epithelzellen. Dies deckt sich mit bisherigen Daten zu Genexpressionsanalysen von CALCA. Neurone des zentralen und peripheren Nervensystems bilden zwar den überwiegenden Teil der CGRP produzierenden Zellen (Russell et al. 2014; Fila et al. 2022). Dennoch wurde eine relevante Expression von CALCA bereits in mehreren Studien in einer Vielzahl von Immunzellen wie Monozyten, Makrophagen und B-Lymphozyten nachgewiesen (Bracci-Laudiero et al. 2002; Linscheid et al. 2004; Wang et al. 2002). Für relevante Genexpressionen von CALCA in Epithelzellen liegen zum Zeitpunkt der Studie keine Daten vor. Es bleibt jedoch hervorzuheben, dass in ExUr die Genexpressionen von CALCA in Epithelzellen und Leukozyten untereinander stark korrelierten. Dies könnte durch verschiedene Ansätze erklärt werden. Zum einen ist es denkbar, dass Epithelzellen im Rahmen von CP/CPPS ebenfalls vermehrt CALCA exprimieren. Die Expression wäre in diesem Fall zwar deutlich geringer als bei den Leukozyten, eine Korrelation wäre jedoch denkbar. Weitere Abklärungen dieser Frage in zukünftigen Studien wären in jedem Falle notwendig. Ein weiterer Ansatz wäre eine unzureichende Trennung von Epithelzellen und Leukozyten im Rahmen des Cell-Sorting-Systems. Hierdurch könnten einige Leukozyten in das Zellpellet der Epithelzellen gelangt sein. Verfälschte Korrelationen zwischen den Genexpressionen der beiden Pellets wären

somit denkbar. Diese Verzerrung versuchten wir durch die Bestimmung zellspezifischer Oberflächenmarker vor Beginn der Experimente zu minimieren.

Zur Prüfung der Korrelation zwischen Leukozyten und Epithelzellen aus ExUr untersuchten wir zusätzlich die Genexpression von *CALCA* in Leukozyten aus Ejakulat. Hier zeigte sich im Gegensatz zu Leukozyten aus ExUr kein signifikanter Unterschied zwischen Patienten und Gesunden. Ein möglicher Erklärungsansatz hierfür wäre, dass die Dysregulation von *CALCA* auf einer Ebene des Urogenitaltrakts abläuft, die nur Leukozyten aus ExUr, nicht aber aus Ejakulat erfasst. Interessanterweise zeigte sich jedoch eine positive Korrelation der Genexpressionen von *CALCA* in Epithelzellen aus ExUr und Leukozyten aus Ejakulat. Veränderte Genexpressionen der beiden Zelltypen im Rahmen von CP/CPSS wären entsprechend denkbar. Da sich die Korrelationen zwischen den beiden Zelltypen nun auch in verschiedenen Probematerialien fanden, ist eine Verfälschung durch unzureichende Trennung während des Cell-Sortings unwahrscheinlich. Leider stand zur Untersuchung der Genexpression von *CALCA* in Epithelzellen aus Ejakulat nach vorherigen Experimenten nicht mehr genug Material zur Verfügung. Weitere Untersuchungen waren dementsprechend nicht mehr möglich, wären in Zukunft allerdings vielversprechend.

5.3.2 *CALCA* als Schlüsselspieler in der Schmerzentstehung von CP/CPSS?

Trotz der geringen Fallzahl konnten wir eine signifikante Korrelation zwischen der Symptomatik der Patienten und der Regulation von *CALCA* auf DNA- und mRNA-Ebene in Leukozyten aus ExUr nachweisen. Die Promotormethylierung korrelierte an zwei Positionen negativ mit den Punktwerten des NIH-CPSI in den Bereichen Schmerz und Lebensqualität. Auf Genexpressionsebene fanden sich hier in Leukozyten noch stärkere Korrelationen. Auch für die Gesamtpunktzahlen im NIH-CPSI und IPSS konnten wir positive Korrelationen mit der Genexpression in Leukozyten nachweisen. Selbst bei isolierter Betrachtung der CP/CPSS-Patienten fand sich hier eine stark-positive Korrelation mit dem Schmerzscore im NIH-CPSI. Interessanterweise korrelierte auch die Genexpression von *CALCA* in Epithelzellen mit der Schmerzsymptomatik positiv.

Korrelationen von CGRP mit dem Faktor Schmerz wurden insbesondere im Kontext der Migräne ausgiebig untersucht. Ein systematischer Review zeigte, dass hier in 13 von 20 separaten Studien eine signifikante Korrelation von CGRP mit dem ermittelten Schmerz der Patienten bestand (Schou et al. 2017). Die Ergebnisse unserer Studie decken sich dementsprechend mit bisherigen Daten. Es bleibt zu erwähnen, dass wir im Zuge unserer Studie nur die Regulationen von *CALCA* auf DNA und mRNA-Ebene untersuchten. Zur Entstehung von Schmerzen kommt es jedoch bekanntermaßen erst

über die proteinvermittelte Wirkung an den entsprechenden Rezeptoren. Über etwaige Veränderungen auch auf Proteinebene kann im Kontext von CP/CPPS nur gemutmaßt werden. Ob auch hier Veränderungen vorliegen, muss erst noch gezeigt werden.

5.3.3 CALCA und der pH-Wert

Auch mit dem pH-Wert im Ejakulat zeigten sich signifikante Korrelationen auf Ebene der Promotormethylierung und Genexpression von *CALCA*. In Leukozyten bestand eine positive Korrelation mit der Promotormethylierung, während wir auf Genexpressionsebene eine negative Korrelation zeigen konnten. Selbst bei isolierter Betrachtung der CP/CPPS-Patienten fanden sich diese Korrelation trotz der geringen Fallzahl noch signifikant. In Studien konnte bereits gezeigt werden, dass es im Zuge einer Erniedrigung des pH-Werts zu einer Freisetzung von CGRP aus sensorischen Nervenfasern kommt (Geppetti et al. 1991). Ob dieser Mechanismus auch auf Ebene der Prostata im Zuge des erniedrigten pH-Werts bei CP/CPPS auftritt, ist fraglich. Aufgrund der Korrelation zwischen pH-Wert und Genexpression wäre dies jedoch durchaus denkbar. Die Hypothese dieses pathophysiologischen Ansatzes könnte in weiteren Studien an Prostatagewebe in EAP abgeklärt werden.

5.3.4 CALCA im Kontext der chronischen Inflammation bei CP/CPPS

Zusätzlich fanden sich Korrelationen von *CALCA* auf DNA und mRNA-Ebene mit unterschiedlichen Markern der Entzündung im Spermogramm. Die Methylierung des Promotors wies eine negative Korrelation mit der Anzahl von Leukozyten im Ejakulat auf. Eine epigenetische Beeinflussung der CpG-Region von *CALCA* durch chronisch-inflammatorische Prozesse wäre denkbar. Die Genexpression von *CALCA* ist ohnehin stark von Methylierungen an der zugrunde liegenden Promotorregion abhängig (Fila et al. 2022). Es existieren bereits zahlreiche Studien, die sich mit Veränderung der DNA-Methylierung bei chronisch-entzündlichen Erkrankungen insbesondere autoimmuner Genese beschäftigen. Häufig kommt es in diesem Zuge zu signifikanten Veränderungen in der Promotorregion spezifischer Gene (Surace und Hedrich 2019). Bei fehlender Studienlage bezüglich der Beeinflussung der Promotorregion von *CALCA* durch chronische Entzündung ist eine Interpretation der Daten schwierig. Ähnliche Prozesse wären auch in CP/CPPS denkbar. Weitere epigenetische Analysen könnten in Zukunft hilfreich sein. Eine andere Erklärung für die Korrelation der Promotormethylierung von *CALCA* mit der Anzahl von Leukozyten wäre, dass der Promotor von *CALCA* in Leukozyten weniger methyliert ist als in Epithelzellen. Da zum Ende unserer Versuche jedoch nicht mehr genug Material zur Analyse der CpG-Region von *CALCA* in Epithelzellen verfügbar war, lässt sich hierüber nur mutmaßen. In der Literatur existieren hierzu bisher keine Daten. Zukünftige Experimente könnten hier Klarheit schaffen.

Auf Genexpressionsebene in Leukozyten fand sich des Weiteren in der CP/CPPS-Kohorte eine negative Korrelation von *CALCA* mit Spiegeln von Interleukin-8 im Ejakulat. In bisherigen Studien zeigten sich kontroverse Resultate bezüglich der Interaktion dieser beiden Faktoren in verschiedenen Geweben (Li und Wang 2006; Tran et al. 2000). Ob Interaktionen auf urogenitaler Ebene bestehen, bleibt in weiteren Studien abzuwarten.

5.3.5 *CALCA* als Mediator der Subfertilität bei CP/CPPS?

Festzuhalten ist jedoch, dass CGRP bereits in der menschlichen Prostata nachgewiesen wurde (Abrahamsson et al. 2000) und in der Pathogenese des Prostatacarcinoms eine entscheidende Rolle zu spielen scheint (Warrington et al. 2017). In männlichen Schafen konnte immunhistochemisch eine starke Innervation der Prostata und Samenbläschen mit Substanz P und CGRP positiven Nervenfasern nachgewiesen werden (Arciszewski 2004). Diese scheint auch im Menschen von Bedeutung zu sein (Jen und Dixon 1995). Darüber hinaus existieren weitere Studien, die einen physiologischen Einfluss von CGRP auf die Spermienfunktion nahelegen. Eine vermehrte Genexpression von CGRP-Rezeptorbestandteilen wurde im menschlichen Hoden bereits nachgewiesen (Balkan et al. 1999). Auch im Zuge unserer Studie untersuchten wir etwaige Korrelationen zwischen *CALCA* und der Fertilität. In der gesunden Kontrollgruppe korrelierte die Genexpression von *CALCA* in Leukozyten positiv mit dem Anteil normal konfigurierter Spermien. Demgegenüber zeigte sich hier eine negative Korrelation mit dem Anteil von Spermienkopfdefekten. Auch mit dem Alter zeigte sich in der gesunden Kontrollgruppe eine negative Korrelation. Es wäre also denkbar, dass *CALCA* physiologische Funktionen im Rahmen der Fertilität übernimmt. Weitere Studien, die einen solchen Effekt tatsächlich belegen, stehen zum gegenwärtigen Zeitpunkt noch aus.

Gegensätzliche Ergebnisse in Bezug auf die Fertilität bestanden in der CP/CPPS-Kohorte. Auch hier konnten wir eine Korrelation zwischen der Promotormethylierung von *CALCA* und der Spermienqualität nachweisen. Sowohl die Anzahl immotiler Spermien als auch der Anteil von Spermien mit Flaggelumdefekten korrelierten negativ mit der Promotormethylierung. Dies ist die erste Studie zu CGRP im Rahmen von CP/CPPS, weshalb keine Einordnung in bisherige Erkenntnisse möglich ist. Ob tatsächlich ein Zusammenhang zwischen den epigenetischen Veränderungen von *CALCA* mit der Fertilität besteht, muss erst noch weiter untersucht werden. In einem Experiment an Ratten wurde bereits der Effekt einer intraventrikulären cerebralen Installation von CGRP auf die Fertilität untersucht. Die betroffenen Ratten wiesen im Anschluss eine signifikant erniedrigte Spermienzahl und -motilität auf (Rahimi et al. 2023). Ähnlich negative Effekte auf die Fertilität durch CGRP wären auch im Kontext von CP/CPPS denkbar und passen zu unseren Daten. Ein Schwachpunkt unserer Arbeit ist jedoch der

bereits thematisierte Altersunterschied zwischen den Kohorten. Ein konfundierender Einfluss des Alters auf die Regulation von *CALCA* wäre dementsprechend denkbar. Weitere Arbeiten zu diesem Thema scheinen dennoch vielversprechend.

5.4 Die Achse aus S100A12 und RAGE

5.4.1 S100A12-Proteinkonzentrationen in Blutserum und Seminalplasma

In CP/CPPS-Patienten fanden wir die Proteinkonzentration von S100A12 sowohl in Blutserum als auch Seminalplasma signifikant erhöht. Die Unterschiede zwischen Patienten und Gesunden fielen im Fall von S100A12 im Vergleich zu anderen von uns untersuchten Proteinen mit Abstand am stärksten aus. Dies ist die erste Studie bezüglich der Proteinkonzentration von S100A12 in CP/CPPS. Eine Einordnung in vergleichende Arbeiten ist demnach nicht möglich. Eine Beteiligung von S100A12 in zahlreichen weiteren Erkrankungen wurde bereits nachgewiesen. Insbesondere als systemischer Biomarker entzündlicher Prozesse scheint S100A12 geeignet (Meijer et al. 2012). Beispielsweise sind hier das Kawasaki-Syndrom (Wittkowski et al. 2007), das Familiäre Mittelmeerfieber (Kallinich et al. 2010) und chronisch-entzündliche Darmerkrankungen (Foell et al. 2003b), sowie die Rheumatoide Arthritis und Psoriasis Arthritis (Foell et al. 2003a) zu nennen. Auch im Rahmen von Arteriosklerose konnten erhöhte Spiegel von S100A12 im Blut nachgewiesen werden (Oesterle und Bowman 2015). Zu S100A12-Konzentrationen im Seminalplasma existiert zum jetzigen Zeitpunkt lediglich eine Studie. Hier zeigte sich S100A12 im Seminalplasma von infertilen Patienten mit Varikozelen gegenüber der gesunden Kontrollgruppe signifikant erhöht (Bagheri et al. 2016).

Im Rahmen unserer Studie ähnelten sich in der CP/CPPS-Kohorte die Mediane der Seminalplasma- und Blutserum-Konzentration von S100A12 stark (Seminalplasma 53,66 ng/ml vs. Blutserum 49,41 ng/ml). Demgegenüber fanden sich in der gesunden Kontrollgruppe im Median im Blutserum deutlich höhere S100A12-Konzentrationen verglichen mit dem Seminalplasma (Seminalplasma 2,29 ng/ml vs. Blutserum 16,79 ng/ml). Eine denkbare Erklärung für diesen Unterschied wäre, dass S100A12 physiologisch auf Ebene der Prostata in geringeren Konzentrationen als im Blut vorkommt. Im Zuge von CP/CPPS käme es zu einer vermehrten Freisetzung von S100A12 in der Prostata und von dort aus ins Blut. Die Spiegel von S100A12 im Blut könnten sich aufgrund längerfristiger Freisetzung in CP/CPPS den Spiegeln im Seminalplasma anpassen. Weitere Studien hierzu wären in Zukunft notwendig.

5.4.2 Genexpression von S100A12 in Fluid Biopsies

Um die Genese der erhöhten Proteinkonzentrationen von S100A12 in CP/CPPS weiter zu untersuchen, bestimmten wir zusätzlich die Genexpressionen von S100A12 in

Leukozyten aus ExUr und Ejakulat. In beiden Fällen konnten wir keinen Unterschied zwischen der CP/CPPS-Kohorte und der gesunden Kontrollgruppe feststellen. Dies steht im Widerspruch zu der einzigen bisherigen Studie bezüglich S100A12 bei CP/CPPS (Shoskes et al. 2021). Hier fand sich im Zellpellet aus Mittelstrahlurin eine signifikant höhere Genexpression von S100A12 in Patienten gegenüber den gesunden Kontrollen. Es ist zu erwähnen, dass die Experimente erstens an anderem Material (Ejakulat und ExUr vs. Mittelstrahlurin) und zweitens an unterschiedlichen Zellen (Leukozyten vs. gesamtes Zellpellet) durchgeführt wurden. Ein Vergleich der beiden Studien ist dementsprechend nicht vollständig möglich. Neutrophile Granulozyten stellen neben Monozyten jedoch die wesentlichen S100A12-produzierenden Zellen dar (Meijer et al. 2012). Es wäre demnach davon auszugehen, dass bei erhöhten Proteinspiegeln im Seminalplasma, auch die Genexpression von Leukozyten aus dem männlichen Urogenitaltrakt erhöht ist. Weshalb sich in unserer Studie keine Unterschiede bei CP/CPPS zeigten, ist schwierig zu sagen. Technische Fehler bei der Aufarbeitung des Probenmaterials wären denkbar. Abgesehen davon könnte es sich bei den S100A12-produzierenden Zellen auch um gewebeständige Zellen handeln. Diese wären folglich nicht im Ejakulat oder ExUr repräsentiert. Gewebeproben von CP/CPPS-Patienten wären bei dieser Fragestellung sicherlich hilfreich. Weitere Studien auch im EAP-Tiermodell könnten hierbei in Zukunft weiterhelfen.

5.4.3 S100A12 als Schlüsselspieler der Symptomentstehung von CP/CPPS?

Die Proteinkonzentrationen von S100A12 korrelierten mit Teilen der klinischen Fragebögen. S100A12 Konzentrationen im Seminalplasma korrelierten positiv mit den Gesamtpunktzahlen im IPSS und NIH-CPSI sowie dessen Kategorien I, II und III. Die Blutserumkonzentrationen korrelierten mit der Gesamtpunktzahl im NIH-CPSI, sowie den Kategorien I und III. Bereits im Zuge anderer Erkrankungen wurde der Einfluss von S100A12 auf die Symptomatik betroffener Patienten untersucht. In einer Studie an Patienten mit Rheumatoider Arthritis und Psoriasis Arthritis konnte ebenfalls eine Korrelation zwischen den Blutserumspiegeln von S100A12 und den Punktzahlen im Schmerzscore hergestellt werden (Foell et al. 2003a). Eine Beteiligung von S100A12 an der Entstehung und Aufrechterhaltung chronischer Schmerzen auch in CP/CPPS wäre entsprechend denkbar. Wie genau es im Zuge einer S100A12-Erhöhung zur Entstehung von Schmerzen kommt, ist zum jetzigen Zeitpunkt nicht erforscht. Weitere Studien könnten hier tiefere Einblicke in die Vorgänge bei der Schmerzentstehung liefern.

5.4.4 S100A12 und der pH-Wert im Ejakulat

Darüber hinaus konnten wir in der Gesamtkohorte eine negative Korrelation des pH-Werts im Ejakulat mit der Konzentration von S100A12 im Blutserum nachweisen.

Während sich diese Korrelation auch bei isolierter Betrachtung der gesunden Kontrollgruppe zeigte, fand sich in der Patientenkohorte keine signifikante Korrelation. Über die Freisetzung von S100A12 im Zuge azidotischer Zustände existieren zum Zeitpunkt der Studie keine weiteren Arbeiten. Es ist jedoch bekannt, dass es im Rahmen einer Azidose zur Aktivierung von Neutrophilen Granulozyten kommt. In der Folge kommt es zum Einstrom von Calcium und zur Freisetzung inflammatorischer Proteine (Martínez et al. 2006). S100A12 stellt gemeinsam mit S100A8 und S100A9 knapp 50 % des zytosolischen Proteinanteils in Neutrophilen Granulozyten dar (Tardif et al. 2015). Eine vermehrte Freisetzung von S100A12 ins Blut als Reaktion auf die erniedrigten pH-Werte auf Ebene der Prostata im Rahmen von CP/CPPS wäre dementsprechend denkbar. Im Gegensatz dazu konnten wir im Seminalplasma keine Korrelationen von S100A12 mit dem pH-Wert feststellen. Denkbar wäre, dass im Urogenitaltrakt andere lokale Prozesse erheblichen Einfluss auf die Freisetzung von S100A12 nehmen. Entsprechend könnte man hier keine Korrelation der mehr mit dem pH-Wert nachweisen.

5.4.5 Zusammenspiel von Zink und Calcium mit S100A12

Neben dem pH-Wert bestimmten wir im Seminalplasma die Konzentrationen von Zink und Calcium. Wie bereits eingangs beschrieben, fanden wir höhere Konzentrationen von Zink in der Kontrollgruppe. Demgegenüber zeigte sich in Bezug auf Calcium kein signifikanter Unterschied. Jedoch fand sich zwischen den beiden Ionen eine stark positive Korrelation. Im Vergleich mit der Gesamtkohorte fand sich die Korrelation in CP/CPPS noch einmal verstärkt. Die Ergebnisse decken sich mit bisherigen Arbeiten. Auch hier fanden sich starke Korrelationen der Ionen im Ejakulat (Wong et al. 2001).

Wie genau die beiden Ionen im männlichen Reproduktionstrakt zusammenhängen, ist in der Literatur nicht bekannt. Ein Erklärungsansatz hierzu bietet sich im Zuge unserer Studie mit S100A12 an. Aus der Literatur ist bekannt, dass S100A12 und andere S100-Proteine die Fähigkeit besitzen in großen Mengen Zink und Calcium zu binden. Durch die Sequestrierung der Ionen kommt S100A12 eine antibiotische Funktion zu, da die gebundenen Ionen Erregern nicht mehr zur Verfügung stehen (Cunden et al. 2016). Im Zuge der Bindung kommt es zu einer Oligomerisierung von S100A12-Proteinen und zu einer Änderung ihrer Konformation. Hierdurch verstärkt sich die Bindungsaffinität von S100A12 am zugehörigen Rezeptor, RAGE, erheblich und es kommt zu einer Initiierung proinflammatorischer Signalkaskaden (Xie et al. 2007). Weitere Studien legen nahe, dass die Konzentrationen von Zink und Calcium die extrazelluläre Funktion sowie die intrazelluläre Speicherung von S100A12 wesentlich zu beeinflussen scheinen (Moroz et al. 2009). Ebenfalls von Bedeutung ist in diesem Kontext scheinbar auch der pH-Wert. In bisherigen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass es im Zuge einer Erniedrigung des

5. Diskussion

pH-Werts zu einer reduzierten Affinität von S100A12 gegenüber Zink kommt. Dieser Effekt konnte durch die Gegenwart von Calcium aufgehoben werden (Wang et al. 2020). Inwieweit diese Prozesse auch bei den erniedrigten pH-Werten im Ejakulat von CP/CPPS eine Rolle spielen, muss in weiteren Studien abgeklärt werden.

In unserer Studie fand sich in der Gesamtkohorte aus Patienten und Gesunden lediglich eine negative Korrelation zwischen der Zinkkonzentration und dem pH-Wert im Ejakulat. In diesem Kontext zeigten die Calciumkonzentrationen keine signifikante Korrelation mit dem pH-Wert. Bei isolierter Betrachtung der gesunden Kontrollgruppe fand sich das gleiche Ergebnis. Demgegenüber fand sich in der CP/CPPS-Kohorte sowohl für Zink als auch Calcium eine signifikante Korrelation mit dem pH-Wert. Ein pathophysiologischer Einfluss der oben beschriebenen Prozesse wäre demnach auch in CP/CPPS denkbar. Auch in der Korrelationsanalyse mit S100A12 fanden sich starke Unterschiede zwischen Patienten und Gesunden. Während sich für S100A12 im Seminalplasma in der Gesamtkohorte keine Korrelationen mit den Ionen zeigten, so fand sich bei isolierter Betrachtung der CP/CPPS-Kohorte eine negative Korrelation mit Calcium. Demgegenüber fand sich in der gesunden Kontrollgruppe zwischen S100A12 im Seminalplasma und der Zinkkonzentration eine positive Korrelation. Im Blutserum zeigte sich lediglich eine positive Korrelation zwischen S100A12 und der Zinkkonzentration im Ejakulat. Diese Ergebnisse legen eine Dysregulation des Systems aus S100A12 und den beiden Ionen in CP/CPPS nahe. Welche Bedeutung dies in der Pathophysiologie von CP/CPPS spielt, muss jedoch erst in weiteren Studien gezeigt werden.

Die Zinkkonzentration im Seminalplasma war positiv mit dem Ejakulatvolumen, der Gesamtzahl von Spermien und der Spermiedichte assoziiert. Ein positiver Einfluss von Zink auf Marker der Fertilität ist bereits aus zahlreichen Studien bekannt (Zhao et al. 2016).

Die Konzentration von Calcium zeigte demgegenüber keine Korrelationen mit Markern der Fertilität. Im Gegensatz zu Zink fanden sich für Calcium jedoch stark-negative Korrelationen mit Markern der Inflammation in Urin und Ejakulat. Hier fanden sich in der Patientenkohorte sowohl die Anzahl von Leukozyten in Anfangsurin, ExUr und Ejakulat sowie PPZ im Ejakulat negativ mit Calcium korreliert. Für die gesunde Kontrollgruppe zeigten sich hier keine Korrelationen. Eine Senkung des extrazellulären Calciums in CP/CPPS im Zuge der Anwesenheit von neutrophilen Granulozyten und weiteren Leukozyten wäre denkbar. Hierzu existieren zum Zeitpunkt der Studie jedoch keine weiteren Arbeiten. Dies könnte in zukünftigen Arbeiten weitergehend untersucht werden.

5.4.6 S100A12 als Mediator der urogenitalen Inflammation

Starke positive Korrelationen mit Markern der Inflammation in Spermiogramm und Urin fanden sich stattdessen mit der Konzentration von S100A12 im Seminalplasma. S100A12 korrelierte positiv mit der Anzahl von Leukozyten in Anfangsurin und ExUr, sowie im Ejakulat. Noch stärkere Korrelationen fanden sich zwischen der Konzentration von S100A12 im Seminalplasma mit den Spiegeln von Elastase und Interleukin-8 sowie der Anzahl PPZ im Ejakulat. Auch in der isolierten Patientenkohorte zeigten sich diese Unterschiede hochsignifikant. Interleukin-8 korrelierte zudem positiv mit den Spiegeln von S100A12 im Blutserum. Die Ergebnisse lassen sich gut in den aktuellen Stand der Forschung einordnen. In zahlreichen Studien wird S100A12 als Marker der Inflammation diskutiert, auch auf systemischer Ebene (Meijer et al. 2012). Wie bereits erwähnt, scheinen vor allem Neutrophile Granulozyten in diesem Kontext für die Produktion und Freisetzung verantwortlich zu sein (Tardif et al. 2015). Dies passt zu den positiven Korrelationen von Leukozyten und PPZ in Urin und Ejakulat im Rahmen unserer Experimente. Wir propagieren in unserer Studie, dass S100A12 im Zuge von CP/CPPS eine pathophysiologisch wichtige Rolle zukommt. Die routinemäßig untersuchten Entzündungsparameter zeigen sich in CP/CPPS zwar teilweise signifikant erhöht, Unterscheidungen von Patienten und Gesunden waren daran allerdings nicht möglich. S100A12 zeigte sich demgegenüber in der Patientenkohorte deutlich erhöht. Zudem fanden sich weitaus stärkere Korrelationen mit der Symptomatik in den klinischen Fragebögen als bei den herkömmlichen inflammatorischen Markern. Wir schlagen deshalb S100A12 als potenziellen Biomarker von CP/CPPS in der Routinediagnostik vor. Limitierender Faktor ist die begrenzte Fallzahl unserer Studie. Größere Studien, um die Trennschärfe zur Abgrenzung von Gesunden zu ermitteln, sind folglich notwendig.

5.4.7 S100A12 als wesentlicher Faktor der Subfertilität bei CP/CPPS?

Neben Korrelationen zu inflammatorischen Markern fanden sich auch Korrelationen von S100A12 im Seminalplasma mit Markern der Fertilität im Spermiogramm. In der isolierten CP/CPPS-Kohorte fanden sich negative Korrelationen mit dem Anteil schnell-progressiver Spermien und der Gesamtzahl progressiver Spermien. Demgegenüber zeigten sich positive Korrelationen mit dem Anteil von immotilen Spermien, sowie dem Anteil von Spermien mit Flaggelumdefekt. Ein Zusammenhang von S100A12-Erhöhungen und der reduzierten Fertilität bei CP/CPPS-Patienten wäre denkbar. Welche Rolle S100A12 im Zuge von reduzierter Fertilität spielt, wurde erst in einer Studie untersucht. Die Datenlage ist dementsprechend schlecht. Untersucht wurde S100A12 bei Patienten mit Varikozele. Einschlusskriterium in die Studie war ein seit mindestens zwei Jahren erfolgloser Versuch eine Schwangerschaft herbeizuführen. In der Studie

zeigten sich in der Patientenkohorte erhöhte Konzentration von S100A12 im Seminalplasma (Bagheri et al. 2016). Die Autoren mutmaßten, dass S100A12 an der Entstehung einer reduzierten Fertilität maßgeblich beteiligt sein könnte. Korrelationen von S100A12 mit Markern der Fertilität wurden in dieser Studie nicht näher untersucht. Unsere Studie ist dementsprechend die erste Studie, die eine Korrelation einzelner Spermienparameter mit S100A12 untersuchte. Hervorzuheben ist in diesem Kontext, dass sich auch in der gesunden Kontrollgruppe negative Korrelationen zwischen der Konzentration von S100A12 im Seminalplasma und Markern der Fertilität zeigten. Hier bestanden negative Korrelationen mit dem Anteil schnell-progressiver Spermien und der Gesamtzahl progressiver Spermien. Es ist demnach denkbar, dass auch in Gesunden eine negative Assoziation von S100A12 und der Fertilität besteht. Eine Untersuchung der Zusammenhänge in zukünftigen Studien scheint vielversprechend.

5.4.8 S100A12 im alternden Mann

Wie bereits erwähnt, zeigten sich sowohl im Seminalplasma als auch im Blutserum stark positive Korrelationen zwischen S100A12 und dem Alter. S100A12 könnte dementsprechend auch unabhängig von seiner Rolle in CP/CPPS physiologisch im Alter ansteigen. Neben S100A12 fanden sich in unserer Studie auch die anderen inflammatorischen Marker in Spermogramm und Urin positiv mit dem Alter korreliert. In der Literatur ist dieser Effekt bereits bekannt und auf Ebene des Urogenitaltrakts wurde dies bereits in zahlreichen Studien nachgewiesen. Hier wird dieser Effekt auch als „Inflammaging“ bezeichnet und als Therapieansatz von altersbedingter Infertilität diskutiert (Frungieri et al. 2018). Welche Rolle S100A12 abgesehen von CP/CPPS im Alterungsprozess der männlichen Reproduktionsorgane spielt, muss erst noch in weiteren Studien untersucht werden. Auch außerhalb des Urogenitaltrakts ist der Alterungsprozess durch eine Zunahme chronisch-inflammatorischer Prozesse auch auf systemischer Ebene charakterisiert. Die zugrundeliegenden inflammatorischen Kaskaden sind zu Teilen bereits in der Literatur vorbeschrieben (Li et al. 2023). Bisher existieren noch keine Daten zu Veränderungen von S100A12 im Alter. Erhöhungen wären im Zuge der inflammatorischen Prozesse jedoch denkbar und könnten im Rahmen weiterer Studien untersucht werden.

5.4.9 Ausschluss des Alters als Konfounder-Variable

Um den bereits erwähnten Altersunterschied zwischen Patienten und Gesunden als Ursache für die erhöhten S100A12-Konzentrationen bei CP/CPPS auszuschließen, führten wir ein Matching gegenüber dem Alter durch. In der statistischen Analyse zeigten sich die Konzentrationen von S100A12 in Seminalplasma und Blutserum in der CP/CPPS-Kohorte weiterhin signifikant erhöht. Die positive Korrelation zwischen Alter

und S100A12-Proteinkonzentration im Seminalplasma fand sich auch nach Matching gegenüber dem Alter nach wie vor signifikant. Bei isolierter Betrachtung der CP/CPPS-Kohorte bestand die signifikante Korrelation des Alters mit S100A12 in Seminalplasma und Blutserum fort. Im Gegensatz dazu fand sich in Gesunden hier keine Korrelation. Dies deutet darauf hin, dass es zumindest im Zuge von CP/CPPS zu einem Anstieg von S100A12 im Alter kommen könnte. Weitere Studien bleiben abzuwarten.

Auch die positiven Korrelationen mit der klinischen Symptomatik in den Fragebögen bestanden nach Matching gegenüber dem Alter fort. Des Weiteren blieben die Korrelationen von S100A12 mit den inflammatorischen Markern im Spermogramm ebenfalls bestehen. Demgegenüber zeigten sich bei den Markern der Fertilität nach Matching gegenüber dem Alter keine signifikanten Korrelationen mehr mit den Proteinkonzentrationen von S100A12 in Blutserum oder Seminalplasma. Dies galt sowohl für die Patienten- als auch für die Kontrollkohorte. Ursächlich hierfür könnte möglicherweise die zu geringe Fallzahl in der Subkohorte sein. Andererseits wäre es auch denkbar, dass das Alter in der Gesamtkohorte als konfundierender Faktor zu einer Scheinkorrelation zwischen S100A12 und der Fertilität führte.

Auch die negativen Korrelationen zwischen S100A12 im Blutserum und dem pH-Wert im Ejakulat blieben nach Matching gegenüber dem Alter bestehen. Sowohl in der Gesamtkohorte aus Patienten und Gesunden als auch bei isolierter Betrachtung der gesunden Kontrollgruppe bestand weiterhin eine signifikante Korrelation.

Hervorzuheben bleibt, dass in der Subkohorte nach Matching gegenüber dem Alter eine positive Korrelation zwischen den Proteinkonzentrationen von S100A12 in Blutserum und Seminalplasma bestand. In der vorherigen Analyse der Gesamtkohorte zeigte sich diese Korrelation nicht signifikant. Aufgrund des Mangels an zur Verfügung stehenden Proben führten wir nur an einem kleinen Teil der Patienten und Gesunden Proteinmessungen von S100A12 sowohl in Blutserum als auch in Seminalplasma durch. Dies führt zu der sehr geringen Fallzahl dieser Korrelationsanalyse. Weitere Studien, die den Zusammenhang der Proteinkonzentrationen von S100A12 in Seminalplasma und Blutserum bei CP/CPPS untersuchen, scheinen vielversprechend.

5.4.10 RAGE-Genexpression in CP/CPPS

Im Anschluss an die Untersuchungen zu S100A12 analysierten wir die Genexpression des zugehörigen Rezeptors *RAGE* in Leukozyten aus ExUr. Hier fand sich in CP/CPPS eine signifikant erhöhte Genexpression. Aus der Literatur ist bekannt, dass *RAGE* neben Endothel und Epithelzellen (Dong et al. 2022) auch von zahlreichen Immunzellen exprimiert wird (Yamamoto et al. 2011; Akirav et al. 2012). Eine Aktivierung von *RAGE*

ist hauptsächlich im Kontext von inflammatorischen Erkrankungen vorbeschrieben (Dong et al. 2022). Da dies die erste Untersuchung von *RAGE* in CP/CPPS ist, fällt eine Einordnung der Ergebnisse in vorherige Daten schwer. Eine verstärkte Genexpression im Zuge der inflammatorischen Prozesse um S100A12 wäre jedoch denkbar. In diesem Kontext konnten wir eine positive Korrelation von S100A12 im Blutserum mit der Genexpression von *RAGE* in Leukozyten aus ExUr zeigen. Aus der Literatur ist bekannt, dass eine Aktivierung des RAGE-Rezeptors im Sinne einer positiven Rückkopplung zu einer vermehrten Genexpression von *RAGE* führt (Dong et al. 2022). Ein ähnlicher Vorgang wäre im Rahmen von CP/CPPS ebenfalls denkbar. Eine Korrelationsanalyse mit der Proteinkonzentration von Seminalplasma war nicht möglich, da nach vorherigen Experimenten nicht ausreichend Probenmaterial vorhanden war. Ob dort ebenfalls Korrelationen bestehen, bleibt in weiteren Studien abzuwarten.

Des Weiteren bestand eine negative Korrelation zwischen der Genexpression von *RAGE* und dem pH-Wert im Ejakulat. Ob ein erniedrigter pH-Wert zu einer vermehrten Expression von *RAGE* führt, ist in der Literatur nicht bekannt. Ob diesbezüglich in CP/CPPS ein Zusammenhang besteht, könnte in weiteren Studien untersucht werden.

Wie auch die Proteinkonzentration von S100A12, so korrelierte auch die Genexpression von *RAGE* mit der Symptomatik in den klinischen Fragebögen. Positive Korrelationen bestanden mit der Gesamtpunktzahl im IPSS und NIH-CPSI sowie dessen Subkategorien Schmerz und Lebensqualität. Hervorzuheben ist in diesem Kontext, dass *RAGE* im Gegensatz zu S100A12 auch in der isolierten CP/CPPS-Kohorte mit dem Schmerzscore im NIH-CPSI korrelierte. S100A12 und *RAGE* bieten potentielle Biomarker, um die Symptomatik von CP/CPPS-Patienten neben klinischen Fragebögen auch laborchemisch zu quantifizieren. Da wir in unserer Studie jedoch nur die Genexpression von *RAGE* untersuchten, lässt sich über etwaige Veränderungen auf Proteinebene lediglich mutmaßen. Weitere Studien wären hier in Zukunft nötig.

5.4.11 *RAGE* als Mediator der Subfertilität bei CP/CPPS?

In Bezug auf die Fertilität zeigten sich in unserer Studie bezüglich der Genexpression von *RAGE* zwischen Patienten und Gesunden gegensätzliche Ergebnisse. Während in der gesunden Kontrollgruppe eine negative Korrelation zwischen *RAGE* und dem Anteil von Spermien mit Kopfdefekten bestand, so fand sich in der CP/CPPS-Kohorte eine signifikante gegenläufige Korrelation. Diese Resultate lassen sich gut in Verbindung mit bisherigen Studien zu diesem Thema bringen. *RAGE* wurde bereits im Kontext einer reduzierten Fertilität bei Diabetes mellitus untersucht. Hier zeigten sich signifikant höhere Proteinkonzentrationen von *RAGE* in Seminalplasma und Spermien von

Diabetikern verglichen mit den gesunden Kontrollen. Interessanterweise fand sich im Kopfteil der Spermien immunhistochemisch deutlich mehr RAGE als in den anderen Spermienregionen. Die Autoren mutmaßen, dass es im Zuge von Diabetes hierdurch zu einer vermehrten DNA-Fragmentierung und somit zu einer reduzierten Fertilität kommt (Mallidis et al. 2007). Eine vermehrte DNA-Fragmentierung in CP/CPPS ist ebenfalls vorbeschrieben (Berg et al. 2021). Ein Zusammenhang mit einer vermehrten Expression von *RAGE* wäre auch in CP/CPPS denkbar. Ob eine erhöhte *RAGE*-Expression ebenfalls zu Zunahme von Spermienkopffekten beiträgt, ist bislang nicht untersucht. Weitere Untersuchungen zu *RAGE* und seinem Einfluss auf die Fertilität scheinen insbesondere in CP/CPPS, aber auch darüber hinaus vielversprechend.

5.4.12 *RAGE* und *CALCA* als Kofaktoren in CP/CPPS?

In der Korrelationsanalyse der Genexpressionen von *CALCA* und *RAGE* in Leukozyten aus ExUr zeigte sich ein erstaunlich hoher Korrelationskoeffizient. Hier ergab sich der Verdacht auf eine Verzerrung durch etwaige Mengenunterschiede der verwendeten cDNA zwischen den einzelnen Proben. Um dies auszuschließen, führten wir eine partielle Korrelationsanalyse unter dem Ausschluss des verwendeten Housekeeper-Gens GAPDH durch. Auch nach partieller Korrelation fand sich die Korrelation der beiden Genexpressionen hoch signifikant. Eine gemeinsame Hochregulation der beiden Gene im Zuge von CP/CPPS wäre dementsprechend denkbar. Hierzu passt, dass in unseren Versuchen die Genexpression von *RAGE* negativ mit der Promotormethylierung von *CALCA* korreliert war. Nach ausführlicher Suche unter Verwendung von KEGG-Pathways konnten wir keine vorbeschriebenen Signalkaskaden finden, in denen die beiden miteinander verbunden sind. Es konnte jedoch bereits in einer Studie gezeigt werden, dass eine verminderte Expression von *RAGE* mit einer verstärkten Methylierung der Promotorregion von *CALCA* einhergeht (Wang et al. 2022). Zwar wurde diese Studie an peridontalen Stammzellen durchgeführt, ähnliche Regulationen wären aber auch in anderen Zelltypen denkbar. Eine verminderte Promotormethylierung mit anschließend gesteigerter Genexpression von *CALCA* bei verstärkter Expression von *RAGE* in CP/CPPS wäre somit vorstellbar. Auch in Studien an Neuronen konnte eine Korrelation der Genexpressionen von *RAGE* und *CALCA* nachgewiesen werden (Mazzone et al. 2021). Es ist also vorstellbar, dass es sich bei der starken Korrelation nicht um eine Verzerrung durch Fehler im Versuchsablauf handelt. Etwaige Zusammenhänge zwischen den beiden Genen könnten in Zukunft durch weitere Studien abgeklärt werden.

5.5 Genexpressionsanalyse von CCL3

Wie bereits dargestellt, sind die bisherigen Gene unserer Studie im Kontext von CP/CPPS kaum oder gar nicht untersucht. Anders verhält es sich mit dem Chemokin

CCL3, welches in mehreren Studien zu CP/CPPS bereits untersucht wurde und als Biomarker diskutiert wird. Wir untersuchten die Genexpression von *CCL3* in Leukozyten aus ExUr. Hier zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen Patienten und Gesunden. Diese Daten stehen im Kontrast zu bisherigen Studien an CP/CPPS-Patienten. Dort zeigten sich erhöhte Spiegel im Prostataexprimat der Patienten (Desireddi et al. 2008) und auch im Tiermodell fanden sich erhöhte Genexpressionen (Quick et al. 2012). Ein möglicher Erklärungsansatz wäre, dass die wesentliche Genexpression von *CCL3* im Rahmen von CP/CPPS nicht von Leukozyten ausgeht. In der Literatur finden sich in diesem Kontext insbesondere Epithelzellen und Fibroblasten, aber auch Monozyten und Makrophagen als *CLL3*-sekretierende Zellen (Schaller et al. 2017). Dass sich demnach kein Unterschied in der Genexpression von Leukozyten aus ExUr findet, wäre denkbar. Leider stand im Anschluss an die vorherigen Experimente nicht mehr genug Material zu Verfügung, um die Genexpression von *CCL3* in Epithelzellen aus ExUr zu untersuchen. Zukünftige Studien könnten hier weiterhelfen.

Wie auch bei den Genexpressionen von *RAGE* und *CALCA* fand sich für *CCL3* eine negative Korrelation mit dem pH-Wert im Ejakulat. Ob durch niedrigere pH-Werte eine vermehrte Genexpression von *CCL3* stattfindet, ist zum Zeitpunkt unserer Studie nicht vorbeschrieben. Eine Induktion unterschiedlicher proinflammatorischer und mit Schmerz-assoziierten Gene durch eine Erniedrigung des pH-Werts wären denkbar. Weitere Genexpressionsanalysen von Epithelzellen der Prostata und Leukozyten unter erniedrigten pH-Werten könnten hier in Zukunft Klarheit schaffen.

Des Weiteren fand sich eine positive Korrelation zwischen *CCL3* und der Anzahl von Leukozyten im Ejakulat. Dies lässt sich in bisherige Studien einordnen, in denen eine rekrutierende Wirkung von *CCL3* auf unterschiedliche Leukozyten gezeigt wurde (Schaller et al. 2017). Auch in CP/CPPS könnte *CCL3* zu einer Rekrutierung von Immunzellen führen und zur Entwicklung der chronischen Symptomatik beitragen.

5.6. Untersuchung der selektionierten Schmerzkohorte

Um den Faktor Schmerz möglichst unverzerrt untersuchen zu können, bildeten wir eine weitere Subkohorte. Diese enthielt lediglich Patienten mit höchsten Schmerzen im NIH-CPSI. Darüber hinaus wurden hier nur Patienten eingeschlossen, die keine Hinweise auf Inflammation zeigten und dementsprechend als NIH IIIb kategorisiert wurden. Wir versuchten hierdurch akut inflammatorische Prozesse als konfundierende Variable weitestgehend auszuschließen, da diese in der Patientenkohorte zu einer veränderten Zellkomposition im ExUr-Zellpellet führen könnten. Ziel war, den Schmerz unabhängig von derartigen Veränderungen zu untersuchen. Mit *TNF α* *Interleukin-1 β* untersuchten

wir dennoch zwei klassisch-inflammatorische Gene, um etwaige Veränderungen auf epigenetischer Ebene zu detektieren, die in der Routinediagnostik nicht erfasst wurden.

Die Analysen zu Promotormethylierung und Genexpression wurden in diesem Abschnitt der Studie an Gesamtzellpellets aus ExUr durchgeführt. Im Gegensatz zu den vorherigen Experimenten erfolgte keine Aufteilung in Leukozyten und Epithelzellen. Dementsprechend wurde die Gesamtheit, der im ExUr enthaltenen Zellen analysiert. Ähnlich wurde bereits auch in anderen Studien zu CP/CPPS vorgefahren (Shoskes et al. 2021). Der Vorteil einer vorherigen Aufteilung in Leukozyten und Epithelzellen beruht auf dem unverzerrten Einblick in die Vorgänge einzelner Zellreihen. Unterschiedliche Zellkompositionen in einzelnen Individuen erzeugen somit eine geringe Verzerrung. Der Nachteil ist jedoch, dass die Aufarbeitung des Materials um ein Vielfaches aufwändiger ist. Zudem sinkt die Menge der im Anschluss zur Verfügung stehenden DNA und RNA deutlich. Entsprechend ist die Zahl der analysierbaren Gene reduziert. Deshalb entschieden wir uns in diesem Teil der Studie für Experimente am gesamten Zellpellet.

5.6.1 Promotormethylierungsanalyse und Genexpressionsanalyse von *TNF α*

Zunächst untersuchten wir die Promotormethylierung sowie die folgende Genexpression von *TNF α* . Die untersuchte CpG-Region zeigte sich in Patienten signifikant weniger stark methyliert als in der Kontrollgruppe. Inwiefern solche epigenetischen Veränderungen mit der Entwicklung von chronischen Schmerzen in Verbindung stehen, wurde bisher kaum erforscht. Eine Studie an Brustkrebspatientinnen konnte eine Assoziation zwischen dem Methylierungsstatus der CpG-Region von *TNF α* und der Entwicklung von postoperativen Brustschmerzen herstellen. Ähnliche Prozesse in CP/CPPS, die für die Entwicklung chronischer Schmerzen prädisponieren, wären denkbar. Weitere Studien, die eine quantitative Aussage über den Methylierungsstatus in CP/CPPS treffen, wären sinnvoll.

Anschließend untersuchten wir die Genexpression von *TNF α* . Hier zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen CP/CPPS-Patienten und der Kontrollgruppe. Die fehlende Signifikanz ist möglicherweise auf die geringen Fallzahlen zurückzuführen. Trotzdem bestand eine positive Korrelation mit der Genexpression von *CCL3*. Eine Ko-Expression der beiden Gene im Zuge von CP/CPPS somit wäre denkbar.

Des Weiteren erfolgte eine Aufteilung aller Patienten und Gesunden in zwei neue Gruppen entsprechend ihrer Promotormethylierung von *TNF α* (methyliert vs. nicht-methyliert). Interessanterweise zeigten sich in der nicht-methylierten Gruppe signifikant höhere *TNF α* -Genexpressionen als in der methylierten Kohorte. Eine Beeinflussung der Genexpression von *TNF α* im männlichen Genitaltrakt durch Veränderungen der Promotormethylierung ist dementsprechend naheliegend. Veränderungen der

Genexpression von *TNF α* in Folge einer veränderten Methylierung der zugehörigen CpG-Region konnten bereits in anderen Studien gezeigt werden (Ganapathi et al. 2014). Passend hierzu zeigten sich im NIH-CPSI in der Nicht-methylierten Kohorte signifikant höhere Gesamtpunktzahlen sowie höhere Punktzahlen in den Kategorien Schmerz und Miktion. Beeinflussungen der urogenitalen Symptomentwicklung durch Veränderungen des Methylierungsstatus von *TNF α* wären denkbar. Weitere Studien sind notwendig.

5.6.2 Genexpressionsanalyse von *IL1 β*

Neben *TNF α* untersuchten wir mit *IL1 β* ein weiteres klassisches inflammatorisches Gen. Wie auch bei *TNF α* zeigten sich hier auf Genexpressionsebene keine signifikanten Unterschiede zwischen Patienten und der Kontrollgruppe. Dies passt zu den Ergebnissen der klinischen Routinediagnostik, in der die selektierten Patienten ebenfalls keine Zeichen einer Inflammation in der Labordiagnostik aufwiesen. Ein anderer Erklärungsansatz wäre, dass die fehlende Signifikanz auf zu geringe Fallzahlen zurückzuführen ist. Interessanterweise zeigte sich dennoch eine signifikante Korrelation der Genexpression von *IL1 β* mit den Genexpressionen von *CCL2* und *CCL3*. Eine Ko-Expression der Gene im Zuge chronisch-inflammatorischer Prozesse auf Ebene des männlichen Urogenitaltraktes in CP/CPPS wäre denkbar. Aus vorherigen Studien ist bekannt, dass Interleukin-1 β an der Entstehung von chronischen Schmerzen beteiligt ist (Mailhot et al. 2020). Ob dies pathogenetisch zumindest bei einem Teil der CP/CPPS-Patienten bei der Schmerzentstehung von Bedeutung ist, könnte in zukünftigen Studien weiter untersucht werden. Entsprechende Antikörpertherapien sind bei verschiedenen rheumatologischen Krankheitsbildern etabliert und könnten möglicherweise auch bei geeigneten CP/CPPS-Patienten im Sinne einer Präzisionsmedizin Anwendung finden.

5.6.3 Genexpressionsanalyse und Proteinmessung von *CCL2* und *CCL3*

Neben den beiden klassisch inflammatorischen Mediatoren *TNF α* und *Interleukin-1 β* analysierten wir die beiden Chemokine *CCL2* und *CCL3* zunächst ebenfalls auf Genexpressionsebene. Während sich in CP/CPPS-Patienten in Bezug auf *CCL3* eine signifikant höhere Genexpression zeigte, fand sich für *CCL2* kein signifikanter Unterschied. Erhöhte Genexpressionen der beiden Chemokine konnten im Tiermodell in EAP bereits gezeigt werden. Warum sich in unserer Studie lediglich *CCL3* erhöht zeigte, ist fraglich. Auch hier wären zu geringe Fallzahlen ein möglicher Erklärungsansatz. Für *CCL2* fiel diese im Vergleich zu *CCL3* etwas niedriger aus. Andererseits wäre es denkbar, dass *CCL2* in CP/CPPS-Patienten eine geringere Bedeutung zukommt als im Tiermodell. Weitere Untersuchungen könnten hier in Zukunft hilfreich sein.

Im Anschluss untersuchten wir zusätzlich beide Chemokine auf Proteinebene. Da für CCL3 zum Zeitpunkt der Studie kein geeignetes ELISA-Kit für Urin verfügbar war, untersuchten wir lediglich die Proteinkonzentration von CCL2 in ExUr. Spiegel von CCL3 ermittelten wir stattdessen im Blutserum. Wie auch auf Genexpressionsebene zeigte sich in Bezug auf die Proteinkonzentration lediglich für CCL3 eine signifikante Erhöhung in der Patientenkohorte. Für CCL2 fand sich auch hier kein signifikanter Unterschied. Dies unterstützt die These, dass in CP/CPPS CCL3 im Vergleich zum Tiermodell eine entscheidendere Rolle gegenüber CCL2 zukommt. Es bleibt zu erwähnen, dass die Proteinkonzentration von CCL3 eine positive Korrelation mit dem Alter zeigte. Ob die Unterschiede der Proteinkonzentration von CCL3 dementsprechend durch Altersunterschiede zwischen der Patienten- und Kontrollkohorte konfundiert sind, ist fraglich. Weitere Studien in Kohorten nach Matching gegenüber dem Alter wären in Zukunft hilfreich, um dieser Frage auf den Grund zu gehen. Neben dem Alter zeigte die Proteinkonzentration von CCL3 positive Korrelationen mit der klinischen Symptomatik. Positive korrelierte CCL3 hier mit der Gesamtpunktzahl im IPSS und NIH-CPSI-Fragebogen sowie dessen Subkategorien Miktion und Lebensqualität. In vorherigen Studien konnte für CCL3 zudem eine Korrelation mit dem Faktor Schmerz gezeigt werden (Desireddi et al. 2008). Dieser Effekt zeigte sich in unserer Studie nicht. Dennoch unterstreicht unsere Studien die Eignung von CCL3 als Biomarker in CP/CPPS, der die klinische Symptomatik laborchemisch quantifizierbar macht. Hervorzuheben ist, dass dies die erste Studie an CP/CPPS ist, die eine Dysregulation von CCL3 auf systemischer Ebene nahelegt. Studien mit höheren Fallzahlen scheinen vielversprechend.

5.6.4 Promotormethylierungs-, Genexpressionsanalyse und Proteinmessung von NGF

In unserer Studie untersuchten wir die Regulation von NGF in ExUr auf DNA, RNA und Proteinebene. Zunächst bestimmten wir die Proteinkonzentration in ExUr. Hier stellten wir signifikant höhere Spiegel in der CP/CPPS-Kohorte fest. Das Ergebnis lässt sich gut in die Daten bisheriger Studien einordnen. Das Neurotrophin NGF ist ein Protein, welches seit Jahren im Kontext von CP/CPPS als potenzieller Biomarker diskutiert wird. Eine Assoziation von NGF und der Entstehung chronischer Schmerzen ist sowohl in CP/CPPS als auch zahlreichen anderen Erkrankungen des Urogenitaltrakts vorbeschrieben (Coelho et al. 2019). Proteinkonzentrationen von NGF in Seminalplasma und Prostataexprimat korrelierten hier mit der Schmerzsymptomatik von CP/CPPS-Patienten (Watanabe et al. 2011; Miller et al. 2002). Auch in unserer Studie zeigte sich eine positive Korrelation zwischen der Proteinkonzentration von NGF und der Symptomatik in den klinischen Fragebögen. Positive Korrelation bestanden mit der Gesamtpunktzahl im NIH-CPSI, sowie dessen Subkategorien Schmerz, Miktion und

Einfluss auf die Lebensqualität. Unsere Studie stützt dementsprechend die bisherige Datenlage. Eine Verwendung von NGF als Biomarker zur laborchemischen Quantifizierung der Symptomatik in CP/PPS erscheint demnach sinnvoll. Eine Verwendung in der zukünftigen Routinediagnostik könnte hilfreich sein.

Darüber hinaus zeigte sich bei isolierter Betrachtung der CP/PPS-Patienten eine negative Korrelation zwischen der Anzahl immotiler Spermien und den Spiegel von NGF im ExUr. Bisherige Studien konnten einen positiven Einfluss von NGF auf Marker der Fertilität zeigen (Shi et al. 2012; Castellini et al. 2020). Unsere Ergebnisse lassen sich demnach gut in die aktuelle Datenlage einordnen. Erhöhte NGF-Spiegel könnten demnach der Subfertilität in CP/PPS entgegenwirken. Der Einfluss von NGF auf die Fertilität wurde in bisherigen Studien zu CP/PPS nicht untersucht. Weitere Studien mit größeren Fallzahlen werden in Zukunft nötig sein, um diesen Effekt zu untersuchen.

Im nächsten Schritt bestimmten wir in ExUr-Pellets die Genexpression von *NGF*, um die erhöhte Proteinkonzentration in der Patientenkohorte weiter abzuklären. Entgegen unserer Hypothese zeigte sich in der CP/PPS-Kohorte eine signifikant niedrigere Genexpression verglichen mit der Kontrollgruppe. Eine Korrelation von Genexpression und Proteinkonzentration bestand nicht. Aus der Literatur ist bekannt, dass die Expression von *NGF* im Wesentlichen in Neuronen des peripheren und zentralen Nervensystems stattfindet. Jedoch wird es auch von verschiedensten anderen Zelltypen wie Epithelzellen und Leukozyten exprimiert (Aloe et al. 2015). Es wäre demnach denkbar, dass die erhöhten Proteinkonzentration in ExUr nicht von den darin enthaltenen Zellen stammen, sondern aus peripheren Nerven des Urogenitaltrakts. Regulatorisch erniedrigte Genexpressionen von *NGF* in anderen Zelltypen im Sinne eines negativen Feedbackmechanismus wären möglich. Weitere Studien könnten hierbei hilfreich sein.

Genexpressionen von *NGF* korrelierten positiv mit den Genexpressionen von *TAC1R*, *PTGS2* und *CCL3*. Mit der Proteinkonzentration von *CCL3* bestand demgegenüber eine negative Korrelation. Unterschiedliche Prozesse zwischen im ExUr enthaltenen Zellen sowie gewebebeständigen (nicht-enthaltenen Zellen) könnten hierfür verantwortlich sein. Darüber hinaus bleibt zu erwähnen, dass die Komposition der im ExUr-Pellet enthaltenen Zellen individuell sehr unterschiedlich sein kann. So kann beispielsweise der Anteil von Leukozyten und Epithelzellen zwischen einzelnen Studienteilnehmern stark schwanken. Korrelationen verschiedener Genexpressionen könnten folglich dieser Tatsache geschuldet sein. Diese Verzerrung der Daten könnte durch histologische Untersuchungen an Prostatagewebe, zum Beispiel in EAP, abgeklärt werden. Zudem könnten weitere Studien an selektierten Leukozyten und Epithelzellen hilfreich sein.

Entgegen den Ergebnissen zu NGF auf Proteinebene zeigten sich für die Genexpression negative Korrelationen mit der Symptomatik in den klinischen Fragebögen. Darüber hinaus bestand eine negative Korrelation mit dem Alter. Eine Verzerrung dieser Korrelation durch den Altersunterschied zwischen der Patienten- und Kontrollkohorte wäre denkbar. Ob derartige Effekte auf Ebene des Urogenitaltrakts in CP/CPPS eine Rolle spielen, bleibt in weiteren Studien abzuklären.

Auf Ebene der DNA zeigte sich im ExUr-Pellet zwischen Patienten und Gesunden kein signifikanter Unterschied der Promotormethylierung von *NGF*. Darüber hinaus lagen keine Korrelationen mit der folgenden Genexpression oder Proteinkonzentration vor. Aus der Literatur ist jedoch nicht bekannt, ob die Genexpression von *NGF* wesentlich von der Promotormethylierung beeinflusst wird. Eine Regulation durch andere Prozesse wäre demnach denkbar. Die Ergebnisse unserer Studie stehen somit nicht im Widerspruch zu bisherigen Daten. Demgegenüber korrelierte die Promotormethylierung positiv mit der Konzentration von Zink im Ejakulat. Ob hier tatsächlich ein Zusammenhang besteht, ist fraglich. Im Tiermodell konnte bereits ein hemmender Effekt von Zink auf die Ausschüttung von NGF sowie die Entstehung einer Hyperalgesie gezeigt werden (Safieh-Garabedian et al. 1996). Wie genau Zink in diesem Kontext wirkt, wurde in der Studie nicht untersucht. Eine epigenetische Wirkung auf Ebene der Promotormethylierung wäre möglich und könnte auch auf Ebene des Urogenitalsystems von Bedeutung sein. Weitere Studien zu diesem Thema wären notwendig. Zudem zeigte sich eine positive Korrelation mit dem Anteil immotiler Spermien. Dieser Zusammenhang deckt sich mit den Ergebnissen auf Proteinebene. Inwieweit epigenetische Prozesse hierbei eine Rolle spielen, wurde bisher nicht erforscht. Weitere Studien könnten in Zukunft hilfreich sein.

5.6.5 Genexpressionsanalyse von *TAC1R*

Im Zuge unserer Experimente versuchten wir zunächst die Genexpression von Substanz P (*TAC1*) zu ermitteln. In den ExUr-Pellets zeigten sich in der RT-qPCR jedoch sehr hohe CT-Werte, was auf eine geringe Genexpression im untersuchten Zellmaterial hindeutet. Da Substanz P hauptsächlich in Neuronen exprimiert wird, passt dies zur bisherigen Studienlage. Eine Expression in Leukozyten ist zwar ebenfalls vorbeschrieben (Suvas 2017), auf Ebene des ExUr-Pellets scheint sie jedoch von untergeordneter Bedeutung zu sein. Die geringe Genexpression von Substanz P im ExUr-Pellet könnte zudem mit größeren Mengen enthaltener Epithelzellen begründet werden, da hierzu keine nennenswerte Genexpression in der Literatur vorbeschrieben ist.

Wir entschieden uns darum stattdessen, die Genexpression des korrespondierenden Rezeptors *TAC1R* zu ermitteln. Hier zeigte sich in der CP/CPPS-Kohorte eine signifikant niedrigere Genexpression im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe. Derselbe Effekt ist beim sogenannten Chronic Bladder Pain Syndrome vorbeschrieben. Auch bei dieser Erkrankung handelt es sich um eine chronische Schmerzerkrankung auf Ebene des Urogenitalsystems. Wie bei CP/CPPS ist hierbei zum Zeitpunkt der Studie nur wenig über die Entstehung und Aufrechterhaltung der chronischen Schmerzen bekannt. Die Autoren der Studie gehen von einer reflektorischen Rezeptor-Downregulation als Folge verstärkter Einwirkung von Substanz P aus (Sanchez Freire et al. 2010). Ähnliche Prozesse wären auch in der Pathophysiologie von CP/CPPS denkbar. In unserer Studie fand sich eine negative Korrelation zwischen der Symptomatik in den klinischen Fragebögen und der Genexpression von *TAC1R*. Sowohl die Gesamtpunktzahlen im IPSS und NIH-CPSI, sowie dessen Subkategorie Schmerz und Lebensqualität zeigten hier signifikante Korrelationen. Ein Zusammenhang zwischen Signalkaskaden von Substanz P und der Symptomentstehung bei CP/CPPS wären demnach möglich. Ob auch Veränderungen der Expressionen von Substanz P und dessen Rezeptor auf Proteinebene vorliegen ist fraglich. Weitere Studien hierzu könnten in Zukunft hilfreich sein. Entsprechende Antikörpertherapien gegen Substanz P wären ein möglicher Ansatzpunkt zukünftiger Schmerztherapien bei CP/CPPS.

Neben der Symptomatik korrelierte die Genexpression von *TAC1R* mit Markern der Fertilität. Es kann nicht sicher ausgeschlossen werden, ob dies in der Gesamtkohorte Folge einer systematischen Verzerrung aufgrund der eingangs beschriebenen Auswertung durch verschiedene MTAs ist. Demnach soll an dieser Stelle keine ausführliche Diskussion der Daten erfolgen. Wir führten darüber hinaus eine isolierte Betrachtung der Patienten und Gesunden durch. Hier zeigten sich gegensätzliche Korrelationen mit der Genexpression von *TAC1R* zwischen den beiden Kohorten. Diese waren jedoch nicht signifikant, was an der geringen Fallzahl der jeweiligen Korrelationsanalyse liegen könnte. Es bleibt jedoch zu erwähnen, dass in der Literatur bereits Studien existieren, die eine Rolle von Substanz P in der Regulation von Spermienmotilität und -funktion nahelegen (Ravina et al. 2007). Wie genau diese Prozesse ablaufen, ist bisher kaum bekannt. Ob etwaige Dysregulationen von Substanz P und dessen Rezeptor in der Subfertilität bei CP/CPPS eine Rolle spielen, bleibt in weiteren Studien abzuwarten.

5.6.6 Promotormethylierungsanalyse und Proteinmessung von *PTGS2*

Im Anschluss untersuchten wir das Gen *PTGS2* welches für die Cyclooxygenase 2 codiert. Auf Ebene der Promotormethylierung fand sich in der CP/CPPS-Kohorte eine

signifikant höhere Methylierung verglichen mit den gesunden Kontrollen. Passend hierzu zeigte sich die Genexpression von *PTGS2* in der Patientenkohorte signifikant vermindert. Zwischen Promotormethylierung und folgender Genexpression bestand eine signifikante negative Korrelation. Es ist dementsprechend naheliegend, dass eine Dysregulation der Promotormethylierung in CP/CPPS zu einer reduzierten Genexpression von *PTGS2* führt. Ähnliche Prozesse sind bereits im Kontext anderer chronisch-inflammatorischer Erkrankungen vorbeschrieben. In Patienten mit Periodontitis kam es im Zuge der akuten Entzündungsreaktion zu einer vermehrten Expression von *PTGS2*, während es bei einer Chronifizierung der Entzündung zu einer verminderten Expression kam. Besagte Studie konnte zeigen, dass es im Rahmen einer chronischen Peridontitis zu einer Hypermethylierung der CpG-Region von *PTGS2* kommt und in der Folge zu einer verminderten Genexpression (Zhang et al. 2010). Ähnliche Prozesse wären auch im langwierigen Krankheitsverlauf in CP/CPPS denkbar. Es bleibt jedoch zu erwähnen, dass die Korrelation zwischen Promotormethylierung und anschließender Genexpression von *PTGS2* in der einseitigen Korrelationsanalyse mittels Spearman-Rho nur schwach ausgeprägt war. Ein Erklärungsansatz hierfür wäre, dass die Genexpression von *PTGS2* nur in geringem Maße der Kontrolle der Promotormethylierung unterliegt. Eine zu geringe Fallzahl in der Korrelationsanalyse wäre eine alternative Erklärung. Weitere Studien mit größeren Fallzahlen könnten hier in Zukunft hilfreich sein.

Die Ergebnisse unserer Studie stehen im Kontrast zu den bisherigen Daten bezüglich der Cyclooxygenase 2 in CP/CPPS. Hier konnten erhöhte Konzentrationen von Cyclooxygenase 2 und dem zugehörigen Prostaglandin E2 in Prostataexprimat von CP/CPPS-Patienten gezeigt werden (Yuan et al. 2014). In dieser Studie fand sich insbesondere eine positive Korrelation mit der Schmerzsymptomatik, sowie weiteren Kategorien der Symptomfragebögen. Auch in unserer Studie zeigten sich Korrelationen von *PTGS2* mit dem Faktor Schmerz und der übrigen Symptomatik. Jedoch fanden sich diese in unserer Studie gegensätzliche korreliert. Während die Promotormethylierung positiv mit den Punktzahlen der klinischen Fragebögen korreliert war, zeigte sich auf Genexpressionsebene eine negative Korrelation. Eine Einordnung unserer Ergebnisse in bisherige Daten fällt schwer. Festzuhalten bleibt, dass unsere Studie die Regulation der Cyclooxygenase auf einer anderen Ebene untersuchte als die bisherige Untersuchung. Denkbar wäre, dass die erhöhten Spiegel von COX2 in besagter Studie auf gewebständige Zellen im Urogenitaltrakt zurückzuführen sind. Die in ExUr enthaltenen Zellen könnten im Kontext von CP/CPPS aufgrund der chronischen Entzündungsreaktion einer epigenetischen Fehlregulation unterliegen. Eine reflektorisch

verminderte Genexpression wäre die Folge. Weitere Studien könnten in diesem Kontext hilfreich sein. Es ist bereits bekannt, dass die Blockade von COX2 durch NSAIDs in CP/CPPS-Patienten zu einer relevanten Abnahme von Schmerzen führt (Magri et al. 2019). Ein tiefergehendes Verständnis für die pathophysiologischen Prozesse könnte für eine Optimierung der Schmerztherapie in Zukunft sinnvoll sein.

Neben Korrelationen mit der Schmerzsymptomatik zeigte sich zudem eine positive Korrelation zwischen der Genexpression von *PTGS2* und dem pH-Wert des Ejakulats. Ob hier auf Ebene des männlichen Urogenitaltraktes eine Verbindung besteht, ist zum Zeitpunkt der Studie noch nicht bekannt. In Studien zu anderen Zelltypen besteht eine kontroverse Datenlage, ob eine Erhöhung oder Erniedrigung des pH-Werts mit einer vermehrten Expression von COX2 einhergeht (Cha et al. 2005; Pirkebner et al. 2004). Weitere Studien zu dieser Fragestellung im Kontext von CP/CPPS könnten in Zukunft hilfreich sein. Zusätzlich bestand eine stark-negative Korrelation zwischen der Genexpression von *PTGS2* mit dem Alter. Ob hierbei eine Verzerrung durch Altersunterschiede zwischen den beiden Kohorten zugrunde liegt, ist fraglich. Auch bei isolierter Betrachtung der Patientenkohorte zeigte sich eine negative Korrelation, die allerdings nicht signifikant war. Ursächlich könnte hier trotz des hohen Korrelationskoeffizienten die zu kleine Fallzahl sein. In der Literatur ist demgegenüber in zahlreichen Studien ein gegenteiliger Effekt beschrieben, bei dem es im Alter zu einer vermehrten COX2-Expression kommt (Kim et al. 2016). Ob in CP/CPPS gegenläufige Prozesse im Urogenitaltrakt ablaufen, bleibt in weiteren Studien zu untersuchen.

5.6.7 Promotormethylierungsanalyse von *SLC6A4*

In der Promotormethylierungsanalyse zeigten sich signifikant höhere Methylierungen der Promotorregion von *SLC6A4* im ExUr-Pellet von CP/CPPS-Patienten verglichen mit der Kontrollgruppe. Bereits im Tiermodell konnte eine Dysregulation von *SLC6A4* in EAP gezeigt werden. Zudem fand sich nach Induktion der EAP vermehrt depressives Verhalten und eine Erniedrigung der Serotoninkonzentration (Du et al. 2019). Die Autoren mutmaßen, dass diese Fehlregulation auch in CP/CPPS maßgeblich an der Entwicklung von depressivem Verhalten und Einschränkungen der Lebensqualität beteiligt ist. Passend hierzu konnten wir in unserer Studie zeigen, dass die Promotormethylierung eng mit der Symptomatik in den klinischen Fragebögen assoziiert war. Positive Korrelationen bestanden mit den Gesamtpunktzahlen im IPSS und CPSI, sowie dessen Subkategorien. Hervorzuheben ist die starke Korrelation mit der Schmerzsymptomatik und der eingeschränkten Lebensqualität. Eine Studie an Frühgeborenen konnte bereits eine Assoziation von vermehrter Exposition gegenüber Schmerz und einer erhöhten Promotormethylierung von *SLC6A4* feststellen. Die

betroffenen Kinder zeigten im Anschluss eine Veränderung ihres emotionalen Erlebens (Provenzi et al. 2020). Auch in CP/CPPS wäre es eine solche Veränderung der Promotormethylierung in Folge der chronischen Schmerzen denkbar. Aus genannten Studien ist bekannt, dass Methylierungen von *SLC6A4* ein epigenetischer Marker für derartige Expositionen ist. Entsprechende Vorgänge könnten auch in CP/CPPS vorliegen und für die Entwicklung depressiven Verhaltens prädisponieren. Eine negative Korrelation bestand darüber hinaus in unserer Studie mit der Punktzahl im IIEF. Stärkere Promotormethylierungen von *SLC6A4* waren demnach mit einer ausgeprägteren Symptomatik der erektilen Dysfunktion assoziiert. Weitere Studien zu dieser Thematik stehen zum Zeitpunkt der Dissertation aus. Eine Einordnung in bisherige Daten ist demnach nicht möglich. Interessanterweise zeigte sich diese Korrelation auch bei isolierter Betrachtung der gesunden Kontrollgruppe trotz der geringen Fallzahl signifikant. Ein Zusammenhang zwischen der Promotormethylierung von *SLC6A4* und erektiler Dysfunktion wäre demnach auch außerhalb von CP/CPPS denkbar. Weitere Studien scheinen erfolgsversprechend und könnten tiefergehende Einblicke liefern.

Darüber hinaus bestand eine negative Korrelation zwischen der Promotormethylierung und dem pH-Wert im Ejakulat. Inwieweit die Promotormethylierung von *SLC6A4* durch azidotische Prozesse auf urogenitaler Ebene beeinflusst wird, ist zum jetzigen Zeitpunkt nicht bekannt. Epigenetische Veränderungen im Zuge dieser Dysregulationen wären denkbar und könnten in weiteren Studien untersucht werden.

5.6.8 Promotormethylierungsanalyse von *CALCA*

Im Anschluss untersuchten wir die Promotormethylierung von *CALCA* im ExUr-Pellet. Im Gegensatz zu den vorherigen Experimenten an Leukozyten zeigte sich in CP/CPPS beim gesamten Pellet inklusive der Epithelzellen kein signifikanter Unterschied mehr. Es wäre dementsprechend denkbar, dass eine epigenetische Dysregulation von *CALCA* auf Leukozyten beschränkt ist und die Epithelzellen nicht betrifft. Aufgrund des Mangels an Material konnten wir dies leider in den vorherigen Experimenten nicht untersuchen. Weitere Studien an selektierten Epithelzellen könnten hier neue Aufschlüsse liefern.

5.6.9 Promotormethylierungsanalyse von *OPRM1*

Auch bei der Analyse der Promotormethylierung von *OPRM1* zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen Patienten und Gesunden. In vorherigen Studien wurden Veränderungen in der Promotormethylierung von *OPRM1* mit der Entwicklung von akuten und chronischen Schmerzen in Verbindung gebracht (Chidambaran et al. 2017). Unsere Daten deuten darauf hin, dass in CP/CPPS keine epigenetischen Dysregulationen in Bezug auf *OPRM1* vorliegen. Aufgrund der geringen Fallzahl unserer

Studie ist ihre Aussagekraft jedoch begrenzt. In der Korrelationsanalyse fand sich eine positive Korrelation mit der Promotormethylierung von *CALCA*. Eine gemeinsame epigenetische Regulation der beiden Gene wäre denkbar. Eine Assoziation ist in der Literatur jedoch zum Zeitpunkt der Dissertation nicht vorbeschrieben. Des Weiteren fand sich eine positive Korrelation mit der Anzahl von Leukozyten in Anfangs- und ExUr. Eine verstärkte Promotormethylierung von *OPRM1* in Leukozyten verglichen mit Epithelzellen wäre hierfür eine mögliche Erklärung. Weiterführende Untersuchungen an separierten Leukozyten und Epithelzellen könnten in zukünftigen Studien Klärung schaffen.

5.6.10 Promotormethylierungsanalyse von *TRPA1*

Zuletzt untersuchten wir die Promotorregion von *TRPA1*. Auch hier fand sich in der durchschnittlichen Promotormethylierung kein signifikanter Unterschied zwischen CP/CPPS und der Kontrollgruppe. *TRPA1* wird hauptsächlich von Neuronen exprimiert und ist wesentlich an der Entstehung von Schmerzen beteiligt. Für eine Beteiligung in CP/CPPS liegen bisher keine Daten vor. Unsere Studie deutet darauf hin, dass zumindest auf Ebene der Promotormethylierung keine Veränderungen im ExUr-Pellet von CP/CPPS-Patienten vorliegen. Über Vorgänge in Nervenfasern kann in unserer Studie allerdings keine Aussage getroffen werden. Es fand sich jedoch eine positive Korrelation zwischen der Promotormethylierung von *TRPA1* und der Zinkkonzentration im Ejakulat. Als Ionenkanal spielt *TRPA1* hauptsächlich eine Rolle beim Einstrom von Calcium und Natrium in Neuronen. Aber auch andere Ionen wie Zink sind in der Funktion von *TRPA1* vorbeschrieben (Luostarinen et al. 2021). Ein Zusammenhang zwischen dem Zinkhaushalt auf Ebene des Urogenitaltrakts und *TRPA1* ist dementsprechend auch im Rahmen von CP/CPPS denkbar. Inwieweit ein tatsächlicher Zusammenhang mit epigenetischen Fehlregulationen besteht, ist fraglich und bleibt abzuwarten.

Zusammenfassung (Deutsch)

CP/CPPS stellt aufgrund der hohen Prävalenz eine Erkrankung mit enormer Bedeutung in der Urologie dar. Schmerzen und eine eingeschränkte Fertilität führen zu einem hohen Leidensdruck der Patienten. Trotz der hohen Prävalenz ist nur wenig über die Entstehung und Aufrechterhaltung der Symptomatik bekannt. Diese Tatsache verkompliziert das Stellen der Diagnose und die folgende Therapie ungemein. In den letzten Jahren rückte die neurogene Inflammation als Erklärungsmodell für CP/CPPS zunehmend in den Vordergrund. In dieser Arbeit wurden unterschiedliche Mediatoren aus dem Bereich der neurogenen Inflammation auf den drei Ebenen DNA, RNA und Protein untersucht. Die Studie gliedert sich in drei separate Abschnitte. Im ersten Teil führten wir Versuche an einer Gesamtkohorte von 267 Patienten und 151 Kontrollpersonen durch, um das heterogene Kollektiv von CP/CPPS-Patienten möglichst vollständig abzubilden. Anschließend bildeten wir hieraus im zweiten Teil der Studie eine Subkohorte mit Matching gegenüber dem Alter, um konfundierende Altersunterschiede zwischen den Kohorten auszuschließen. Im dritten Teil der Studie analysierten wir eine nach dem Faktor Schmerz selektionierte Subkohorte.

Wir untersuchten aus der Literatur vorbekannte Faktoren und solche, die im Kontext der Erkrankung vollkommen unerforscht waren. *S100A12*, *RAGE*, *CALCA*, *CCL3*, *TNF α* , *TAC1R*, *NGF*, *PTGS2* und *SLC6A4* fanden sich in CP/CPPS verändert und zeigten teils erhebliche Korrelationen mit dem Faktor Schmerz wie auch mit Markern der Fertilität. Besonders hervorzuheben sind *S100A12* und der korrespondierende Rezeptor *RAGE*. *S100A12* zeigte sich in CP/CPPS sowohl auf lokaler Ebene im Seminalplasma, als auch systemisch im Blut stark erhöht. Im Spermogramm fanden sich erhebliche Korrelationen mit Markern der Inflammation, Fertilität und dem pH-Wert. Auch mit der klinischen Symptomatik fanden sich zahlreiche Korrelationen. Mit *S100A12* schlagen wir einen potenziellen Biomarker vor, der mit Schmerz und Subfertilität in Zusammenhang zu stehen scheint. Hervorzuheben ist auch das Gen *CALCA*. Sowohl auf DNA- und RNA-Ebene zeigten sich in Patienten deutliche Veränderungen, die mit der Schmerzsymptomatik und Fertilitätsparametern korrelierten waren. Unsere Studie bietet eine solide Grundlage für weitere Studien zur Prüfung der Anwendbarkeit in Diagnostik und Therapie. Insbesondere *CALCA* und *S100A12* scheinen hier vielversprechend zu sein.

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass unsere Studie zahlreiche Veränderungen auf molekularer und biochemischer Ebene darstellen konnte, die sowohl mit der Schmerzsymptomatik und Subfertilität von CP/CPPS-Patienten in Verbindung gebracht werden können. Die Arbeit liefert tiefere Einblicke in die pathophysiologischen Prozesse von CP/CPPS und bietet eine solide Grundlage für weitere Untersuchungen.

Zusammenfassung (Englisch)

Due to its high prevalence, CP/CPPS is a disease of enormous importance in urology. Pain and impaired fertility lead to a high level of suffering for patients. Despite the high prevalence, little is known about the development and maintenance of the symptoms. This fact complicates the diagnosis and subsequent treatment immensely. In recent years, neurogenic inflammation has increasingly come to the fore as an explanatory model for CP/CPPS. In this study, different mediators from the field of neurogenic inflammation were investigated at the three levels of DNA, RNA and protein. The study is divided into three separate sections. In the first part, we conducted experiments on a total cohort of 267 patients and 151 control subjects to represent the heterogeneous collective of CP/CPPS patients as completely as possible. Subsequently, in the second part of the study, we formed a subcohort with matching against age to exclude confounding age differences between the cohorts. In the third part of the study, we analysed a subcohort selected according to the factor pain.

We investigated factors known from the literature and those that were completely unexplored in the context of the disease. *S100A12*, *RAGE*, *CALCA*, *CCL3*, *TNF α* , *TAC1R*, *NGF*, *PTGS2* and *SLC6A4* were found to be altered in CP/CPPS and in some cases showed significant correlations with the pain levels as well as with markers of fertility. Particularly noteworthy are *S100A12* and the corresponding receptor *RAGE*. *S100A12* was strongly elevated in CP/CPPS both locally in the seminal plasma and systemically in the blood. In the spermogram, significant correlations were found with markers of inflammation, fertility and the pH value. Numerous correlations were also found with clinical symptoms. With *S100A12*, we propose a potential biomarker that appears to be associated with pain and subfertility. The gene *CALCA* should also be emphasized. Both on the DNA and RNA level, patients showed significant changes that correlated with pain symptoms and fertility parameters. Our study provides a solid basis for further studies to test the applicability in diagnostics and therapy. *CALCA* and *S100A12* in particular appear to be promising here.

In summary, our study has demonstrated numerous changes at the molecular and biochemical level that can be associated with both pain symptoms and subfertility in CP/CPPS patients. The work provides deeper insights into the pathophysiological processes of CP/CPPS and offers a solid basis for further investigations.

Abkürzungsverzeichnis

| <u>Abkürzung</u> | <u>Bedeutung</u> |
|--------------------|---|
| °C | Grad Celsius |
| Abb. | Abbildung |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| bp | Basenpaare |
| bspw. | beispielsweise |
| BPH | Benigne Prostatahyperplasie |
| BPS | Benignes Prostatasyndrom |
| BS-DNA | Bisulfite behandelte Deoxyribonucleic acid |
| bzw. | beziehungsweise |
| CALCA | Calcitonin Gene-Related Peptide alpha |
| CCL2 | CC-chemokine ligand 2 |
| CCL3 | Chemokine (C-C motif) ligand 3 |
| cDNA | complementary DNA |
| CGRP | Calcitonin Gene-Related Peptide |
| CpG | DNA Region mit hoher Dichte an Cytosin und Guanodin |
| CP | Chronische Prostatitis |
| CPPS | Chronisches Beckenschmerzsyndrom |
| COBRA | Combined Bisulfite Restriction Analysis |
| COX2 | Cyclooxygenase 2 |
| CT-Wert | Cycle Threshold |
| ddH ₂ O | doppelt-destilliertes Wasser |
| DEPC | Diethylpyrocarbonat |
| DNA | Deoxyribonucleic acid |
| DRU | Digital-rektale Untersuchung |
| dsDNA | doppelsträngige Deoxyribonucleic acid |
| dNTP | Desoxyribonukleintriphosphat |
| dsDNA | doppelsträngige DNA |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| EAP | Experimentell erzeugte Autoimmunprostatitis |
| ELISA | Enzyme-Linked Immunosorbent Assay |
| ExUr | Exprimaturin |
| HCl | Salzsäure |
| HRP | Horseradish Peroxidase |
| IIEF | International Index of Erectile Function |
| IL1 β | Interleukin-1 β |
| IL-6 | Interleukin-6 |
| IL-8 | Interleukin-8 |
| IPSS | International Prostate Symptom Score |
| l | Liter |
| mA | Miliampere |
| mg | Miligramm |
| μ g | Mikrogramm |
| μ l | Mikroliter |
| μ mol | Mikromol |
| MCP1 | Monocyte Chemotactic Protein 1 |
| min | Minute |
| Mio | Millionen |
| MIP-1-alpha | Macrophage Inflammatory Protein-1 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|--------------------------------|---|
| ml | Mililiter |
| <i>MMLV-RT</i> | <i>Moloney Maus Leukämie Virus-Reverse Transkriptase</i> |
| mRNA | Messenger RNA |
| NaAc | Natriumacetat |
| ns. | nicht signifikant |
| NaCl | Natriumchlorid |
| ng | Nanogramm |
| NIH | National Institutes of Health |
| NIH-CPSI | NIH-Chronic Prostatitis Symptom Index |
| nl | Nanoliter |
| nm | Nanometer |
| <i>NGF</i> | Nerve growth factor |
| NSAR | Nichtsteroidale Antirheumatika |
| <i>OPRM1</i> | Opioid Receptor Mu 1 |
| <i>p</i> | p-Wert |
| P2X3R | P2X Purinoceptor 3 |
| PAR2 | Protease Activated Receptor 2 |
| PBS | Phosphate Buffered Saline |
| PCR | Polymerase-Kettenreaktion |
| PDE-5 | Phosphodiesterase 5 |
| pg | Piktogramm |
| Pos. | Position |
| PPL | Peroxidase positive Leukozyten |
| PTGS2 | Prostaglandin-Endoperoxide Synthase 2 |
| ρ | Spearman-Rho-Korrelationskoeffizient |
| RNA | Ribonucleic Acid |
| rpm | Revolutions per Minute |
| RT-qPCR | Reverse Transkription mit anschließend quantitativer PCR |
| <i>S100A12</i> | <i>S100 calcium-binding protein A12</i> |
| <i>SLC6A4</i> | Solute Carrier Family 6 Member 4 (Serotonintransporter) |
| SSB | Streptavidin-Sapharose-Beads |
| SSRI | Selective Serotonin Reuptake Inhibitors |
| SP | Substanz P |
| TAE-Puffer | TRIS-Acetat-EDTA-Puffer |
| <i>TAC1R</i> | Tachykinin Receptor 1 |
| TMB | Tetramethylbenzidin |
| <i>TNF-α</i> | Tumornekrosefaktor- α |
| TRIS | Tris-(hydroxymethyl)-Aminomethan |
| <i>TRPA1</i> | Transientes Rezeptorpotential Ankyrin 1 |
| UPOINT | U rinary, P sychosocial, O rgan S pecific, I nfectious, N eurological/systemic and T enderness |
| V | Volt |
| WHO | World Health Organisation |

Abbildungsverzeichnis

Hauptteil

| | |
|---|----|
| Abbildung 1 Phänotypisierung und multimodale Therapie nach UPOINT. | 5 |
| Abbildung 2 Prozesse der neurogenen Inflammation. | 10 |
| Abbildung 3 Ablaufplan der Versuche an ExUr. | 18 |
| Abbildung 4 Auswertung Pyrosequencing. | 30 |
| Abbildung 5 Agarosegel-Elektrophorese der COBRA von <i>TNFα</i> | 33 |
| Abbildung 6 Durchschnittliche Promotor-methylierung CpG-Region <i>CALCA</i> | 39 |
| Abbildung 7 Promotormethylierungs-analyse CpG-Region <i>CALCA</i> an Position 4. | 39 |
| Abbildung 8 Korrelationsanalyse der Promotormethylierung von <i>CALCA</i> Position 4 und dem pH-Wert im Ejakulat. | 40 |
| Abbildung 9 Genexpression von <i>CALCA</i> in Leukozyten aus ExUr. | 41 |
| Abbildung 10 Korrelationsanalyse der Gesamtpunktzahl in der Schmerzkategorie des CPSI-Fragebogens in Abhängigkeit der Genexpression von <i>CALCA</i> in Leukozyten aus ExUr. | 42 |
| Abbildung 11 Korrelationsanalyse der Genexpression von <i>CALCA</i> in Leukozyten aus ExUr in Abhängigkeit des zugrundeliegenden pH-Werts im Ejakulat. | 43 |
| Abbildung 12 Proteinkonzentration von S100A12 im Blutserum. | 44 |
| Abbildung 13 Korrelationsanalyse der Gesamtpunktzahl in der Schmerzkategorie des CPSI-Fragebogens und der Proteinkonzentration von S100A12 im Blutserum. | 45 |
| Abbildung 14 Korrelationsanalyse der Proteinkonzentration von S100A12 im Blutserum und dem pH-Wert im Ejakulat. | 46 |
| Abbildung 15 Korrelationsanalyse der Proteinkonzentration von S100A12 im Blutserum und der Genexpression von <i>RAGE</i> in Leukozyten aus ExUr. | 46 |
| Abbildung 16 Proteinkonzentration von S100A12 im Seminalplasma. | 47 |
| Abbildung 17 Korrelationsanalyse der Gesamtpunktzahl in der Schmerzkategorie des CPSI-Fragebogens in Abhängigkeit der Proteinkonzentration von S100A12 im Seminalplasma. | 48 |
| Abbildung 18 Korrelationsanalyse der Konzentration von Elastase im Ejakulat und der Proteinkonzentration von S100A12 im Seminalplasma. | 48 |
| Abbildung 19 Korrelationsanalyse des Alters mit der Proteinkonzentration von S100A12 in ng/ml im Seminalplasma. | 50 |
| Abbildung 20 Genexpression von <i>RAGE</i> in Leukozyten aus ExUr. | 50 |
| Abbildung 21 Korrelationsanalyse der Genexpression von <i>RAGE</i> in Leukozyten aus ExUr mit der Gesamtpunktzahl in der Schmerzkategorie des CPSI-Fragebogens. | 51 |
| Abbildung 22 Korrelationsanalyse der Genexpressionen von <i>CALCA</i> und <i>RAGE</i> | 52 |
| Abbildung 23 Calciumkonzentration im Seminalplasma. | 53 |
| Abbildung 24 Proteinkonzentrationen von S100A12 im Seminalplasma nach Matching der Kohorten gegenüber dem Alter. | 57 |
| Abbildung 25 Proteinkonzentrationen von S100A12 im Blutserum nach Matching der Kohorten gegenüber dem Alter. | 58 |
| Abbildung 26 Status der Promotormethylierung von <i>TNFα</i> nach Unterteilung in <i>methyliert und nicht-methyliert</i> | 62 |

Abbildung 27 **Status der Promotormethylierung von *TNF α* nach Unterteilung in nicht-, leicht- und stark-methyliert.**..... 63

Abbildung 28 **Genexpressionsanalyse von *TNF α* im ExUr-Pellet nach Unterteilung in Nicht-Methyliert und Methyliert.**..... 64

Abbildung 29 **Promotormethylierungs-analyse von *NGF* im ExUr-Pellet.**..... 65

Abbildung 30 **Genexpressionsanalyse von *NGF* im ExUr-Pellet.**..... 65

Abbildung 31 **Proteinkonzentration von *NGF* im ExUr.**..... 66

Abbildung 32 **Promotormethylierungs-analyse von *PTGS2* im ExUr-Pellet.**..... 66

Abbildung 33 **Genexpressionsanalyse von *PTGS2* im ExUr-Pellet.**..... 66

Abbildung 34 **Genexpressionsanalyse von *CCL2* im ExUr-Pellet.**..... 68

Abbildung 35 **Genexpressionsanalyse von *CCL3* im ExUr-Pellet.**..... 68

Abbildung 36 **Proteinkonzentration von *CCL2* im ExUr.**..... 69

Abbildung 37 **Proteinkonzentration von *CCL3* im Blutserum.**..... 69

Abbildung 38 **Genexpressionsanalyse von *TAC1R* im ExUr-Pellet.**..... 70

Abbildung 39 **Promotormethylierungsanalyse von *SLC6A4* im ExUr-Pellet.**..... 71

Anhang

Figure 1 **Agarosegel-Elektrophorese der PCR-Produkte von *TNF α* im ExUr-Pellet.**..... 119

Figure 2 **Korrelation der Gesamtpunktzahl im Schmerzscore des CPSI-Fragebogens und der Genexpression von *CALCA* in Leukozyten aus ExUr.**.... 119

Figure 3 **Korrelationsanalyse der Proteinkonzentration von IL-8 im Seminalplasma in pg/ml mit der Genexpression von *CALCA* in Leukozyten aus ExUr.**..... 120

Figure 4 **Genexpression von *CALCA* in Epithelzellen aus ExUr.**..... 120

Figure 5 **Korrelationsanalyse der Genexpressionen von *CALCA* in Epithelzellen und Leukozyten aus ExUr.**..... 121

Figure 6 **Korrelationsanalyse der Gesamtpunktzahl in der Schmerzkategorie des CPSI-Fragebogens und der Genexpression von *CALCA* in Epithelzellen aus ExUr.**..... 121

Figure 7 **Genexpression von *CALCA* in Leukozyten aus Ejakulat.**..... 122

Figure 8 **Genexpression von *S100A12* in Leukozyten aus ExUr.**..... 122

Figure 9 **Genexpression von *S100A12* in Leukozyten aus Ejakulat.**..... 123

Figure 10 **Korrelationsanalyse der Proteinkonzentration von *S100A12* im Blutserum und dem Alter.**..... 123

Figure 11 **Korrelationsanalyse der Proteinkonzentration von *S100A12* im Blutserum und der Spermiovitalität im Ejakulat.**..... 124

Figure 12 **Korrelationsanalyse der Proteinkonzentration von *S100A12* im Blutserum und dem pH-Wert im Ejakulat.**..... 124

Figure 13 **Korrelationsanalyse der Proteinkonzentration von *S100A12* im Blutserum und der Zinkkonzentration im Seminalplasma.**..... 125

Figure 14 **Korrelationsanalyse der Genexpression von *S100A12* in Leukozyten aus ExUr mit der Proteinkonzentration von *S100A12* im Blutserum.**..... 125

Figure 15 **Korrelationsanalyse der Anzahl von Peroxidase-positiven Zellen im Ejakulat und der Proteinkonzentration von *S100A12* im Seminalplasma.**..... 126

Figure 16 **Korrelationsanalyse der Proteinkonzentrationen von *S100A12* und Interleukin-8 im Seminalplasma.**..... 126

Figure 17 **Korrelationsanalyse der Proteinkonzentration von *S100A12* im Seminalplasma mit der Spermien-Vitalität im Ejakulat.**..... 127

| | |
|---|-----|
| Figure 18 Korrelationsanalyse der Proteinkonzentration von S100A12 in ng/ml im Seminalplasma mit dem Anteil der Spermien mit einem Flaggelumdefekt in %. | 127 |
| Figure 19 Korrelationsanalyse der Proteinkonzentration von S100A12 in ng/ml im Seminalplasma mit dem Anteil immotiler Spermien im Spermogramm in %.... | 128 |
| Figure 20 Korrelationsanalyse der Proteinkonzentrationen von S100A12 im Seminalplasma in ng/ml und der Seminalplasmakonzentration von Zink in mg/dl. | 128 |
| Figure 21 Korrelationsanalyse der Genexpression von <i>RAGE</i> in Leukozyten aus ExUr mit der Gesamtpunktzahl in der Schmerzkategorie des NIH-CPSI. | 129 |
| Figure 22 Korrelationsanalyse der Genexpression von <i>RAGE</i> und <i>CALCA</i> in Leukozyten aus ExUr. | 129 |
| Figure 23 Genexpression von <i>CCL3</i> in Leukozyten aus ExUr. | 130 |
| Figure 24 Korrelationsanalyse der Seminalplasmakonzentrationen von Zink und Calcium in der Gesamtkohorte. | 130 |
| Figure 25 Korrelationsanalyse der Seminalplasmakonzentrationen von Zink und Calcium in CP/CPPS-Patienten. | 131 |
| Figure 26 Korrelationsanalyse der Anzahl von Leukozyten im ExUr mit der Seminalplasmakonzentrationen von Calcium. | 131 |
| Figure 27 Korrelationsanalyse der Anzahl von Peroxidase-positiven Zellen im Ejakulat mit der Seminalplasmakonzentrationen von Calcium. | 132 |
| Figure 28 Korrelationsanalyse der Proteinkonzentration von S100A12 im Seminalplasma und der in der Gesamtpunktzahl in der Schmerzkategorie des CPSI-Fragebogens Subgruppenanalyse nach Matching des Alters. | 132 |
| Figure 29 Korrelationsanalyse der Leukozytenzahl im Ejakulat in Mio./ml mit der Proteinkonzentration von S100A12 in ng/ml im Seminalplasma in der Subgruppenanalyse nach Matching des Alters. | 133 |
| Figure 30 Korrelationsanalyse der Anzahl von Peroxidase-positiven Zellen im Ejakulat in Mio./ml mit der Proteinkonzentration von S100A12 in ng/ml im Seminalplasma in der Subgruppenanalyse nach Matching des Alters. | 133 |
| Figure 31 Korrelationsanalyse der Proteinkonzentrationen von S100A12 in ng/ml und Elastase in ng/ml im Seminalplasma in der Subgruppenanalyse nach Matching des Alters. | 134 |
| Figure 32 Korrelationsanalyse der Proteinkonzentrationen von S100A12 in ng/ml und Interleukin-8 in pg/ml im Seminalplasma in der Subgruppenanalyse nach Matching des Alters. | 134 |
| Figure 33 Korrelationsanalyse der Proteinkonzentration von S100A12 in ng/ml im Seminalplasma mit der Proteinkonzentration von S100A12 im Blutserum in ng/ml in der Subgruppenanalyse nach Matching des Alters. | 135 |
| Figure 34 Korrelationsanalyse der Proteinkonzentration von S100A12 im Blutserum und dem Alter in der Subgruppenanalyse nach Matching des Alters. | 135 |
| Figure 35 Korrelationsanalyse der Proteinkonzentration von S100A12 im Blutserum und der Gesamtpunktzahl in der Schmerzkategorie des CPSI-Fragebogens in der Subgruppenanalyse nach Matching des Alters. | 136 |
| Figure 36 Korrelationsanalyse der Proteinkonzentration von S100A12 im Blutserum und pH-Wert im Ejakulat in der Subgruppenanalyse nach Matching des Alters. | 136 |
| Figure 37 Korrelationsanalyse der Proteinkonzentration von S100A12 im Blutserum und pH-Wert im Ejakulat in der Subgruppenanalyse nach Matching des Alters in der Kohorte der gesunden Kontrollpersonen (n=20). | 137 |

| | |
|---|-----|
| Figure 38 Korrelationsanalyse der Proteinkonzentrationen von S100A12 im Blutserum und Interleukin-8 im Seminalplasma in pg/ml in der Subgruppenanalyse nach Matching des Alters. | 137 |
| Figure 39 Genexpressionsanalyse von <i>TNFα</i> im ExUr-Pellet. | 138 |
| Figure 40 Genexpressionsanalyse von <i>IL1β</i> im ExUr-Pellet. | 138 |
| Figure 41 Promotormethylierungsanalyse von <i>CALCA</i> im ExUr-Pellet. | 139 |
| Figure 42 Promotormethylierungsanalyse von <i>TRPA1</i> im ExUr-Pellet. | 139 |
| Figure 43 Promotormethylierungsanalyse von <i>OPRM1</i> im ExUr-Pellet. | 140 |

Tabellenverzeichnis

| | |
|---|----|
| Tabelle 1 Schwellenwerte zur Differenzierung von CP/CPPS in Typ 3A und 3B. ... | 2 |
| Tabelle 2 Chemikalien und Reagenzien. | 13 |
| Tabelle 3 Zusammensetzung der verwendeten Puffer | 14 |
| Tabelle 4 Gerätschaften. | 14 |
| Tabelle 5 Verbrauchsgegenstände | 15 |
| Tabelle 6 Enzyme und zugehörige Puffer. | 15 |
| Tabelle 7 Primer RT-qPCR. | 15 |
| Tabelle 8 Primer Pyrosequenzierung | 17 |
| Tabelle 9 Primer COBRA | 17 |
| Tabelle 10 Vollständig bereitgestellte Kits | 17 |
| Tabelle 11 Software | 18 |
| Tabelle 12 Ergebnisse der andrologischen Fragebögen. | 37 |
| Tabelle 13 Charakterisierung der CP/CPPS- und Kontrollkohorte mittels Spermiogramm. | 38 |
| Tabelle 14 Ergebnisse der labortechnischen Routinediagnostik an CP/CPPS-Patienten. | 38 |
| Tabelle 15 Korrelation des Alters mit laborchemischen Parametern. | 54 |
| Tabelle 16 Ergebnisse der andrologischen Fragebögen nach Matching der Kohorten bezüglich des Alters. | 55 |
| Tabelle 17 Ergebnisse der labortechnischen Routinediagnostik an CP/CPPS-Patienten nach Matching der Kohorten bezüglich des Alters. | 56 |
| Tabelle 18 Charakterisierung der CP/CPPS- und Kontrollkohorte mittels Spermiogramm nach Matching der Kohorten bezüglich des Alters. | 56 |
| Tabelle 19 Ergebnisse der andrologischen Fragebögen für die Kohorte der CP/CPPS-Patienten mit starken Schmerzen. | 60 |
| Tabelle 20 Ergebnisse der labortechnischen Routinediagnostik an der CP/CPPS-Kohorte mit starken Schmerzen. | 60 |
| Tabelle 21 Charakterisierung der CP/CPPS-Kohorte mit starken Schmerzen und Kontrollkohorte mittels Spermiogramm. | 60 |
| Tabelle 22 Status der Promotormethylierung von <i>TNFα</i> nach Unterteilung in <i>methyliert und nicht-methyliert.</i> | 61 |
| Tabelle 23 Status der Promotormethylierung von <i>TNFα</i> nach Unterteilung in <i>nicht-, leicht- und stark-methyliert.</i> | 62 |

Literaturverzeichnis

- Abrahamsson, Per-Anders; Dizeyi, Nishtman; Alm, Per; Di Anthony Sant'Agnes, P.; Deftos, Leonard J.; Aumiller, Gerhardt (2000): Calcitonin and calcitonin gene-related peptide in the human prostate gland. In: *Prostate* 44 (3), S. 181–186. DOI: 10.1002/1097-0045(20000801)44:3%3C181::aid-pros1%3E3.0.co;2-l.
- Akirav, Eitan M.; Preston-Hurlburt, Paula; Garyu, Justin; Henegariu, Octavian; Clynes, Raphael; Schmidt, Ann Marie; Herold, Kevan C. (2012): RAGE expression in human T cells: a link between environmental factors and adaptive immune responses. In: *PloS one* 7 (4), e34698. DOI: 10.1371/journal.pone.0034698.
- Aloe, Luigi; Rocco, Maria Luisa; Balzamino, Bijorn Omar; Micera, Alessandra (2015): Nerve Growth Factor: A Focus on Neuroscience and Therapy. In: *Current neuropharmacology* 13 (3), S. 294–303. DOI: 10.2174/1570159X13666150403231920.
- Arciszewski, Marcin Bartłomiej (2004): Distribution of calcitonin gene-related peptide (CGRP), substance P (SP) and galanin (GAL) immunoreactive nerve fibers in the seminal vesicle and prostate of the male sheep. In: *Annals of anatomy = Anatomischer Anzeiger : official organ of the Anatomische Gesellschaft* 186 (1), S. 83–87. DOI: 10.1016/S0940-9602(04)80130-4.
- Bachir, Bassel G.; Jarvi, Keith (2014): Infectious, inflammatory, and immunologic conditions resulting in male infertility. In: *The Urologic clinics of North America* 41 (1), S. 67–81. DOI: 10.1016/j.ucl.2013.08.008.
- Bagheri, Vahid; Hassanshahi, Gholamhossein; Zeinali, Masoud; Abedinzadeh, Mehdi; Khorramdelazad, Hossein (2016): Elevated levels of S100A12 in the seminal plasma of infertile men with varicocele. In: *International urology and nephrology* 48 (3), S. 343–347. DOI: 10.1007/s11255-015-1188-5.
- Balkan, W.; Oates, E. L.; Howard, G. A.; Roos, B. A. (1999): Testes exhibit elevated expression of calcitonin gene-related peptide receptor component protein. In: *Endocrinology* 140 (3), S. 1459–1469. DOI: 10.1210/endo.140.3.6541.
- Berg, Elena; Houska, Petr; Nesheim, Nils; Schuppe, Hans-Christian; Pilatz, Adrian; Fijak, Monika et al. (2021): Chronic Prostatitis/Chronic Pelvic Pain Syndrome Leads to Impaired Semen Parameters, Increased Sperm DNA Fragmentation and Unfavorable Changes of Sperm Protamine mRNA Ratio. In: *International journal of molecular sciences* 22 (15). DOI: 10.3390/ijms22157854.
- Bowen, Diana K.; Dielubanza, Elodi; Schaeffer, Anthony J. (2015): Chronic bacterial prostatitis and chronic pelvic pain syndrome. In: *BMJ Clinical Evidence* 2015.
- Bracci-Laudiero, Luisa; Aloe, Luigi; Buanne, Pasquale; Finn, Anja; Stenfors, Carina; Vigneti, Eliana et al. (2002): NGF modulates CGRP synthesis in human B-lymphocytes: a possible anti-inflammatory action of NGF? In: *Journal of Neuroimmunology* 123 (1-2), S. 58–65. DOI: 10.1016/s0165-5728(01)00475-1.
- Breser, María L.; Salazar, Florencia C.; Rivero, Viginia E.; Motrich, Rubén D. (2017): Immunological Mechanisms Underlying Chronic Pelvic Pain and Prostate Inflammation in Chronic Pelvic Pain Syndrome. In: *Frontiers in immunology* 8, S. 898. DOI: 10.3389/fimmu.2017.00898.
- Castellini, Cesare; Mattioli, Simona; Dal Bosco, Alessandro; Mancinelli, Alice Cartoni; Rende, Mario; Stabile, Anna Maria; Pistilli, Alessandra (2020): Role of NGF on sperm

traits: A review. In: *Theriogenology* 150, S. 210–214. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2020.01.039.

Cha, Seok Ho; Park, Ji Eun; Kwak, Jin-Oh; Kim, Hyun-Woo; Kim, Jong Bong; Lee, Kwang Youn; Cha, Young-Nam (2005): Attenuation of Extracellular Acidic pH-induced Cyclooxygenase-2 Expression by Nitric Oxide. In: *Molecules and Cells* 19 (2), S. 232–238. DOI: 10.1016/S1016-8478(23)13162-1.

Chidambaran, Vidya; Zhang, Xue; Martin, Lisa J.; Ding, Lili; Weirauch, Matthew T.; Geisler, Kristie et al. (2017): DNA methylation at the mu-1 opioid receptor gene (OPRM1) promoter predicts preoperative, acute, and chronic postsurgical pain after spine fusion. In: *Pharmacogenomics and personalized medicine* 10, S. 157–168. DOI: 10.2147/PGPM.S132691.

Clemens, J. Quentin; Meenan, Richard T.; O'Keeffe Rosetti, Maureen C.; Gao, Sara Y.; Calhoun, Elizabeth A. (2005): Incidence and clinical characteristics of National Institutes of Health type III prostatitis in the community. In: *The Journal of urology* 174 (6), S. 2319–2322. DOI: 10.1097/01.ju.0000182152.28519.e7.

Coelho, Ana; Oliveira, Raquel; Antunes-Lopes, Tiago; Cruz, Célia Duarte (2019): Partners in Crime: NGF and BDNF in Visceral Dysfunction. In: *Current neuropharmacology* 17 (11), S. 1021–1038. DOI: 10.2174/1570159X17666190617095844.

Coker, Timothy J.; Dierfeldt, Daniel M. (2016): Acute Bacterial Prostatitis: Diagnosis and Management. In: *American family physician* 93 (2), S. 114–120.

Condorelli, R. A.; Russo, G. Ivan; Calogero, A. E.; Morgia, G.; La Vignera, S. (2017): Chronic prostatitis and its detrimental impact on sperm parameters: a systematic review and meta-analysis. In: *Journal of endocrinological investigation* 40 (11), S. 1209–1218. DOI: 10.1007/s40618-017-0684-0.

Cunden, Lisa S.; Gaillard, Aleth; Nolan, Elizabeth M. (2016): Calcium Ions Tune the Zinc-Sequestering Properties and Antimicrobial Activity of Human S100A12. In: *Chemical science* 7 (2), S. 1338–1348. DOI: 10.1039/c5sc03655k.

Desireddi, Naresh V.; Campbell, Phillip L.; Stern, Jeffrey A.; Sobkoviak, Rudina; Chuai, Shannon; Shahrara, Shiva et al. (2008): Monocyte chemoattractant protein-1 and macrophage inflammatory protein-1alpha as possible biomarkers for the chronic pelvic pain syndrome. In: *The Journal of urology* 179 (5), 1857-1862. DOI: 10.1016/j.juro.2008.01.028.

Dong, Hanbing; Zhang, Yue; Huang, Yu; Deng, Hui (2022): Pathophysiology of RAGE in inflammatory diseases. In: *Frontiers in immunology* 13, Artikel 931473. DOI: 10.3389/fimmu.2022.931473.

Du, He-Xi; Chen, Xian-Guo; Zhang, Li; Liu, Yi; Zhan, Chang-Sheng; Chen, Jing et al. (2019): Microglial activation and neurobiological alterations in experimental autoimmune prostatitis-induced depressive-like behavior in mice. In: *Neuropsychiatric disease and treatment* 15, S. 2231–2245. DOI: 10.2147/NDT.S211288.

Fair, W. R.; Cordonnier, J. J. (1978): The pH of prostatic fluid: a reappraisal and therapeutic implications. In: *The Journal of urology* 120 (6), S. 695–698. DOI: 10.1016/s0022-5347(17)57333-4.

Fila, Michal; Sobczuk, Anna; Pawlowska, Elzbieta; Blasiak, Janusz (2022): Epigenetic Connection of the Calcitonin Gene-Related Peptide and Its Potential in Migraine. In:

International journal of molecular sciences 23 (11), Artikel 6151. DOI: 10.3390/ijms23116151.

Fiorucci, Stefano; Distrutti, Eleonora (2002): Role of PAR2 in pain and inflammation. In: *Trends in pharmacological sciences* 23 (4), S. 153–155. DOI: 10.1016/S0165-6147(00)01932-5.

Foell, D.; Kane, D.; Bresnihan, B.; Vogl, T.; Nacken, W.; Sorg, C. et al. (2003a): Expression of the pro-inflammatory protein S100A12 (EN-RAGE) in rheumatoid and psoriatic arthritis. In: *Rheumatology (Oxford, England)* 42 (11), S. 1383–1389. DOI: 10.1093/rheumatology/keg385.

Foell, D.; Kucharzik, T.; Kraft, M.; Vogl, T.; Sorg, C.; Domschke, W.; Roth, J. (2003b): Neutrophil derived human S100A12 (EN-RAGE) is strongly expressed during chronic active inflammatory bowel disease. In: *Gut* 52 (6), S. 847–853. DOI: 10.1136/gut.52.6.847.

Frungieri, M. B.; Calandra, R. S.; Bartke, A.; Matzkin, M. E. (2018): Ageing and inflammation in the male reproductive tract. In: *Andrologia* 50 (11), e13034. DOI: 10.1111/and.13034.

Fu, Weihua; Zhou, Zhansong; Liu, Shijian; Li, Qianwei; Yao, Jiwei; Li, Weibing; Yan, Junan (2014): The effect of chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome (CP/CPPS) on semen parameters in human males: a systematic review and meta-analysis. In: *PloS one* 9 (4), e94991. DOI: 10.1371/journal.pone.0094991.

Ganapathi, S. K.; Beggs, A. D.; Hodgson, S. V.; Kumar, D. (2014): Expression and DNA methylation of TNF, IFNG and FOXP3 in colorectal cancer and their prognostic significance. In: *British journal of cancer* 111 (8), S. 1581–1589. DOI: 10.1038/bjc.2014.477.

Geppetti, P.; Del Bianco, E.; Patacchini, R.; Santicioli, P.; Maggi, C. A.; Tramontana, M. (1991): Low pH-induced release of calcitonin gene-related peptide from capsaicin-sensitive sensory nerves: mechanism of action and biological response. In: *Neuroscience* 41 (1), S. 295–301. DOI: 10.1016/0306-4522(91)90218-d.

Gouin, Olivier; L'Herondelle, Killian; Lebonvallet, Nicolas; Le Gall-Ianotto, Christelle; Sakka, Mehdi; Buhé, Virginie et al. (2017): TRPV1 and TRPA1 in cutaneous neurogenic and chronic inflammation: pro-inflammatory response induced by their activation and their sensitization. In: *Protein & cell* 8 (9), S. 644–661. DOI: 10.1007/s13238-017-0395-5.

Guo, Yi; Li, Jinli; Hao, Fengdan; Yang, Yang; Yang, Hao; Chang, Qirong et al. (2022): A new perspective on semen quality of aged male: The characteristics of metabolomics and proteomics. In: *Frontiers in endocrinology* 13, Artikel 1058250. DOI: 10.3389/fendo.2022.1058250.

Herbert, M. K.; Holzer, P. (2002): Die neurogene Entzündung. II. Pathophysiologie und klinische Implikationen. In: *Anesthesiologie, Intensivmedizin, Notfallmedizin, Schmerztherapie : AINS* 37 (7), S. 386–394. DOI: 10.1055/s-2002-32701.

Homonnai, Z. T.; Fainman, N.; David, M. P.; Paz, G. F. (1982): Semen quality and sex hormone pattern of 29 middle aged men. In: *Andrologia* 14 (2), S. 164–170. DOI: 10.1111/j.1439-0272.1982.tb03119.x.

Jang, Yongwoo; Kim, Minseok; Hwang, Sun Wook (2020): Molecular mechanisms underlying the actions of arachidonic acid-derived prostaglandins on peripheral

nociception. In: *Journal of neuroinflammation* 17 (1), S. 30. DOI: 10.1186/s12974-020-1703-1.

Jen, P. Y.; Dixon, J. S. (1995): Development of peptide-containing nerves in the human fetal prostate gland. In: *Journal of Anatomy* 187 (Pt 1), S. 169–179.

Kallinich, Tilmann; Wittkowski, Helmut; Keitzer, Rolf; Roth, Johannes; Foell, Dirk (2010): Neutrophil-derived S100A12 as novel biomarker of inflammation in familial Mediterranean fever. In: *Annals of the rheumatic diseases* 69 (4), S. 677–682. DOI: 10.1136/ard.2009.114363.

Kavanagh, J. P.; Darby, C.; Costello, C. B.; Chowdhury, S. D. (1983): Zinc in post prostatic massage (VB3) urine samples: a marker of prostatic secretory function and indicator of bacterial infection. In: *Urological research* 11 (4), S. 167–170. DOI: 10.1007/BF00256365.

Khadra, Abbas; Fletcher, Patricia; Luzzi, Graz; Shattock, Robin; Hay, Phillip (2006): Interleukin-8 levels in seminal plasma in chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome and nonspecific urethritis. In: *BJU international* 97 (5), S. 1043–1046. DOI: 10.1111/j.1464-410X.2006.06133.x.

Khan, Farhan Ullah; Ihsan, Awais Ullah; Khan, Hidayat Ullah; Jana, Ruby; Wazir, Junaid; Khongorzul, Puregmaa et al. (2017): Comprehensive overview of prostatitis. In: *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie* 94, S. 1064–1076. DOI: 10.1016/j.biopha.2017.08.016.

Kidd, S. A.; Eskenazi, B.; Wyrobek, A. J. (2001): Effects of male age on semen quality and fertility: a review of the literature. In: *Fertility and sterility* 75 (2), S. 237–248. DOI: 10.1016/s0015-0282(00)01679-4.

Kim, Joohee; Vaish, Vivek; Feng, Mingxiao; Field, Kevin; Chatzistamou, Ioulia; Shim, Minsub (2016): Transgenic expression of cyclooxygenase-2 (COX2) causes premature aging phenotypes in mice. In: *Aging* 8 (10), S. 2392–2406. DOI: 10.18632/aging.101060.

Krieger, John N.; Lee, Shaun Wen Huey; Jeon, Jeonseong; Cheah, Phaik Yeong; Liong, Men Long; Riley, Donald E. (2008): Epidemiology of prostatitis. In: *International journal of antimicrobial agents* 31 Suppl 1, S85-90. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2007.08.028.

Leung, Lawrence; Cahill, Catherine M. (2010): TNF-alpha and neuropathic pain--a review. In: *Journal of neuroinflammation* 7, S. 27. DOI: 10.1186/1742-2094-7-27.

Li, Wen-jing; Wang, Teng-ke (2006): Calcitonin gene-related peptide inhibits interleukin-1beta-induced interleukin-8 secretion in human type II alveolar epithelial cells. In: *Acta pharmacologica Sinica* 27 (10), S. 1340–1345. DOI: 10.1111/j.1745-7254.2006.00408.x.

Li, Xia; Li, Chentao; Zhang, Wanying; Wang, Yanan; Qian, Pengxu; Huang, He (2023): Inflammation and aging: signaling pathways and intervention therapies. In: *Signal transduction and targeted therapy* 8 (1), S. 239. DOI: 10.1038/s41392-023-01502-8.

Linscheid, Philippe; Seboek, Dalma; Schaer, Dominik J.; Zulewski, Henryk; Keller, Ulrich; Müller, Beat (2004): Expression and secretion of procalcitonin and calcitonin gene-related peptide by adherent monocytes and by macrophage-activated adipocytes. In: *Critical care medicine* 32 (8), S. 1715–1721. DOI: 10.1097/01.ccm.0000134404.63292.71.

Litwin MS; McNaughton-Collins M; Fowler FJ Jr; Nickel JC; Calhoun EA; Pontari MA et al. (1999): The National Institutes of Health chronic prostatitis symptom index: development and validation of a new outcome measure. In: *The Journal of urology* 162 (2), S. 369–375. DOI: 10.1016/s0022-5347(05)68562-x.

Ludwig, M.; Kümmel, C.; Schroeder-Printzen, I.; Ringert, R. H.; Weidner, W. (1998): Evaluation of seminal plasma parameters in patients with chronic prostatitis or leukocytospermia. In: *Andrologia* 30 Suppl 1, S. 41–47. DOI: 10.1111/j.1439-0272.1998.tb02825.x.

Luostarinen, Samu; Hämäläinen, Mari; Moilanen, Eeva (2021): Transient Receptor Potential Ankyrin 1 (TRPA1)-An Inflammation-Induced Factor in Human HaCaT Keratinocytes. In: *International journal of molecular sciences* 22 (7). DOI: 10.3390/ijms22073322.

Magistro, Giuseppe; Wagenlehner, Florian M. E.; Grabe, Magnus; Weidner, Wolfgang; Stief, Christian G.; Nickel, J. Curtis (2016): Contemporary Management of Chronic Prostatitis/Chronic Pelvic Pain Syndrome. In: *European urology* 69 (2), S. 286–297. DOI: 10.1016/j.eururo.2015.08.061.

Magri, Vittorio; Boltri, Matteo; Cai, Tommaso; Colombo, Roberto; Cuzzocrea, Salvatore; Visschere, Pieter de et al. (2019): Multidisciplinary approach to prostatitis. In: *Archivio italiano di urologia, andrologia : organo ufficiale [di] Societa italiana di ecografia urologica e nefrologica* 90 (4), S. 227–248. DOI: 10.4081/aiua.2018.4.227.

Magri, Vittorio; Marras, Emanuela; Restelli, Antonella; Wagenlehner, Florian M. E.; Perletti, Gianpaolo (2015): Multimodal therapy for category III chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome in UPOINTS phenotyped patients. In: *Experimental and therapeutic medicine* 9 (3), S. 658–666. DOI: 10.3892/etm.2014.2152.

Mahmoud, A. M.; Geslevich, J.; Kint, J.; Depuydt, C.; Huysse, L.; Zalata, A.; Comhaire, F. H. (1998): Seminal plasma alpha-glucosidase activity and male infertility. In: *Human reproduction (Oxford, England)* 13 (3), S. 591–595. DOI: 10.1093/humrep/13.3.591.

Mailhot, Benoit; Christin, Marine; Tessandier, Nicolas; Sotoudeh, Chaudy; Bretheau, Floriane; Turmel, Roxanne et al. (2020): Neuronal interleukin-1 receptors mediate pain in chronic inflammatory diseases. In: *The Journal of experimental medicine* 217 (9). DOI: 10.1084/jem.20191430.

Mallidis, Con; Agbaje, Ishola; Rogers, Deirdre; Glenn, Josephine; McCullough, Stephen; Atkinson, A. Brew et al. (2007): Distribution of the receptor for advanced glycation end products in the human male reproductive tract: prevalence in men with diabetes mellitus. In: *Human reproduction (Oxford, England)* 22 (8), S. 2169–2177. DOI: 10.1093/humrep/dem156.

Martínez, Diego; Vermeulen, Mónica; Trevani, Analía; Ceballos, Ana; Sabatté, Juan; Gamberale, Romina et al. (2006): Extracellular acidosis induces neutrophil activation by a mechanism dependent on activation of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and ERK pathways. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 176 (2), S. 1163–1171. DOI: 10.4049/jimmunol.176.2.1163.

Mazzone, Stuart B.; Yang, Seung-Kwon; Keller, Jennifer A.; Simanauskaite, Juste; Arikatt, Jaisy; Fogarty, Matthew J. et al. (2021): Modulation of Vagal Sensory Neurons via High Mobility Group Box-1 and Receptor for Advanced Glycation End Products: Implications for Respiratory Viral Infections. In: *Frontiers in physiology* 12, Artikel 744812. DOI: 10.3389/fphys.2021.744812.

- McNaughton Collins, M.; Pontari, M. A.; O'Leary, M. P.; Calhoun, E. A.; Santanna, J.; Landis, J. R. et al. (2001): Quality of life is impaired in men with chronic prostatitis: the Chronic Prostatitis Collaborative Research Network. In: *Journal of general internal medicine* 16 (10), S. 656–662. DOI: 10.1111/j.1525-1497.2001.01223.x.
- Meijer, B.; Gearry, R. B.; Day, A. S. (2012): The role of S100A12 as a systemic marker of inflammation. In: *International journal of inflammation* 2012, Artikel 907078. DOI: 10.1155/2012/907078.
- Miller, Lauri J.; Fischer, Kateri A.; Goralnick, Sandra J.; Litt, Mark; Burleson, Joseph A.; Albertsen, Peter; Kreutzer, Donald L. (2002): Nerve growth factor and chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome. In: *Urology* 59 (4), S. 603–608. DOI: 10.1016/s0090-4295(01)01597-7.
- Moroz, Olga V.; Burkitt, Will; Wittkowski, Helmut; He, Wei; Ianoul, Anatoli; Novitskaya, Vera et al. (2009): Both Ca²⁺ and Zn²⁺ are essential for S100A12 protein oligomerization and function. In: *BMC biochemistry* 10, S. 11. DOI: 10.1186/1471-2091-10-11.
- Motrich, Ruben D.; Maccioni, Mariana; Ponce, Andres A.; Gatti, Gerardo A.; Oberti, Juan P. Mackern; Rivero, Virginia E. (2006): Pathogenic consequences in semen quality of an autoimmune response against the prostate gland: from animal models to human disease. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 177 (2), S. 957–967. DOI: 10.4049/jimmunol.177.2.957.
- Motrich, Ruben D.; Salazar, Florencia C.; Breser, Maria L.; Mackern-Oberti, Juan P.; Godoy, Gloria J.; Olivera, Carolina et al. (2018): Implications of prostate inflammation on male fertility. In: *Andrologia* 50 (11), e13093. DOI: 10.1111/and.13093.
- Nadler, R. B.; Koch, A. E.; Calhoun, E. A.; Campbell, P. L.; Pruden, D. L.; Bennett, C. L. et al. (2000): IL-1beta and TNF-alpha in prostatic secretions are indicators in the evaluation of men with chronic prostatitis. In: *The Journal of urology* 164 (1), S. 214–218.
- Nickel, J. Curtis; Shoskes, Daniel; Wang, Yanlin; Alexander, Richard B.; Fowler, Jackson E.; Zeitlin, Scott et al. (2006): How Does the Pre-Massage and Post-Massage 2-Glass Test Compare to the Meares-Stamey 4-Glass Test in Men With Chronic Prostatitis/Chronic Pelvic Pain Syndrome? In: *The Journal of urology* 176 (1), S. 119–124. DOI: 10.1016/S0022-5347(06)00498-8.
- Nickel, J. Curtis; Stephens, Alisa; Landis, J. Richard; Chen, Jun; Mullins, Chris; van Bokhoven, Adrie et al. (2015): Search for Microorganisms in Men with Urologic Chronic Pelvic Pain Syndrome: A Culture-Independent Analysis in the MAPP Research Network. In: *The Journal of urology* 194 (1), S. 127–135. DOI: 10.1016/j.juro.2015.01.037.
- Oesterle, Adam; Bowman, Marion A. Hofmann (2015): S100A12 and the S100/Calgranulins: Emerging Biomarkers for Atherosclerosis and Possibly Therapeutic Targets. In: *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 35 (12), S. 2496–2507. DOI: 10.1161/ATVBAHA.115.302072.
- Orhan, I.; Onur, R.; Ilhan, N.; Ardiçoglu, A. (2001): Seminal plasma cytokine levels in the diagnosis of chronic pelvic pain syndrome. In: *International journal of urology : official journal of the Japanese Urological Association* 8 (9), S. 495–499. DOI: 10.1046/j.1442-2042.2001.00358.x.

- Ottosson, A.; Edvinsson, L. (1997): Release of histamine from dural mast cells by substance P and calcitonin gene-related peptide. In: *Cephalalgia : an international journal of headache* 17 (3), S. 166–174. DOI: 10.1046/j.1468-2982.1997.1703166.x.
- Park, C. K.; Bae, J. H.; Kim, H. Y.; Jo, H. J.; Kim, Y. H.; Jung, S. J. et al. (2010): Substance P sensitizes P2X3 in nociceptive trigeminal neurons. In: *Journal of dental research* 89 (10), S. 1154–1159. DOI: 10.1177/0022034510377094.
- Pirkebner, Daniela; Fuetsch, Michaela; Wittmann, Walter; Weiss, Helmut; Haller, Thomas; Schramek, Herbert et al. (2004): Reduction of intracellular pH inhibits constitutive expression of cyclooxygenase-2 in human colon cancer cells. In: *Journal of cellular physiology* 198 (2), S. 295–301. DOI: 10.1002/jcp.10408.
- Pontari, Michel A.; McNAUGHTON-COLLINS, MARY; O'LEARY, MICHAEL P.; Calhoun, Elizabeth A.; Jang, Thomas; Kusek, John W. et al. (2005): A case-control study of risk factors in men with chronic pelvic pain syndrome. In: *BJU international* 96 (4), S. 559–565. DOI: 10.1111/j.1464-410X.2005.05684.x.
- Provenzi, Livio; Fumagalli, Monica; Di Scotto Minico, Giunia; Giorda, Roberto; Morandi, Francesco; Sirgiovanni, Ida et al. (2020): Pain-related increase in serotonin transporter gene methylation associates with emotional regulation in 4.5-year-old preterm-born children. In: *Acta paediatrica (Oslo, Norway : 1992)* 109 (6), S. 1166–1174. DOI: 10.1111/apa.15077.
- Quick, Marsha L.; Mukherjee, Soumi; Rudick, Charles N.; Done, Joseph D.; Schaeffer, Anthony J.; Thumbikat, Praveen (2012): CCL2 and CCL3 are essential mediators of pelvic pain in experimental autoimmune prostatitis. In: *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* 303 (6), 580-589. DOI: 10.1152/ajpregu.00240.2012.
- Raddant, Ann C.; Russo, Andrew F. (2011): Calcitonin gene-related peptide in migraine: intersection of peripheral inflammation and central modulation. In: *Expert reviews in molecular medicine* 13, e36. DOI: 10.1017/S1462399411002067.
- Rahimi, Kaveh; Riyahi, Moslem; Sajedianfard, Javad; Nazifi, Saeed (2023): Effects of intracerebroventricular administration of calcitonin gene-related peptide (CGRP) on sex hormones and sperm quality in rats. In: *Annals of medicine and surgery (2012)* 85 (11), S. 5454–5458. DOI: 10.1097/MS9.0000000000001252.
- Ravina, C. G.; Seda, M.; Pinto, F. M.; Orea, A.; Fernández-Sánchez, M.; Pintado, C. O.; Candenás, M. Luz (2007): A role for tachykinins in the regulation of human sperm motility. In: *Human reproduction (Oxford, England)* 22 (6), S. 1617–1625. DOI: 10.1093/humrep/dem069.
- Rees, Jon; Abrahams, Mark; Doble, Andrew; Cooper, Alison (2015): Diagnosis and treatment of chronic bacterial prostatitis and chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome: a consensus guideline. In: *BJU international* 116 (4), S. 509–525. DOI: 10.1111/bju.13101.
- Rudick, Charles N.; Schaeffer, Anthony J.; Thumbikat, Praveen (2008): Experimental autoimmune prostatitis induces chronic pelvic pain. In: *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* 294 (4), 1268-1275. DOI: 10.1152/ajpregu.00836.2007.
- Russell, F. A.; King, R.; Smillie, S-J; Kodji, X.; Brain, S. D. (2014): Calcitonin gene-related peptide: physiology and pathophysiology. In: *Physiological reviews* 94 (4), S. 1099–1142. DOI: 10.1152/physrev.00034.2013.

Safieh-Garabedian, B.; Poole, S.; Allchorne, A.; Kanaan, S.; Saade, N.; Woolf, C. J. (1996): Zinc reduces the hyperalgesia and upregulation of NGF and IL-1 beta produced by peripheral inflammation in the rat. In: *Neuropharmacology* 35 (5), S. 599–603. DOI: 10.1016/0028-3908(96)84630-2.

Sanchez Freire, Veronica; Burkhard, Fiona C.; Kessler, Thomas M.; Kuhn, Annette; Draeger, Annette; Monastyrskaya, Katia (2010): MicroRNAs may mediate the down-regulation of neurokinin-1 receptor in chronic bladder pain syndrome. In: *The American journal of pathology* 176 (1), S. 288–303. DOI: 10.2353/ajpath.2010.090552.

Schaller, Teilo H.; Batich, Kristen A.; Suryadevara, Carter M.; Desai, Rupen; Sampson, John H. (2017): Chemokines as adjuvants for immunotherapy: implications for immune activation with CCL3. In: *Expert review of clinical immunology* 13 (11), S. 1049–1060. DOI: 10.1080/1744666X.2017.1384313.

Schneider, Henning; Wilbrandt, Kersten; Ludwig, Martin; Beutel, Manfred; Weidner, Wolfgang (2005): Prostate-related pain in patients with chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome. In: *BJU international* 95 (2), S. 238–243. DOI: 10.1111/j.1464-410X.2005.05373.x.

Schou, Wendy Sophie; Ashina, Sait; Amin, Faisal Mohammad; Goadsby, Peter J.; Ashina, Messoud (2017): Calcitonin gene-related peptide and pain: a systematic review. In: *The journal of headache and pain* 18 (1), S. 34. DOI: 10.1186/s10194-017-0741-2.

Schwartz, Erica S.; La, Jun-Ho; Young, Erin E.; Feng, Bin; Joyce, Sonali; Gebhart, G. F. (2016): Chronic Prostatitis Induces Bladder Hypersensitivity and Sensitizes Bladder Afferents in the Mouse. In: *The Journal of urology* 196 (3), S. 892–901. DOI: 10.1016/j.juro.2016.03.077.

Schwartz, Erica S.; Xie, Amy; La, Jun-Ho; Gebhart, G. F. (2015): Nociceptive and inflammatory mediator upregulation in a mouse model of chronic prostatitis. In: *Pain* 156 (8), S. 1537–1544. DOI: 10.1097/j.pain.0000000000000201.

Shi, Cui-Ge; Lin, Kai; Xu, Xiang-Bo; Zhang, Shu-Cheng; Wang, Ning; Fan, Ming (2012): Evidence for the involvement of NGF in human sperm motility. In: *JBiSE* 05 (09), S. 534–541. DOI: 10.4236/jbise.2012.59066.

Shoskes, Aaron C.; Tran-Nguyen, Dominic; Shoskes, Daniel (2018): Treatment of chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome – UPOINT. In: *Urogenital Infections and Inflammations. GMS Publishing House*. DOI: 10.5680/LHUII000013.

Shoskes, Daniel A.; Keslar, Karen S.; Gotwald, Paige; Berglund, Ryan; Vij, Sarah (2021): Neuroinflammatory gene expression in chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome patients: insights into etiology and phenotype biology. In: *Translational andrology and urology* 10 (8), S. 3340–3347. DOI: 10.21037/tau-21-387.

Sørensen, M. B.; Bergdahl, I. A.; Hjøllund, N. H.; Bonde, J. P.; Stoltenberg, M.; Ernst, E. (1999): Zinc, magnesium and calcium in human seminal fluid: relations to other semen parameters and fertility. In: *Molecular human reproduction* 5 (4), S. 331–337. DOI: 10.1093/molehr/5.4.331.

Spekker, Eleonóra; Tanaka, Masaru; Szabó, Ágnes; Vécsei, László (2021): Neurogenic Inflammation: The Participant in Migraine and Recent Advancements in Translational Research. In: *Biomedicines* 10 (1). DOI: 10.3390/biomedicines10010076.

- Surace, Anna Elisa Andrea; Hedrich, Christian M. (2019): The Role of Epigenetics in Autoimmune/Inflammatory Disease. In: *Frontiers in immunology* 10, S. 1525. DOI: 10.3389/fimmu.2019.01525.
- Suvas, Susmit (2017): Role of Substance P Neuropeptide in Inflammation, Wound Healing, and Tissue Homeostasis. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 199 (5), S. 1543–1552. DOI: 10.4049/jimmunol.1601751.
- Tardif, Mélanie R.; Chapeton-Montes, Julie Andrea; Posvanzic, Alma; Pagé, Nathalie; Gilbert, Caroline; Tessier, Philippe A. (2015): Secretion of S100A8, S100A9, and S100A12 by Neutrophils Involves Reactive Oxygen Species and Potassium Efflux. In: *Journal of immunology research* 2015, Artikel 296149. DOI: 10.1155/2015/296149.
- Tran, M. T.; Ritchie, M. H.; Lausch, R. N.; Oakes, J. E. (2000): Calcitonin gene-related peptide induces IL-8 synthesis in human corneal epithelial cells. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 164 (8), S. 4307–4312. DOI: 10.4049/jimmunol.164.8.4307.
- Velho, Renata Voltolini; Taube, Eliane; Sehouli, Jalid; Mechsner, Sylvia (2021): Neurogenic Inflammation in the Context of Endometriosis-What Do We Know? In: *International journal of molecular sciences* 22 (23). DOI: 10.3390/ijms222313102.
- Wagenlehner, Florian M. E.; Naber, Kurt G.; Bschleipfer, Thomas; Brähler, Elmar; Weidner, Wolfgang (2009): Prostatitis and male pelvic pain syndrome: diagnosis and treatment. In: *Deutsches Arzteblatt international* 106 (11), S. 175–183. DOI: 10.3238/arztebl.2009.0175.
- Wagenlehner, Florian M. E.; Pilatz, Adrian; Bschleipfer, Thomas; Diemer, Thorsten; Linn, Thomas; Meinhardt, Andreas et al. (2013a): Bacterial prostatitis. In: *World journal of urology* 31 (4), S. 711–716. DOI: 10.1007/s00345-013-1055-x.
- Wagenlehner, Florian M. E.; van Till, J. W. Olivier; Magri, Vittorio; Perletti, Gianpaolo; Houbiers, Jos G. A.; Weidner, Wolfgang; Nickel, J. Curtis (2013b): National Institutes of Health Chronic Prostatitis Symptom Index (NIH-CPSI) symptom evaluation in multinational cohorts of patients with chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome. In: *European urology* 63 (5), S. 953–959. DOI: 10.1016/j.eururo.2012.10.042.
- Walsh, David A.; Mapp, Paul I.; Kelly, Sara (2015): Calcitonin gene-related peptide in the joint: contributions to pain and inflammation. In: *British journal of clinical pharmacology* 80 (5), S. 965–978. DOI: 10.1111/bcp.12669.
- Wang, Hongcheng; Xing, Liyu; Li, Wenjing; Hou, Lingfei; Guo, Jingxuan; Wang, Xian (2002): Production and secretion of calcitonin gene-related peptide from human lymphocytes. In: *Journal of Neuroimmunology* 130 (1-2), S. 155–162. DOI: 10.1016/s0165-5728(02)00221-7.
- Wang, Qian; Aleshintsev, Aleksey; Jose, Aneesha N.; Aramini, James M.; Gupta, Rupal (2020): Calcium Regulates S100A12 Zinc Sequestration by Limiting Structural Variations. In: *ChemBiochem : a European journal of chemical biology* 21 (9), S. 1372–1382. DOI: 10.1002/cbic.201900623.
- Wang, Qiao-Na; Yan, Yan-Zhe; Zhang, Xiao-Zhen; Lv, Jia-Xin; Nie, He-Peng; Wu, Jin et al. (2022): Rescuing effects of periostin in advanced glycation end-products (AGEs) caused osteogenic and oxidative damage through AGE receptor mediation and DNA methylation of the CALCA promoter. In: *Chemico-biological interactions* 354, Artikel 109835. DOI: 10.1016/j.cbi.2022.109835.

- Wang, Xuan; Li, Qian; Han, Xu; Gong, Meirong; Yu, Zhi; Xu, Bin (2021): Electroacupuncture Alleviates Diabetic Peripheral Neuropathy by Regulating Glycolipid-Related GLO/AGEs/RAGE Axis. In: *Frontiers in endocrinology* 12, Artikel 655591. DOI: 10.3389/fendo.2021.655591.
- Warrington, Jessica Isabel; Richards, Gareth Owain; Wang, Ning (2017): The Role of the Calcitonin Peptide Family in Prostate Cancer and Bone Metastasis. In: *Current molecular biology reports* 3 (3), S. 197–203. DOI: 10.1007/s40610-017-0071-9.
- Watanabe, Toyohiko; Inoue, Miayabi; Sasaki, Katsumi; Araki, Motoo; Uehara, Shinya; Monden, Koichi et al. (2011): Nerve growth factor level in the prostatic fluid of patients with chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome is correlated with symptom severity and response to treatment. In: *BJU international* 108 (2), S. 248–251. DOI: 10.1111/j.1464-410X.2010.09716.x.
- White, Fletcher A.; Jung, Hosung; Miller, Richard J. (2007): Chemokines and the pathophysiology of neuropathic pain. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (51), S. 20151–20158. DOI: 10.1073/pnas.0709250104.
- Wittkowski, Helmut; Hirono, Keiichi; Ichida, Fukiko; Vogl, Thomas; Ye, Fei; Yanlin, Xing et al. (2007): Acute Kawasaki disease is associated with reverse regulation of soluble receptor for advanced glycation end products and its proinflammatory ligand S100A12. In: *Arthritis and rheumatism* 56 (12), S. 4174–4181. DOI: 10.1002/art.23042.
- Wong, W. Y.; Flik, G.; Groenen, P. M.; Swinkels, D. W.; Thomas, C. M.; Copius-Peereboom, J. H. et al. (2001): The impact of calcium, magnesium, zinc, and copper in blood and seminal plasma on semen parameters in men. In: *Reproductive toxicology (Elmsford, N.Y.)* 15 (2), S. 131–136. DOI: 10.1016/S0890-6238(01)00113-7.
- Xie, Jingjing; Burz, David S.; He, Wei; Bronstein, Igor B.; Lednev, Igor; Shekhtman, Alexander (2007): Hexameric calgranulin C (S100A12) binds to the receptor for advanced glycation end products (RAGE) using symmetric hydrophobic target-binding patches. In: *The Journal of biological chemistry* 282 (6), S. 4218–4231. DOI: 10.1074/jbc.M608888200.
- Yamamoto, Yasuhiko; Harashima, Ai; Saito, Hidehito; Tsuneyama, Koichi; Munesue, Seiichi; Motoyoshi, So et al. (2011): Septic shock is associated with receptor for advanced glycation end products ligation of LPS. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 186 (5), S. 3248–3257. DOI: 10.4049/jimmunol.1002253.
- Yuan, Zhi; Liu, Xiaoli; Deng, Wentao; Lai, Xiaodong; Yan, Zaichun; Zheng, Ruqiang (2014): Correlation study of chronic nonbacterial prostatitis with the levels of COX-2 and PGE2 in prostatic secretion. In: *International urology and nephrology* 46 (10), S. 1871–1875. DOI: 10.1007/s11255-014-0743-9.
- Zhang, S.; Barros, S. P.; Niculescu, M. D.; Moretti, A. J.; Preisser, J. S.; Offenbacher, S. (2010): Alteration of PTGS2 promoter methylation in chronic periodontitis. In: *Journal of dental research* 89 (2), S. 133–137. DOI: 10.1177/0022034509356512.
- Zhao, Jiang; Dong, Xingyou; Hu, Xiaoyan; Long, Zhou; Wang, Liang; Liu, Qian et al. (2016): Zinc levels in seminal plasma and their correlation with male infertility: A systematic review and meta-analysis. In: *Scientific reports* 6, Artikel 22386. DOI: 10.1038/srep22386.

Anhang

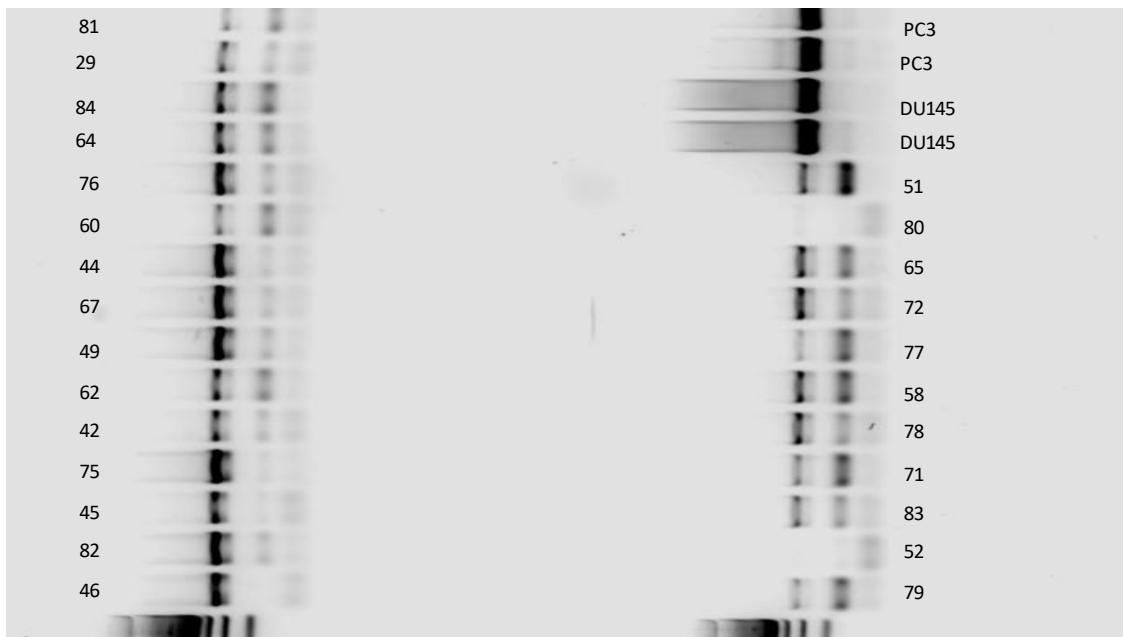


Figure 1 **Agarosegel-Elektrophorese der PCR-Produkte von *TNFα* im ExUr-Pellet.** In der Abbildung sind die PCR-Produkte von *TNFα* im Rahmen der COBRA für mehrere Proben auf ein Agarosegel aufgetragen. Für jede Probe wurden 5 μ l PCR-Produkt aufgetragen, um zu verifizieren, ob die PCR funktionierte. Im Fall von Probe 52 und 80 wurde die PCR als „fehlgeschlagen“ eingestuft. Bei PC3 und DU145 handelt es sich um Prostatakarzinom-Zelllinien, die wir als Positiv-Kontrollen verwendeten. Die Banden bei 223 bp repräsentieren das gewünschte PCR-Produkt, welches anschließend dem Verdau mit *Tail* zugeführt werden kann.

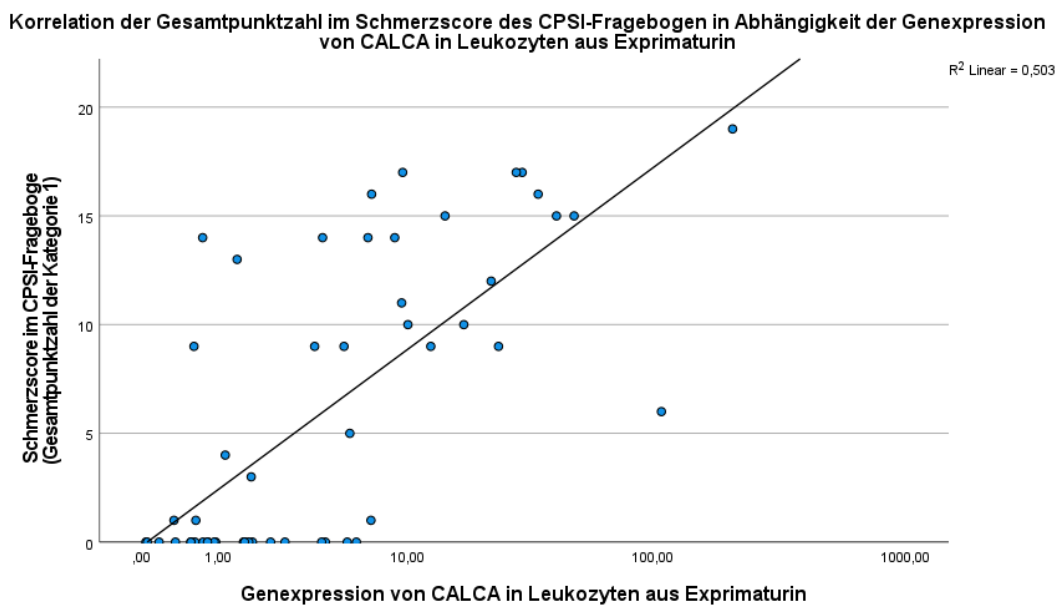


Figure 2 **Korrelation der Gesamtpunktzahl im Schmerzscore des CPSI-Fragebogens und der Genexpression von CALCA in Leukozyten aus ExUr.** Abgebildet sind sowohl CP/CPPS-Patienten als auch gesunde Kontrollpersonen (n=53). In der Korrelationsanalyse mittels Spearman-Rho besteht eine signifikante positive Korrelation ($p < 0.0001$; $\rho = ,696$).

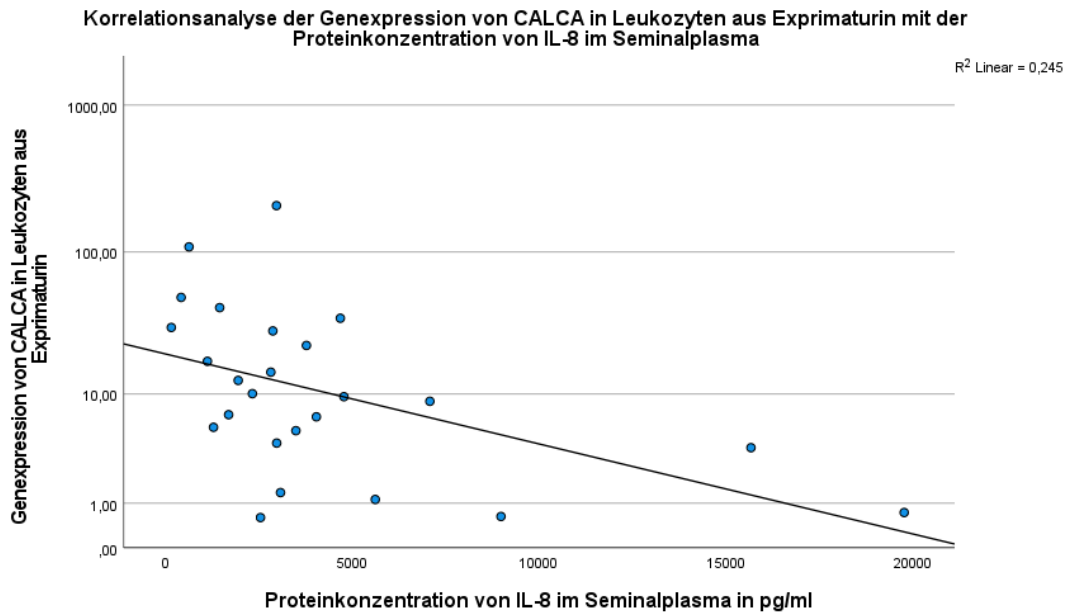


Figure 3 **Korrelationsanalyse der Proteinkonzentration von IL-8 im Seminalplasma in pg/ml mit der Genexpression von CALCA in Leukozyten aus ExUr.** Abgebildet ist lediglich die Kohorte der CP/CPPS-Patienten (n=25). In der Korrelationsanalyse mittels Spearman-Rho besteht eine signifikante negative Korrelation zwischen den beiden Variablen ($p < 0.005$; $\rho = -,555$).

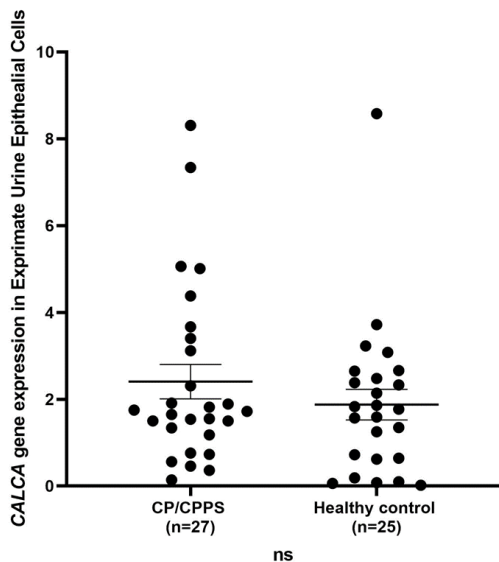


Figure 4 **Genexpression von CALCA in Epithelzellen aus ExUr.** In der Abbildung sind die Genexpressionen von CALCA in Epithelzellen aus ExUr für die Gruppe der CP/CPPS-Patienten gegenüber der gesunden Kontrollgruppe dargestellt. Untersucht wurden 27 Patienten und 25 gesunde Kontrollen. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen CP/CPPS-Patienten und der gesunden Kontrollgruppe ($p > 0,05$).

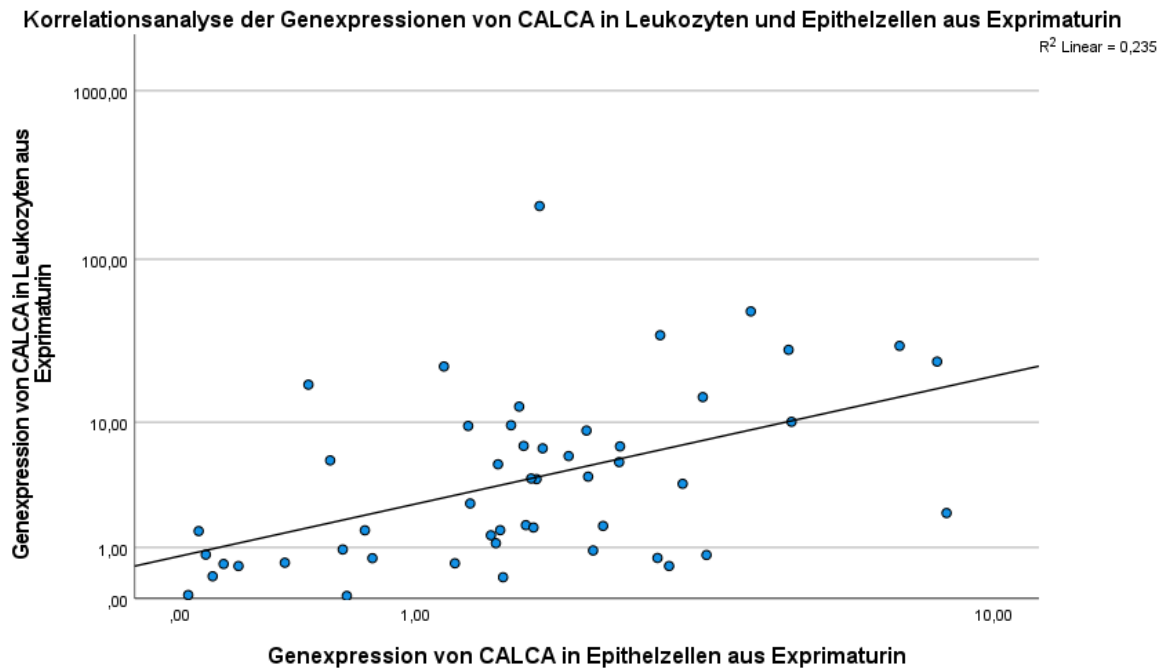


Figure 5 **Korrelationsanalyse der Genexpressionen von CALCA in Epithelzellen und Leukozyten aus ExUr.** Untersucht wurden sowohl CP/CPPS-Patienten als auch gesunde Kontrollpersonen (n=50). In der Korrelationsanalyse mittels Spearman-Rho zeigte sich eine signifikante positive Korrelation ($p < 0.0001$; $\rho = ,506$).

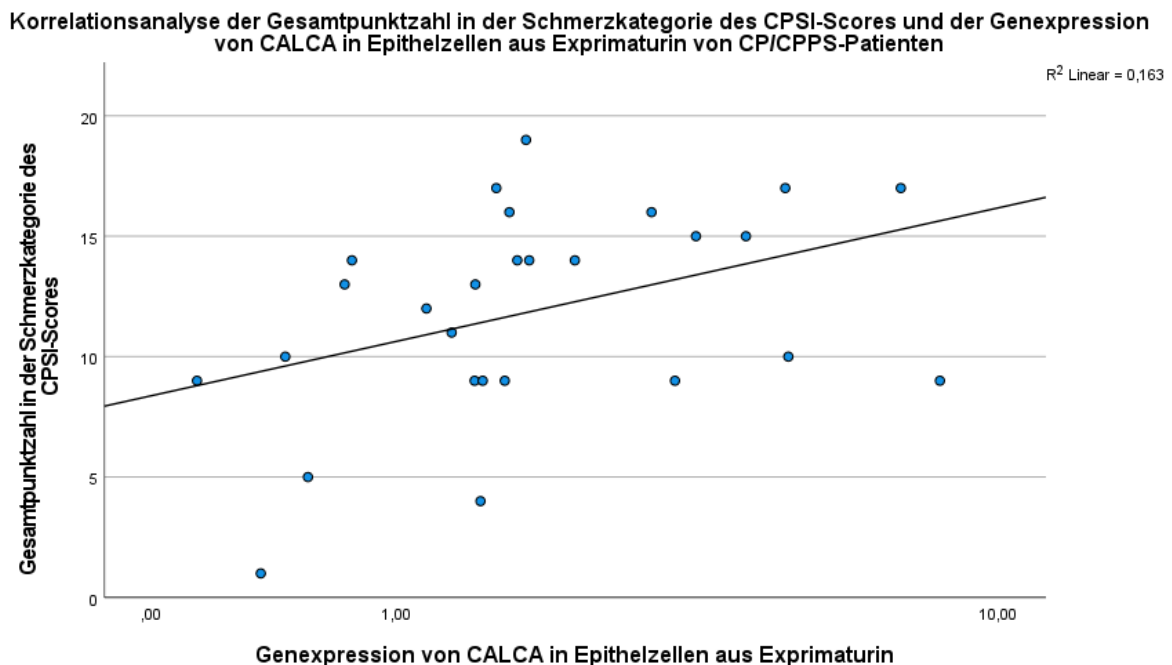


Figure 6 **Korrelationsanalyse der Gesamtpunktzahl in der Schmerzkatgorie des CPSI-Fragebogens und der Genexpression von CALCA in Epithelzellen aus ExUr.** Abgebildet sind nur CP/CPPS-Patienten (n=27). In der Korrelationsanalyse mittels Spearman-Rho besteht eine signifikante positive Korrelation zwischen den beiden Variablen ($p < 0.05$; $\rho = ,471$).

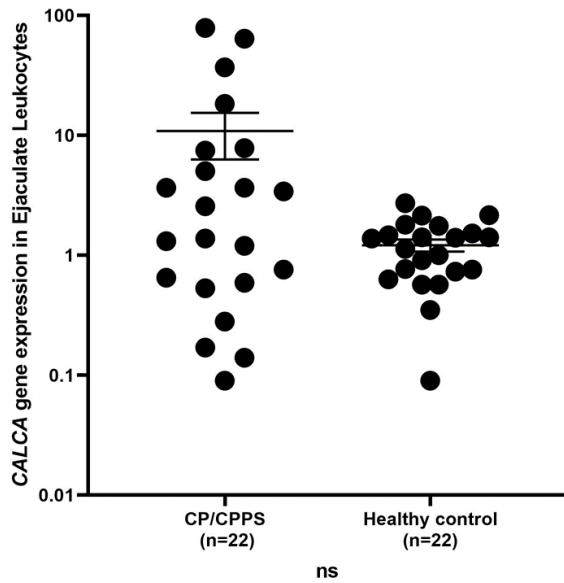


Figure 7 **Genexpression von CALCA in Leukozyten aus Ejakulat.** In der Abbildung sind die Genexpressionen von CALCA in Leukozyten aus Ejakulat für die Gruppe der CP/CPPS-Patienten gegenüber der gesunden Kontrollgruppe dargestellt. Untersucht wurden 22 Patienten und 22 gesunde Kontrollen. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Genexpression von CALCA zwischen CP/CPPS-Patienten und der Kontrollgruppe ($p > 0,05$).

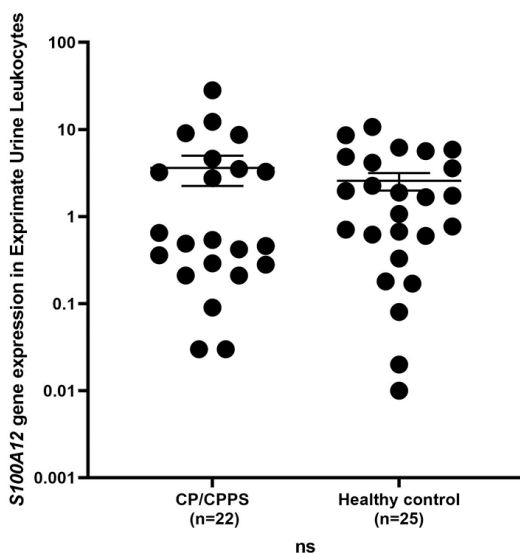


Figure 8 **Genexpression von S100A12 in Leukozyten aus ExUr.** In der Abbildung sind die Genexpressionen von S100A12 in Leukozyten aus ExUr für die Gruppe der CP/CPPS-Patienten gegenüber der gesunden Kontrollgruppe dargestellt. Untersucht wurden 22 Patienten und 25 gesunde Kontrollen. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied der Genexpression von S100A12 zwischen CP/CPPS-Patienten und der Kontrollgruppe ($p > 0,05$).

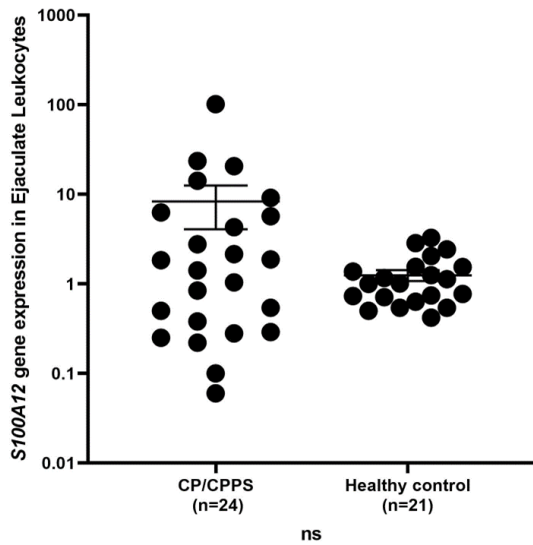


Figure 9 **Genexpression von S100A12 in Leukozyten aus Ejakulat.** In der Abbildung sind die Genexpressionen von S100A12 in Leukozyten aus Ejakulat für die Gruppe der CP/CPPS-Patienten gegenüber der gesunden Kontrollgruppe dargestellt. Untersucht wurden 24 Patienten und 21 Kontrollen. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied der Genexpression von S100A12 zwischen CP/CPPS-Patienten und Gesunden ($p > 0,05$).

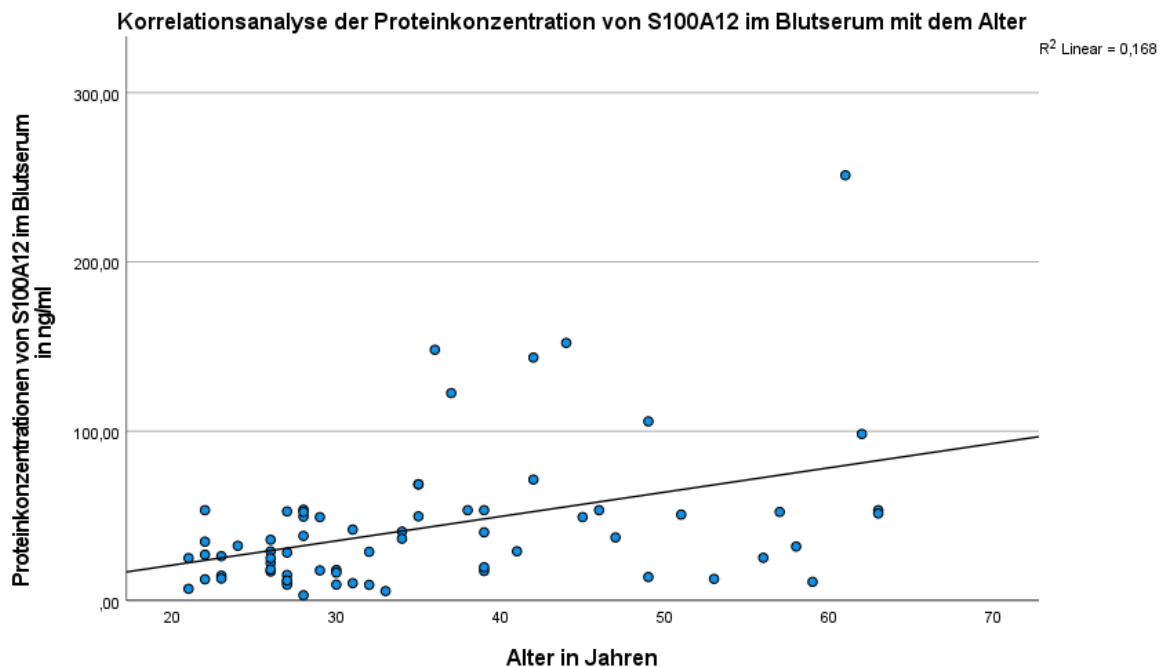


Figure 10 **Korrelationsanalyse der Proteinkonzentration von S100A12 im Blutserum und dem Alter.** Abgebildet sind sowohl CP/CPPS-Patienten als auch gesunde Kontrollpersonen ($n=68$). In der Korrelationsanalyse mittels Spearman-Rho besteht eine signifikante positive Korrelation zwischen den beiden Variablen ($p < 0.0001$; $\rho = ,417$).

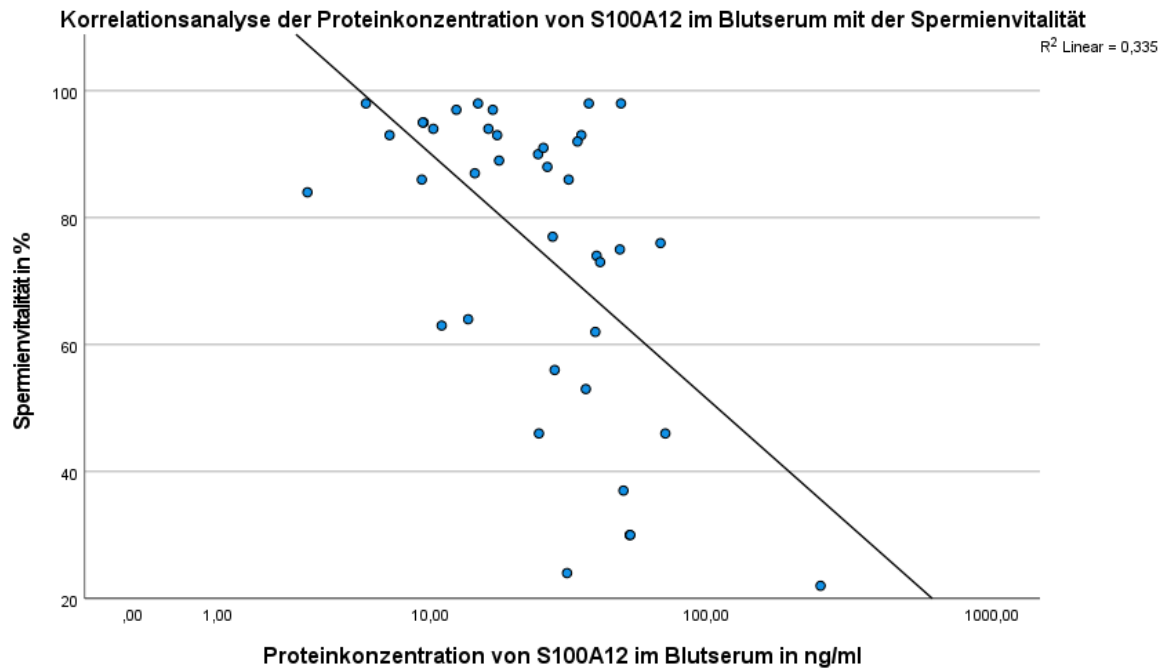


Figure 11 **Korrelationsanalyse der Proteinkonzentration von S100A12 im Blutserum und der Spermienvitalität im Ejakulat.** Abgebildet sind sowohl CP/CPPS-Patienten als auch gesunde Kontrollpersonen (n=39). In der Korrelationsanalyse mittels Spearman-Rho besteht eine signifikante negative Korrelation zwischen den beiden Variablen ($p < 0.0001$; $\rho = -,522$).

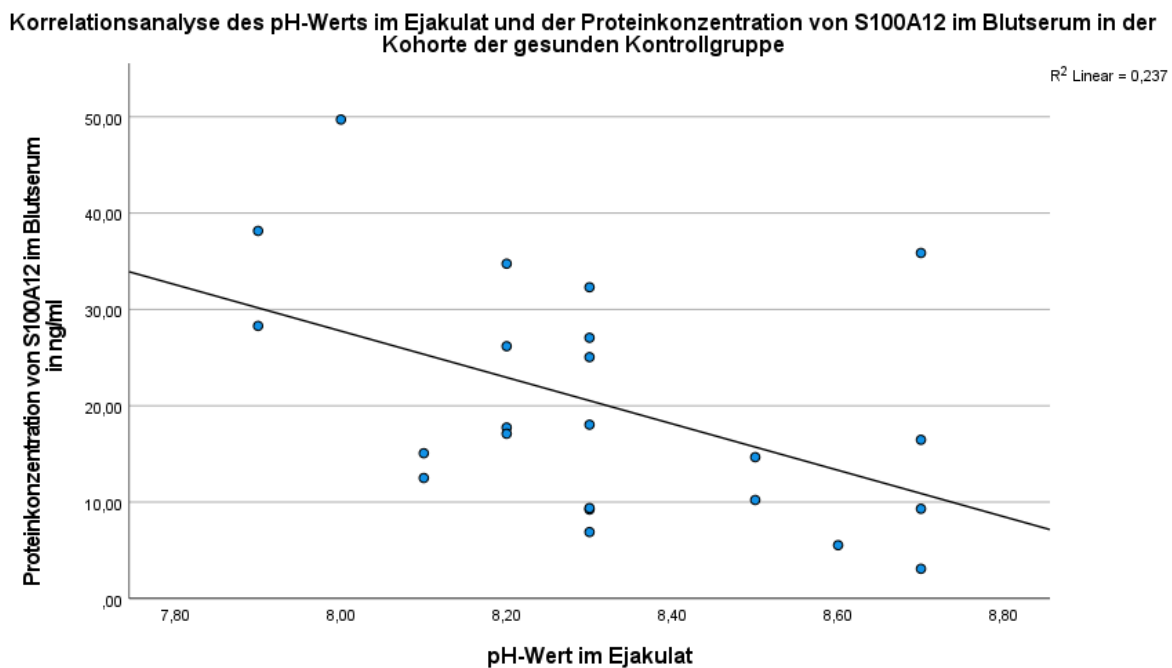


Figure 12 **Korrelationsanalyse der Proteinkonzentration von S100A12 im Blutserum und dem pH-Wert im Ejakulat.** Abgebildet ist lediglich die Kohorte der gesunden Kontrollpersonen (n=23). In der Korrelationsanalyse mittels Spearman-Rho besteht eine signifikante negative Korrelation zwischen den beiden Variablen ($p < 0.05$; $\rho = -,460$).

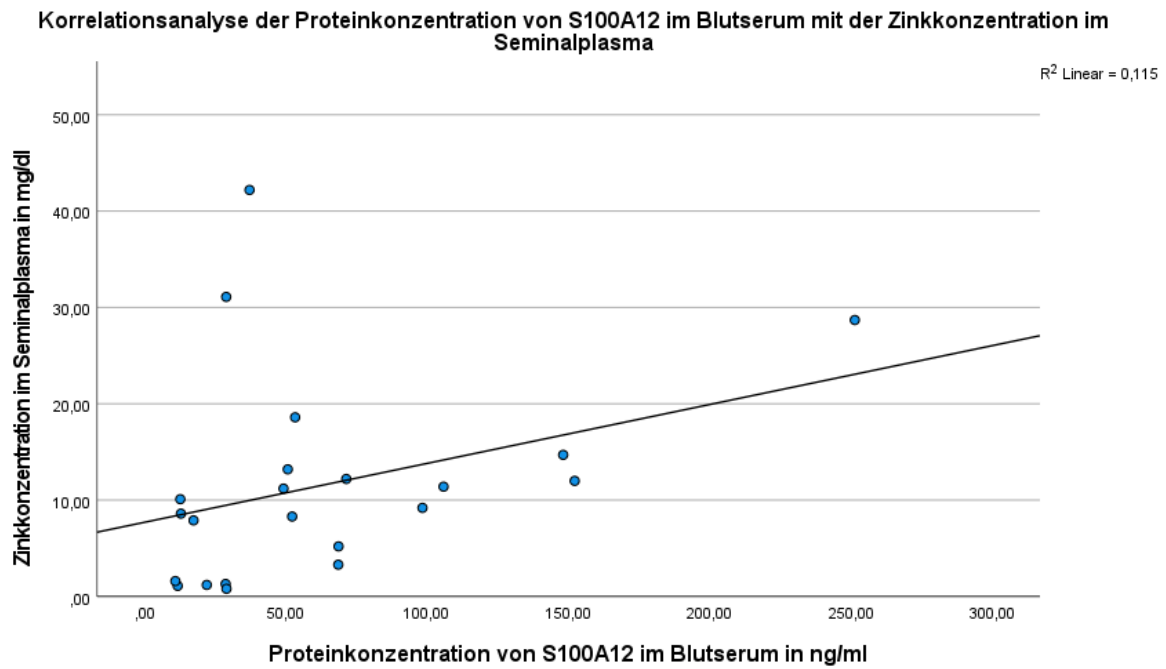


Figure 13 **Korrelationsanalyse der Proteinkonzentration von S100A12 im Blutserum und der Zinkkonzentration im Seminalplasma.** Abgebildet ist lediglich die Kohorte der CP/CPPS-Patienten (n=22). In der Korrelationsanalyse mittels Spearman-Rho besteht eine signifikante positive Korrelation zwischen den beiden Variablen ($p < 0.05$; $\rho = ,499$).

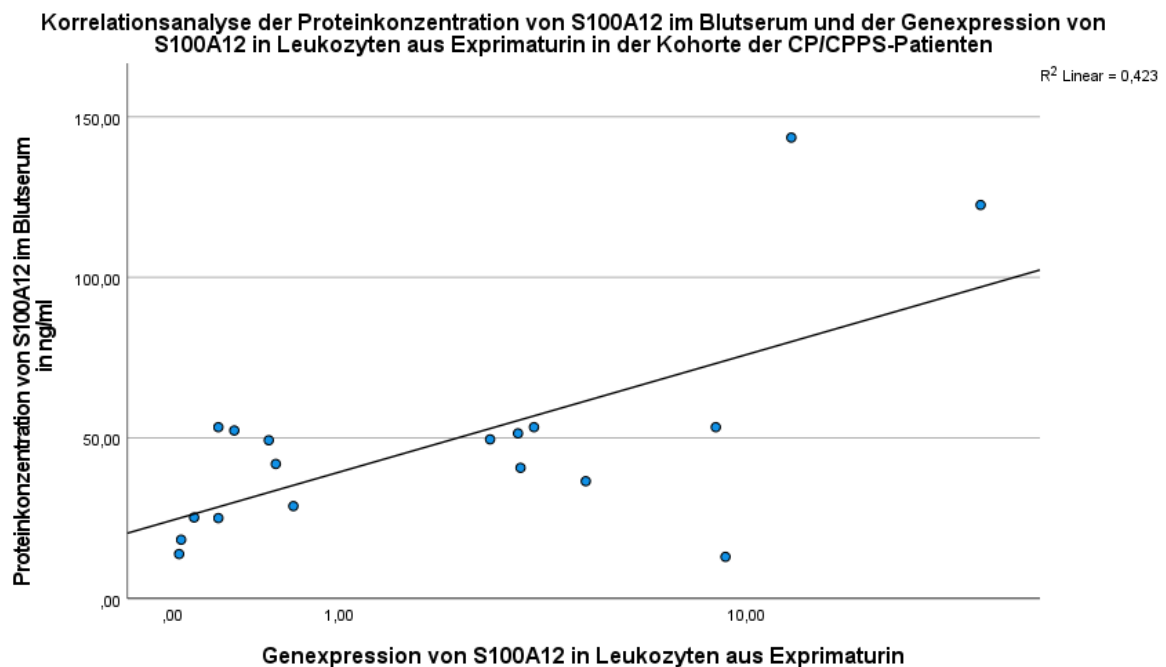


Figure 14 **Korrelationsanalyse der Genexpression von S100A12 in Leukozyten aus ExUr mit der Proteinkonzentration von S100A12 im Blutserum.** Abgebildet ist lediglich die Kohorte der CP/CPPS-Patienten (n=18). In der Korrelationsanalyse mittels Spearman-Rho besteht eine signifikante positive Korrelation zwischen den beiden Variablen ($p < 0.05$; $\rho = ,501$).

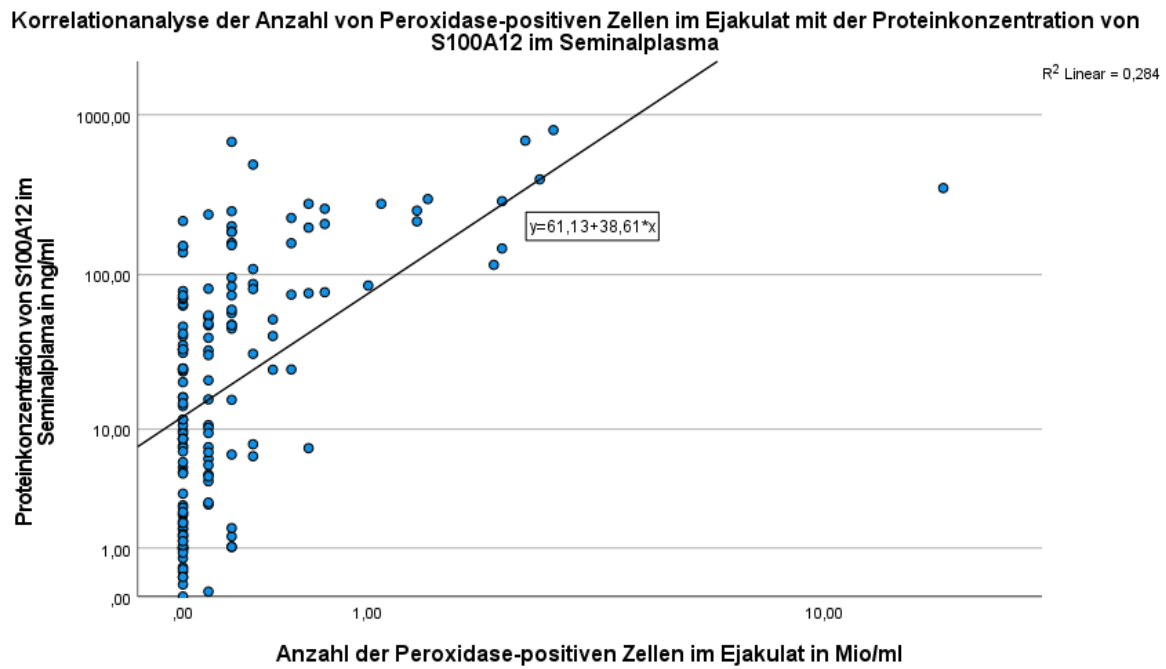


Figure 15 **Korrelationsanalyse der Anzahl von Peroxidase-positiven Zellen im Ejakulat und der Proteinkonzentration von S100A12 im Seminalplasma.** Abgebildet sind sowohl CP/CPPS-Patienten als auch gesunde Kontrollpersonen (n=150). In der Korrelationsanalyse mittels Spearman-Rho besteht eine signifikante positive Korrelation zwischen den beiden Variablen ($p < 0.0001$; $\rho = ,594$).

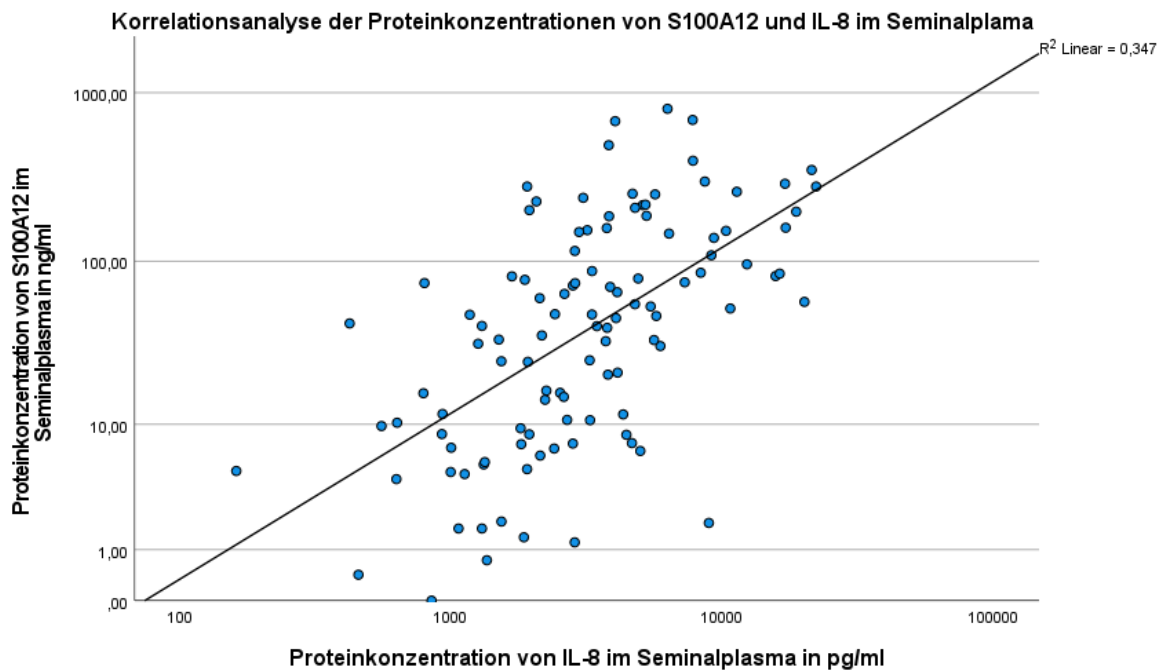


Figure 16 **Korrelationsanalyse der Proteinkonzentrationen von S100A12 und Interleukin-8 im Seminalplasma.** Abgebildet sind sowohl CP/CPPS-Patienten als auch gesunde Kontrollpersonen (n=109). In der Korrelationsanalyse mittels Spearman-Rho besteht eine signifikante positive Korrelation zwischen den beiden Variablen ($p < 0.0001$; $\rho = ,619$).

Korrelationsanalyse der Proteinkonzentration von S100A12 im Seminalplasma mit der Spermien-Vitalität im Ejakulat in %

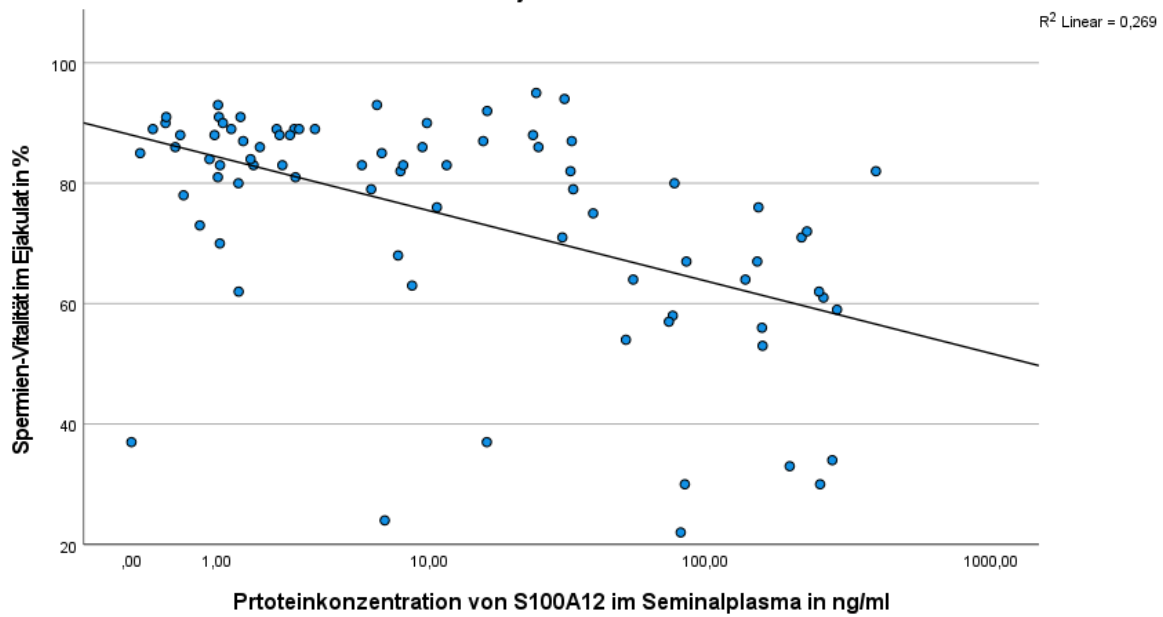


Figure 17 **Korrelationsanalyse der Proteinkonzentration von S100A12 im Seminalplasma mit der Spermien-Vitalität im Ejakulat.** Abgebildet sind sowohl CP/CPSP-Patienten als auch gesunde Kontrollpersonen (n=80). In der Korrelationsanalyse mittels Spearman-Rho besteht eine signifikante negative Korrelation zwischen den beiden Variablen ($p < 0.0001$; $\rho = -,537$).

Korrelationsanalyse der Proteinkonzentration von S100A12 im Seminalplasma und dem Anteil der Spermien mit Flagellumdefekt im Spermogramm

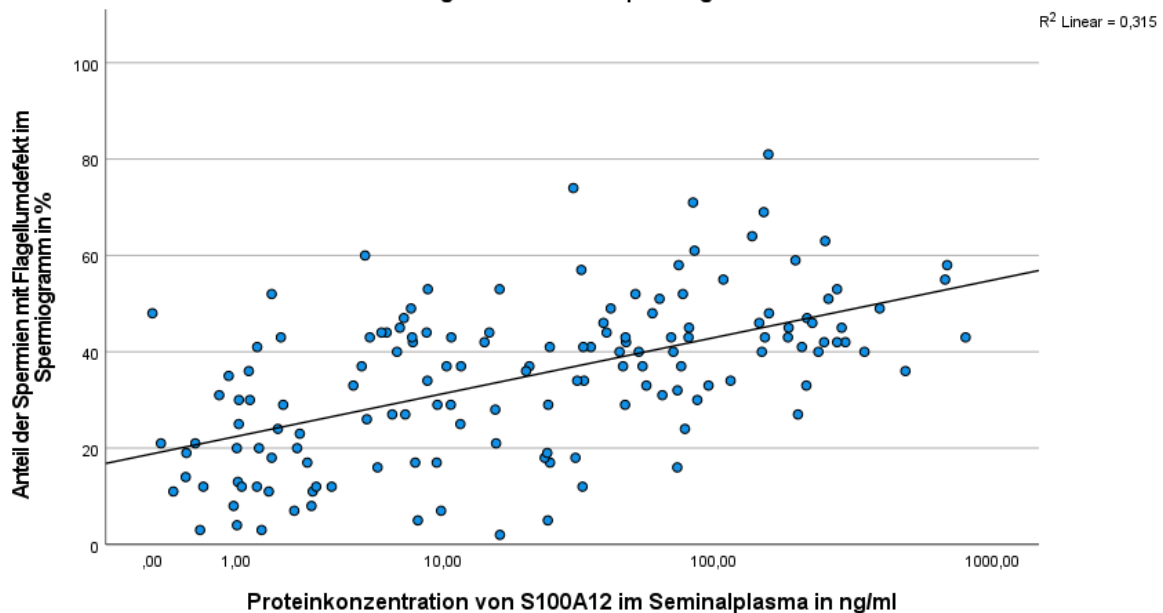


Figure 18 **Korrelationsanalyse der Proteinkonzentration von S100A12 in ng/ml im Seminalplasma mit dem Anteil der Spermien mit einem Flagellumdefekt in %.** Abgebildet sind sowohl CP/CPSP-Patienten als auch gesunde Kontrollpersonen (n=148). In der Korrelationsanalyse mittels Spearman-Rho besteht eine signifikante negative Korrelation zwischen den beiden Variablen ($p < 0.0001$; $\rho = ,555$).

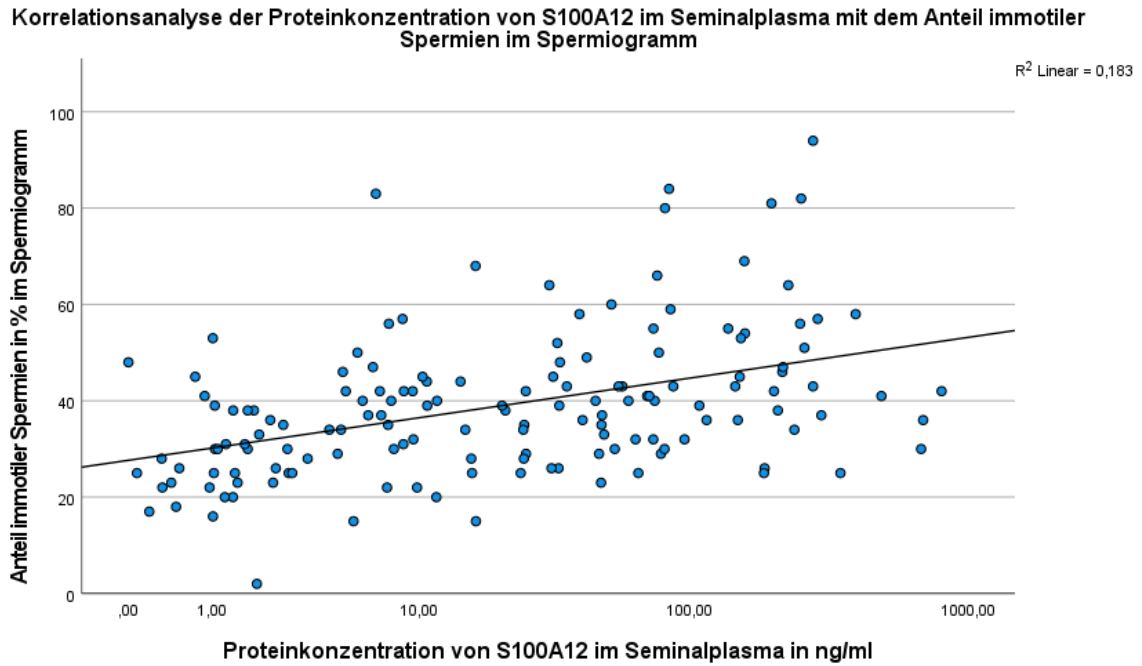


Figure 19 **Korrelationsanalyse der Proteinkonzentration von S100A12 in ng/ml im Seminalplasma mit dem Anteil immotiler Spermien im Spermogramm in %**. Abgebildet sind sowohl CP/CPPS-Patienten als auch gesunde Kontrollpersonen (n=149). In der Korrelationsanalyse mittels Spearman-Rho besteht eine signifikante positive Korrelation zwischen den beiden Variablen ($p < 0.0001$; $\rho = ,445$).

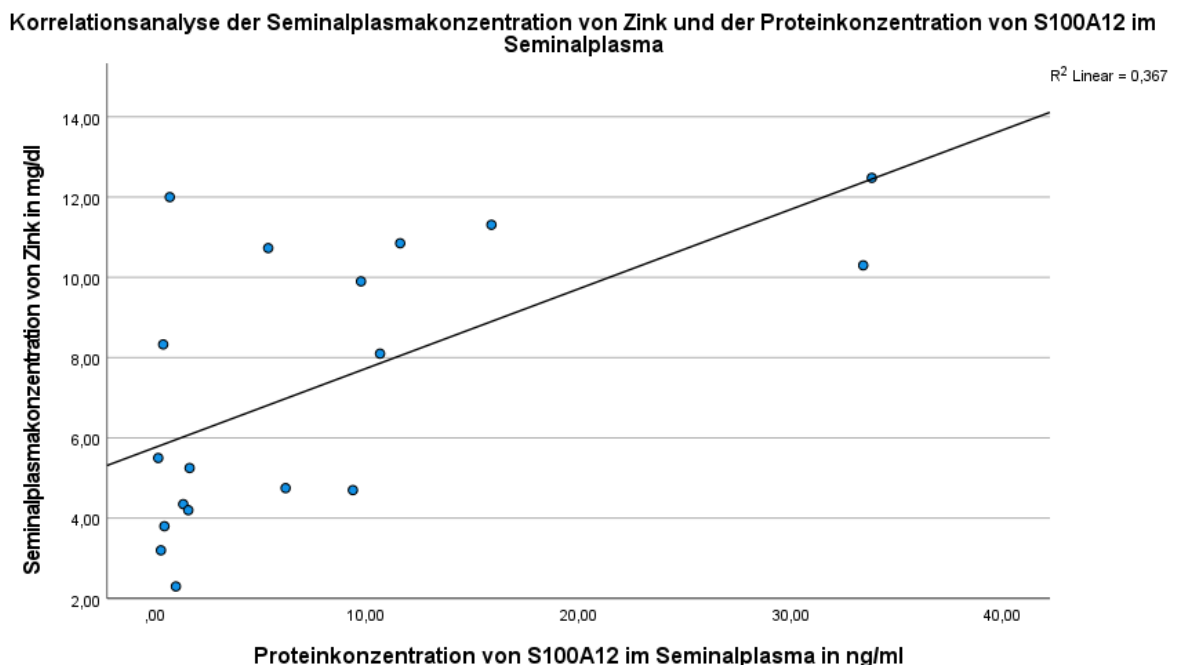


Figure 20 **Korrelationsanalyse der Proteinkonzentrationen von S100A12 im Seminalplasma in ng/ml und der Seminalplasmakonzentration von Zink in mg/dl**. Abgebildet sind nur gesunde Kontrollpersonen (n=18). In der Korrelationsanalyse mittels Spearman-Rho besteht eine signifikante positive Korrelation zwischen den beiden Variablen ($p < 0.05$; $\rho = ,567$).

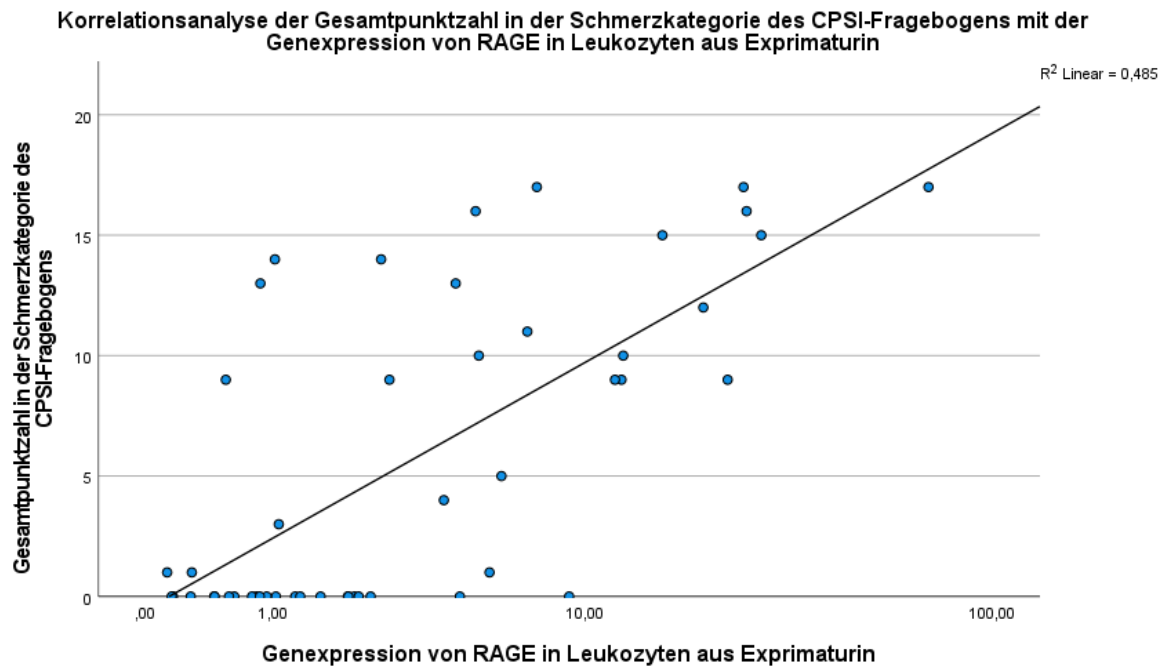


Figure 21 **Korrelationsanalyse der Genexpression von *RAGE* in Leukozyten aus ExUr mit der Gesamtpunktzahl in der Schmerzkatgorie des NIH-CPSI.** Abgebildet sind sowohl CP/CPPS-Patienten als auch gesunde Kontrollpersonen (n=42). In der Korrelationsanalyse mittels Spearman-Rho besteht eine signifikante positive Korrelation zwischen den beiden Variablen ($p < 0.0001$; $\rho = ,647$).

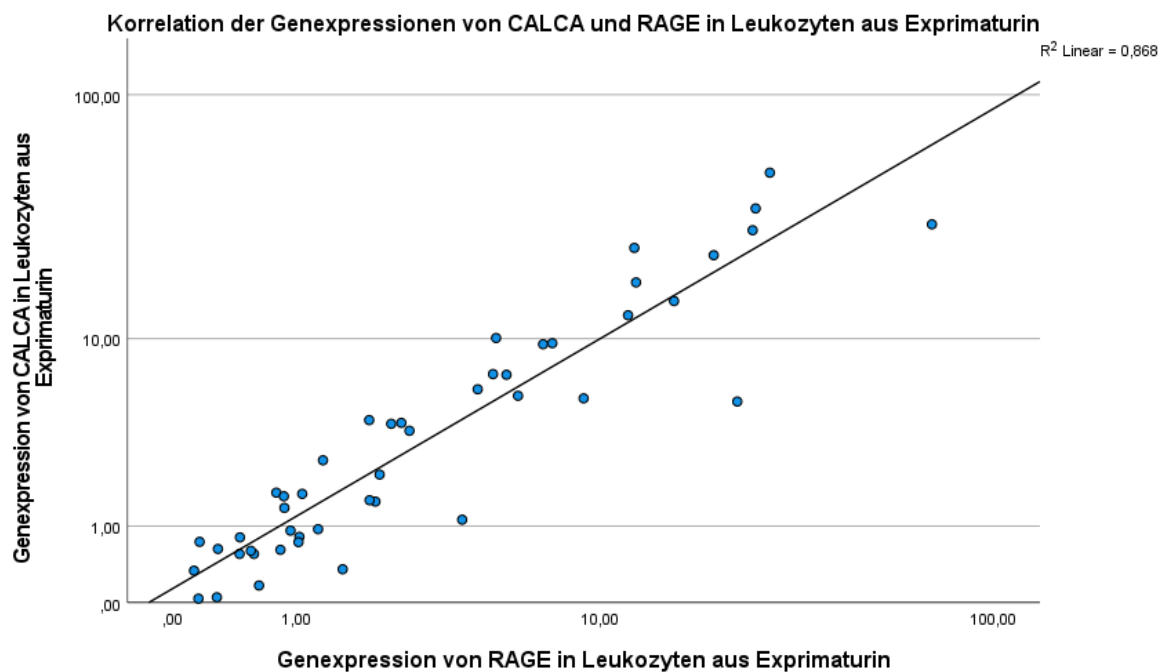


Figure 22 **Korrelationsanalyse der Genexpression von *RAGE* und *CALCA* in Leukozyten aus ExUr.** In der Abbildung ist die Korrelationsanalyse der Genexpressionen von *CALCA* und *RAGE* in Leukozyten aus ExUr dargestellt. Erfasst wurden die Genexpressionen von insgesamt 47 CP/CPPS- Patienten und Gesunden. Zu erkennen ist eine stark positive Korrelation der beiden Genexpressionen ($p < 0.0001$; $\rho = ,924$).

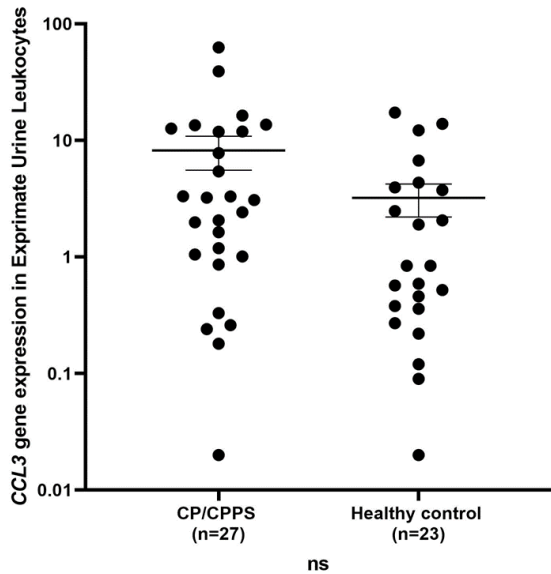


Figure 23 **Genexpression von CCL3 in Leukozyten aus ExUr.** In der Abbildung sind die Genexpressionen von CCL3 in Leukozyten aus ExUr für die Gruppe der CP/CPPS-Patienten gegenüber der gesunden Kontrollgruppe dargestellt. Untersucht wurden 27 Patienten und 23 gesunde Kontrollen. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen CP/CPPS-Patienten und der gesunden Kontrollgruppe ($p > 0,05$).

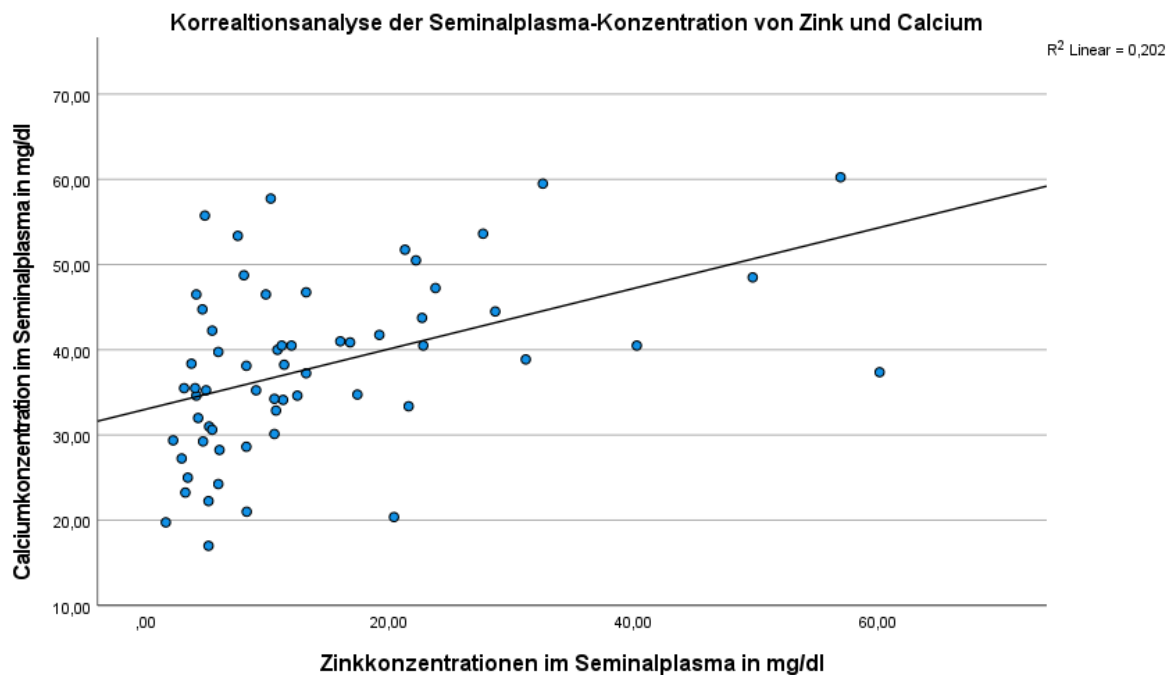


Figure 24 **Korrelationsanalyse der Seminalplasmakonzentrationen von Zink und Calcium in der Gesamtkohorte.** Auf der x-Achse sind die Zink-Konzentrationen in mg/dl dargestellt. Auf der y-Achse sind die Calciumkonzentrationen in mg/dl dargestellt. In der Korrelationsanalyse mittels Spearman-Rho wurden die Seminalplasmen von insgesamt 61 CP/CPPS Patienten und gesunden Kontrollpersonen berücksichtigt. Hier zeigte sich eine signifikante positive Korrelation der beiden Ionen im Seminalplasma ($p < 0.0001$; $\rho = ,491$).

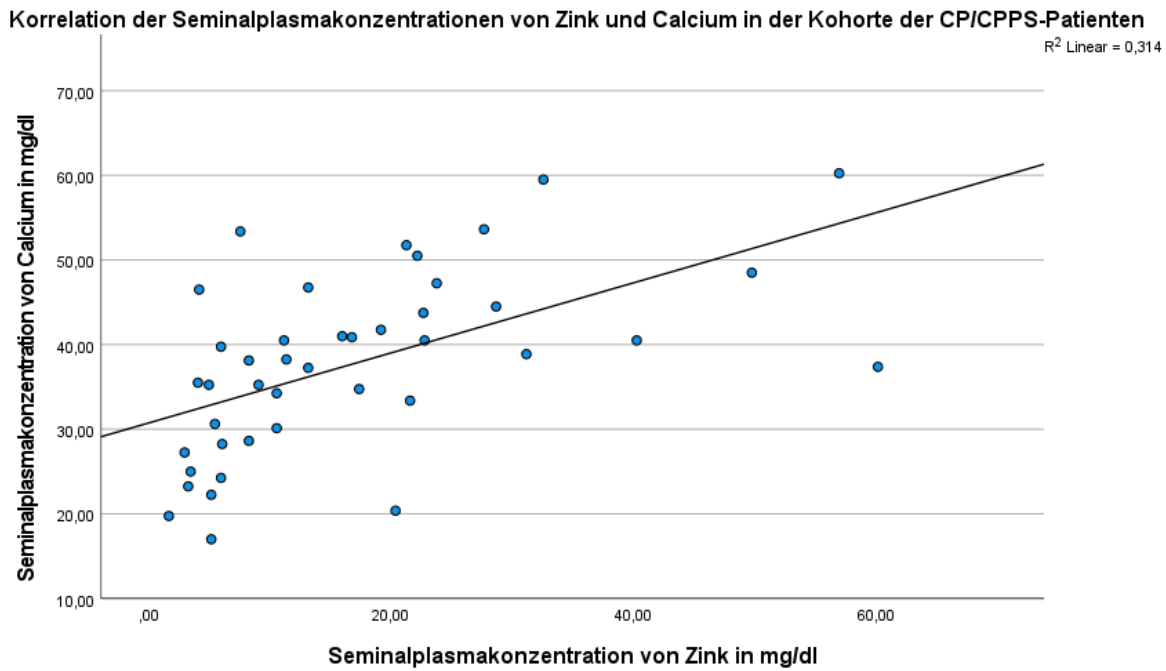


Figure 25 **Korrelationsanalyse der Seminalplasmakonzentrationen von Zink und Calcium in CP/PPS-Patienten.** Auf der x-Achse dargestellt sind die Zink-Konzentrationen in mg/dl. Auf der y-Achse dargestellt sind die Calciumkonzentrationen in mg/dl. In der Korrelationsanalyse mittels Spearman-Rho wurden die Seminalplasmen von insgesamt 42 CP/PPS berücksichtigt. Hier zeigte sich eine signifikante positive Korrelation der beiden Ionen im Seminalplasma ($p < 0.0001$; $\rho = ,643$).

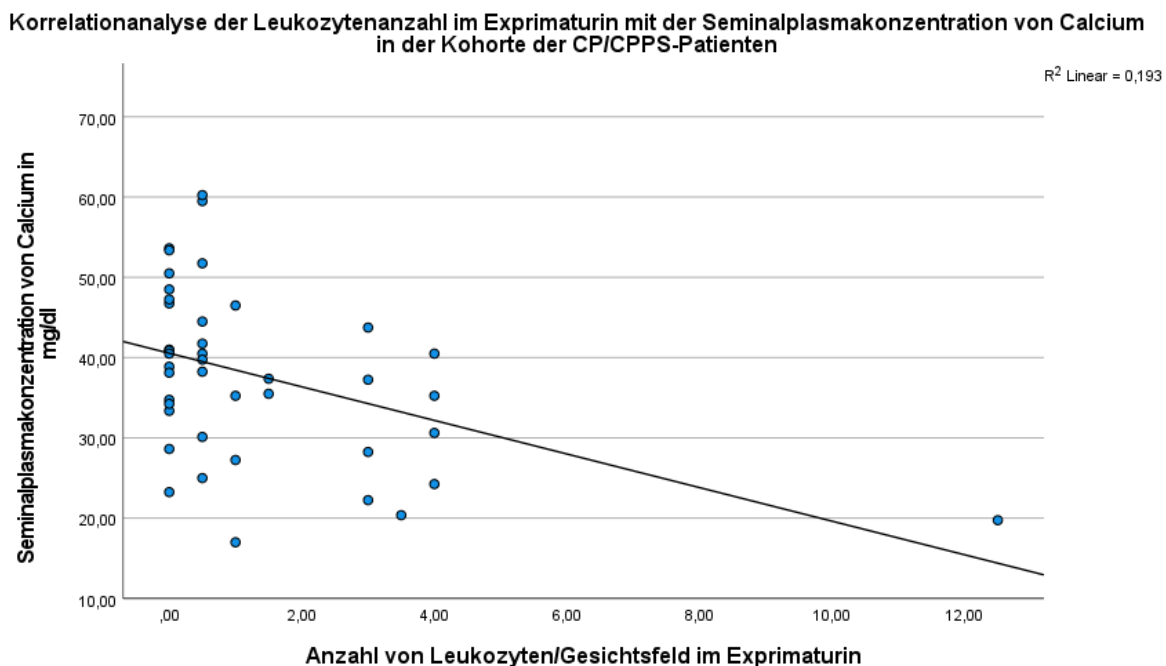


Figure 26 **Korrelationsanalyse der Anzahl von Leukozyten im ExUr mit der Seminalplasmakonzentrationen von Calcium.** Auf der y-Achse dargestellt sind die Calcium-Konzentrationen in mg/dl. Auf der x-Achse dargestellt ist die Anzahl von Leukozyten/Gesichtsfeld im ExUr. In der Korrelationsanalyse mittels Spearman-Rho wurden die Seminalplasmen von insgesamt 42 CP/PPS berücksichtigt. Hier zeigte sich eine signifikante positive Korrelation der beiden Variablen ($p < 0.01$; $\rho = -,423$).

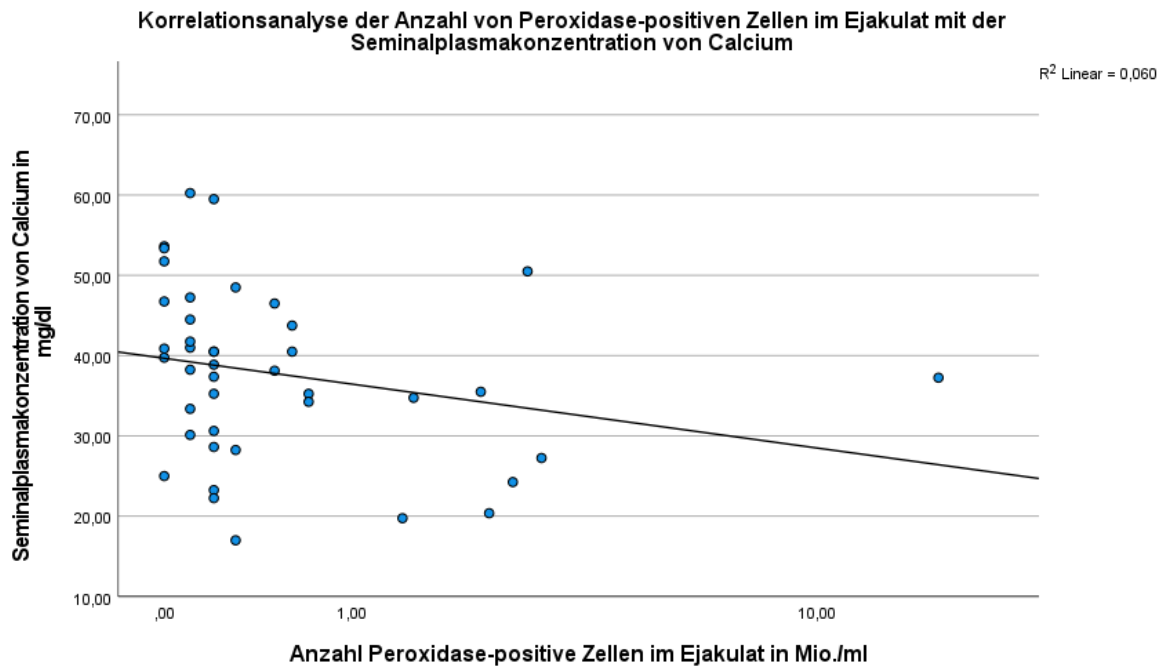


Figure 27 **Korrelationsanalyse der Anzahl von Peroxidase-positiven Zellen im Ejakulat mit der Seminalplasmakonzentrationen von Calcium.** Auf der y-Achse dargestellt sind die Calcium-Konzentrationen in mg/dl. Auf der x-Achse dargestellt ist die Anzahl von Peroxidase-positiven Zellen im Ejakulat in Mio./ml. In der Korrelationsanalyse mittels Spearman-Rho wurden die Seminalplasmen von insgesamt 42 CP/PPS berücksichtigt. Hier zeigte sich eine signifikante positive Korrelation der beiden Variablen ($p < 0.01$; $\rho = -,405$).

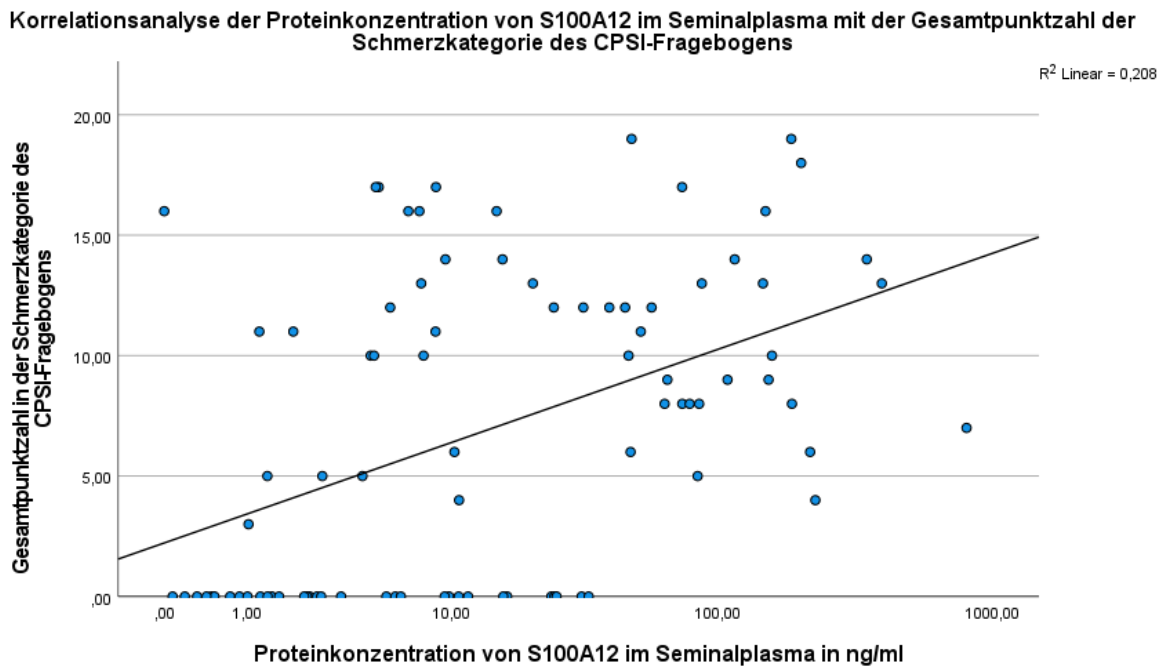


Figure 28 **Korrelationsanalyse der Proteinkonzentration von S100A12 im Seminalplasma und der in der Gesamtpunktzahl in der Schmerzkategorie des CPSI-Fragebogens Subgruppenanalyse nach Matching des Alters.** Abgebildet sind sowohl CP/PPS-Patienten als auch gesunde Kontrollpersonen ($n=88$). In der Korrelationsanalyse mittels Spearman-Rho besteht eine signifikante positive Korrelation zwischen den beiden Variablen ($p < 0.0001$; $\rho = ,454$).

Korrelationsanalyse der Anzahl von Leukozyten im Ejakulat und der Proteinkonzentration von S100A12 im Seminalplasma

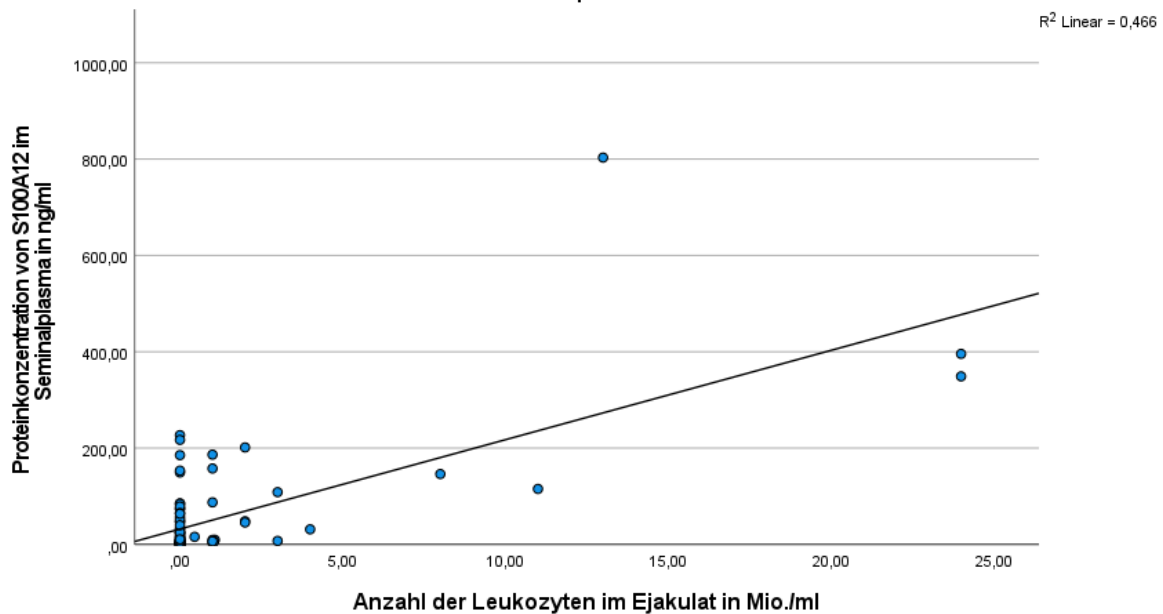


Figure 29 **Korrelationsanalyse der Leukozytenzahl im Ejakulat in Mio./ml mit der Proteinkonzentration von S100A12 in ng/ml im Seminalplasma in der Subgruppenanalyse nach Matching des Alters.** Abgebildet sind sowohl CP/CPPS-Patienten als auch gesunde Kontrollpersonen (n=90). In der Korrelationsanalyse mittels Spearman-Rho besteht eine signifikante positive Korrelation zwischen den beiden Variablen ($p < 0.0001$; $\rho = ,419$).

Korrelationsanalyse der Anzahl von Peroxidase-positiven Zellen im Ejakulat mit der Proteinkonzentration von S100A12 im Seminalplasma

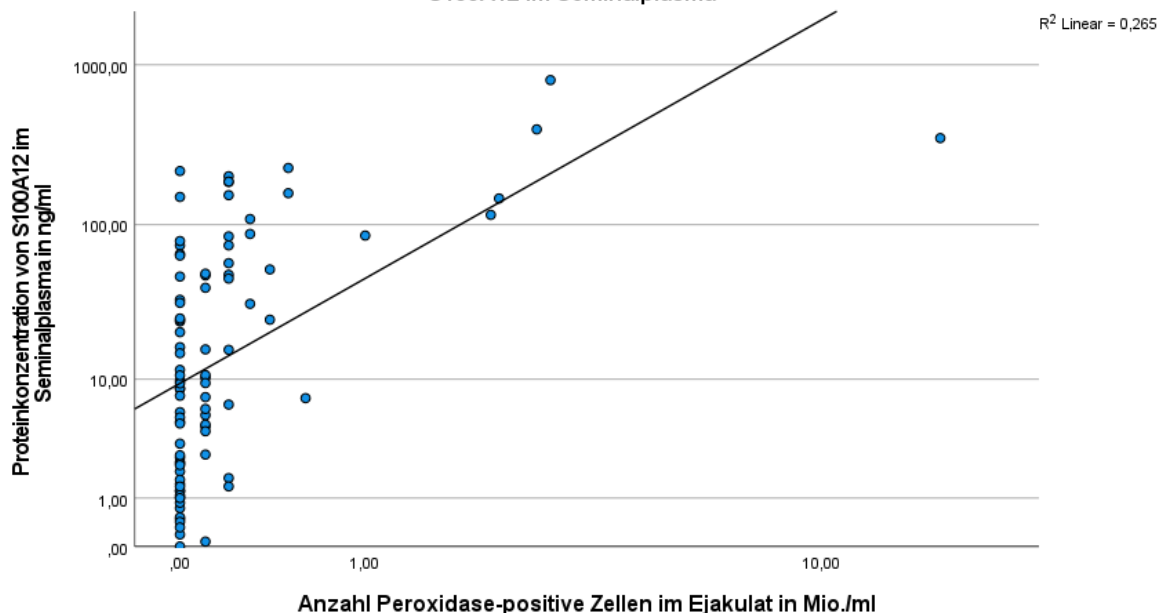


Figure 30 **Korrelationsanalyse der Anzahl von Peroxidase-positiven Zellen im Ejakulat in Mio./ml mit der Proteinkonzentration von S100A12 in ng/ml im Seminalplasma in der Subgruppenanalyse nach Matching des Alters.** Abgebildet sind sowohl CP/CPPS-Patienten als auch gesunde Kontrollpersonen (n=91). In der Korrelationsanalyse mittels Spearman-Rho besteht eine signifikante positive Korrelation zwischen den beiden Variablen ($p < 0.0001$; $\rho = ,551$).

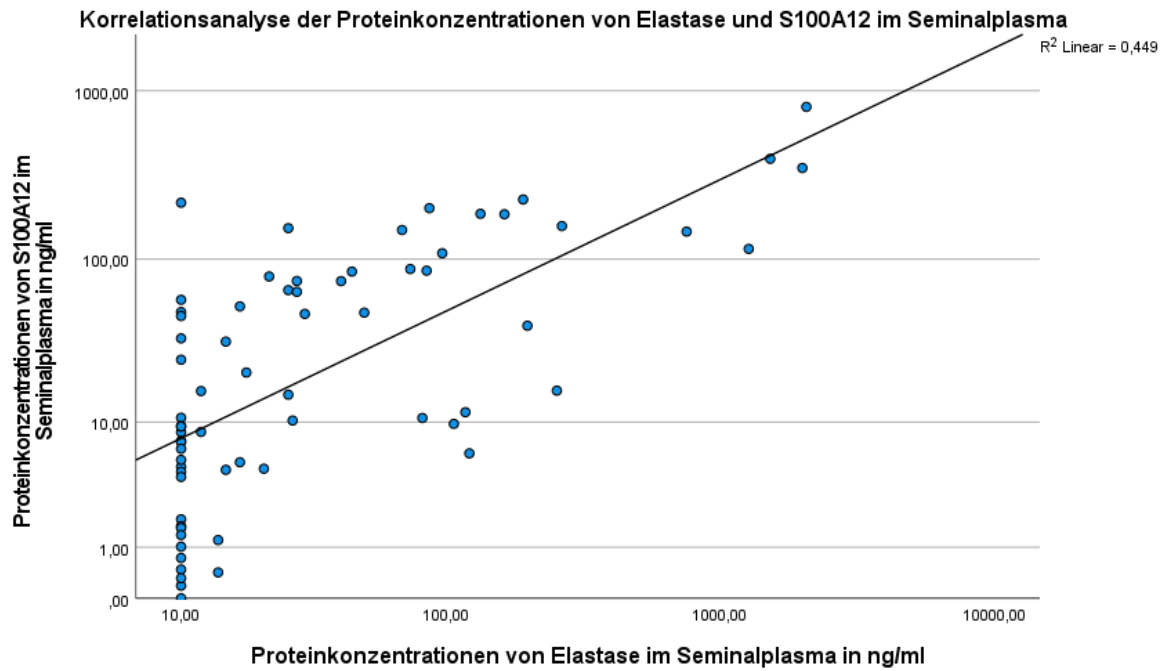


Figure 31 **Korrelationsanalyse der Proteinkonzentrationen von S100A12 in ng/ml und Elastase in ng/ml im Seminalplasma in der Subgruppenanalyse nach Matching des Alters.** Abgebildet sind sowohl CP/CPPS-Patienten als auch gesunde Kontrollpersonen (n=68). In der Korrelationsanalyse mittels Spearman-Rho besteht eine signifikante positive Korrelation zwischen den beiden Variablen ($p < 0.0001$; $\rho = ,686$).

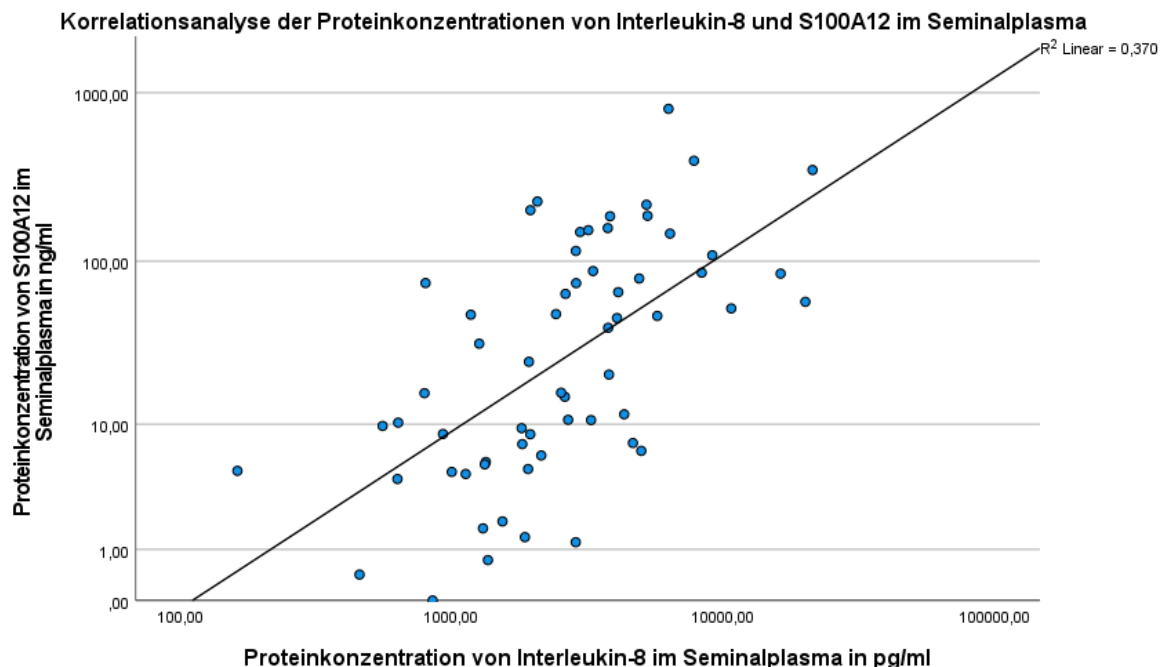


Figure 32 **Korrelationsanalyse der Proteinkonzentrationen von S100A12 in ng/ml und Interleukin-8 in pg/ml im Seminalplasma in der Subgruppenanalyse nach Matching des Alters.** Abgebildet sind sowohl CP/CPPS-Patienten als auch gesunde Kontrollpersonen (n=61). In der Korrelationsanalyse mittels Spearman-Rho besteht eine signifikante positive Korrelation zwischen den beiden Variablen ($p < 0.0001$; $\rho = ,647$).

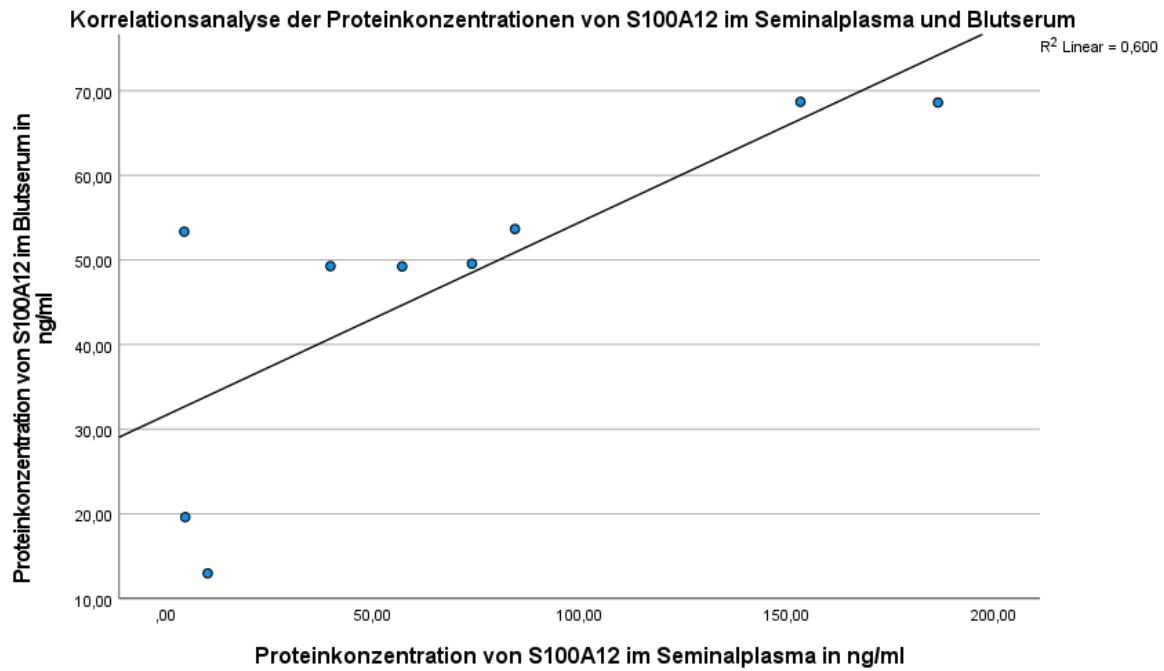


Figure 33 **Korrelationsanalyse der Proteinkonzentration von S100A12 in ng/ml im Seminalplasma mit der Proteinkonzentration von S100A12 im Blutserum in ng/ml in der Subgruppenanalyse nach Matching des Alters.** Abgebildet sind sowohl CP/CPPS-Patienten als auch gesunde Kontrollpersonen (n=9). In der Korrelationsanalyse mittels Spearman-Rho besteht eine signifikante positive Korrelation zwischen den beiden Variablen ($p < 0.05$; $\rho = ,700$).

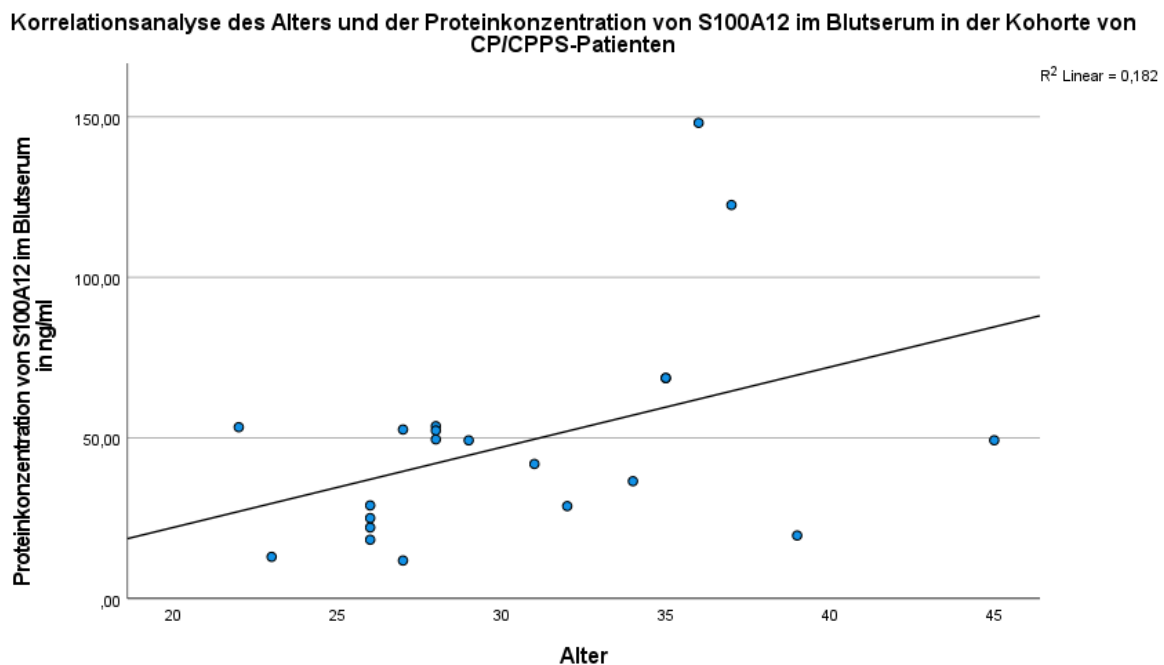


Figure 34 **Korrelationsanalyse der Proteinkonzentration von S100A12 im Blutserum und dem Alter in der Subgruppenanalyse nach Matching des Alters.** Abgebildet sind lediglich CP/CPPS-Patienten (n=21). In der Korrelationsanalyse mittels Spearman-Rho besteht eine signifikante positive Korrelation zwischen den beiden Variablen ($p < 0.05$; $\rho = ,435$).

Korrelationsanalyse der Proteinkonzentrationen von S100A12 im Blutserum und der Gesamtpunktzahl in der Schmerzkategorie des CPSI-Fragebogens

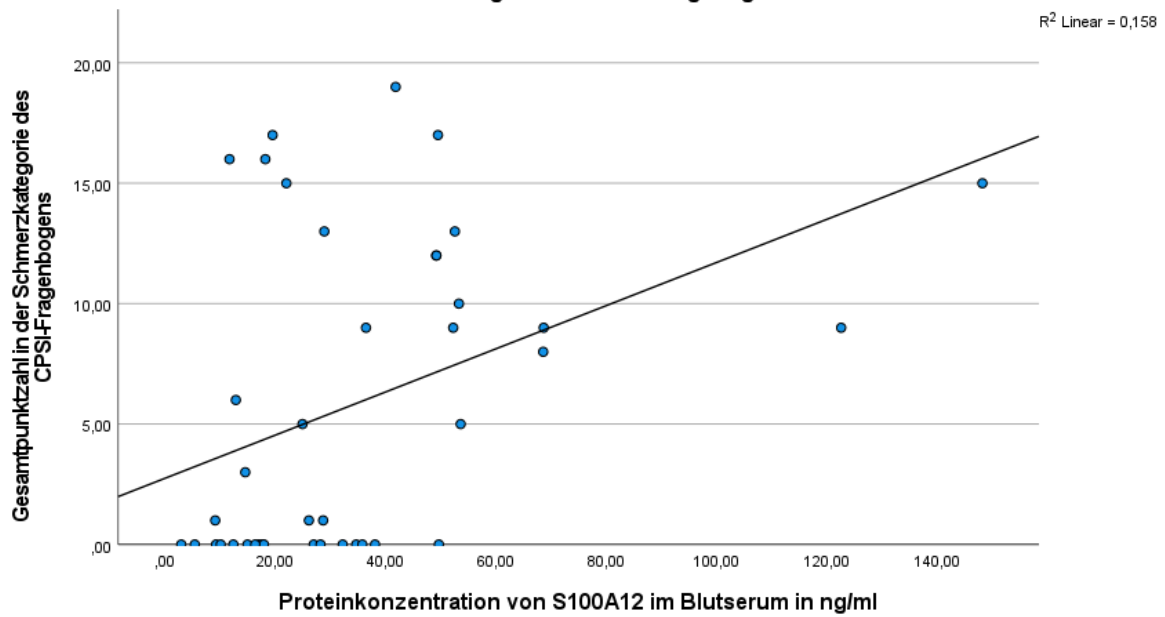


Figure 35 **Korrelationsanalyse der Proteinkonzentration von S100A12 im Blutserum und der Gesamtpunktzahl in der Schmerzkategorie des CPSI-Fragebogens in der Subgruppenanalyse nach Matching des Alters.** Abgebildet sind sowohl CP/CPPS-Patienten als auch gesunde Kontrollpersonen (n=41). In der Korrelationsanalyse mittels Spearman-Rho besteht eine signifikante positive Korrelation zwischen den beiden Variablen ($p < 0.01$; $\rho = ,426$).

Korrelationsanalyse der Proteinkonzentration von S100A12 im Blutserum und dem pH-Wert im Ejakulat

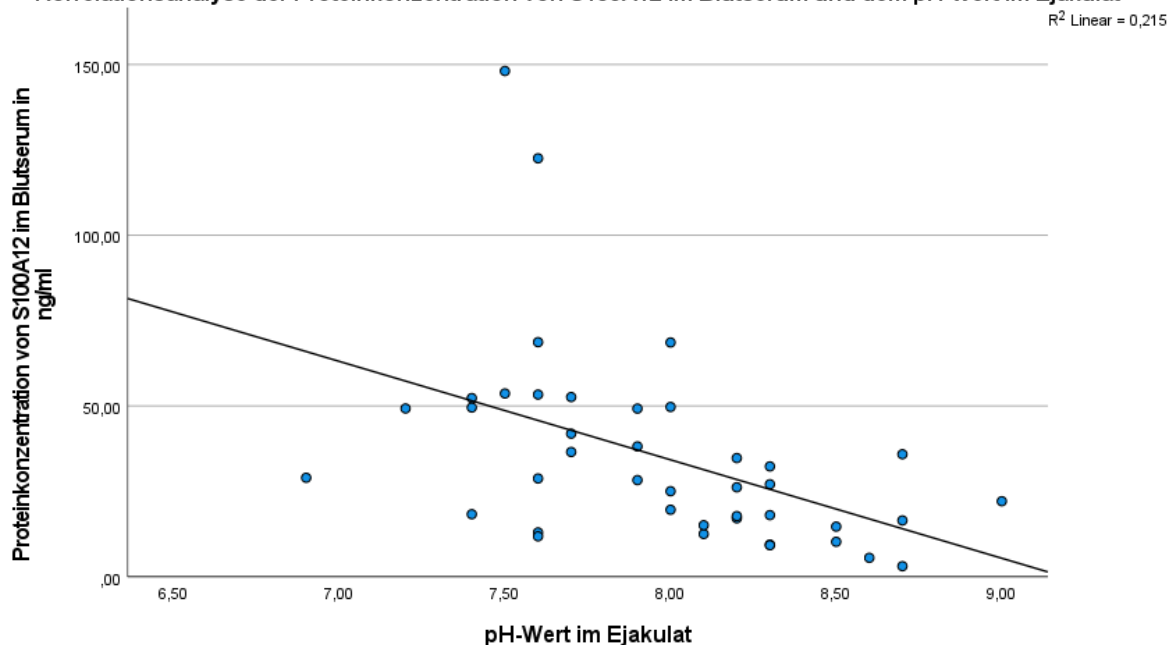


Figure 36 **Korrelationsanalyse der Proteinkonzentration von S100A12 im Blutserum und pH-Wert im Ejakulat in der Subgruppenanalyse nach Matching des Alters.** Abgebildet sind sowohl CP/CPPS-Patienten als auch gesunde Kontrollpersonen (n=41). In der Korrelationsanalyse mittels Spearman-Rho besteht eine signifikante negative Korrelation zwischen den beiden Variablen ($p < 0.0001$; $\rho = -,569$).

Korrelationsanalyse des pH-Werts im Ejakulat mit der Proteinkonzentration von S100A12 im Blutserum in der Kohorte der gesunden Kontrollpersonen

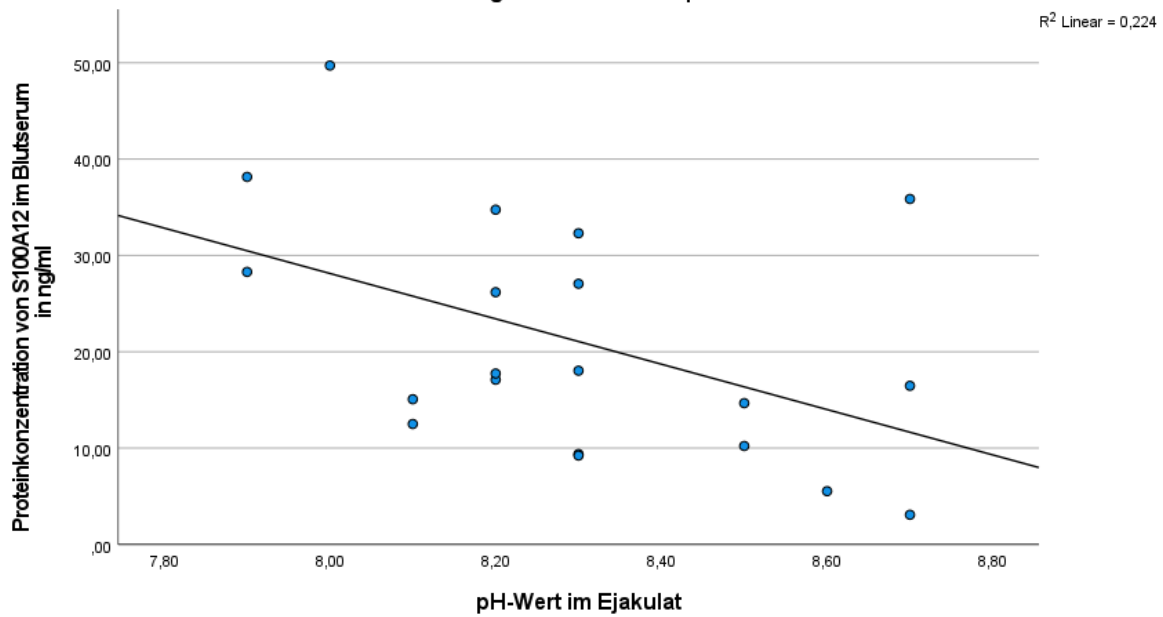


Figure 37 Korrelationsanalyse der Proteinkonzentration von S100A12 im Blutserum und pH-Wert im Ejakulat in der Subgruppenanalyse nach Matching des Alters in der Kohorte der gesunden Kontrollpersonen (n=20). In der Korrelationsanalyse mittels Spearman-Rho besteht eine signifikante negative Korrelation zwischen den beiden Variablen ($p < 0.05$; $\rho = -,471$).

Korrelationsanalyse der Proteinkonzentrationen von S100A12 im Blutserum und Interleukin-8 im Seminalplasma

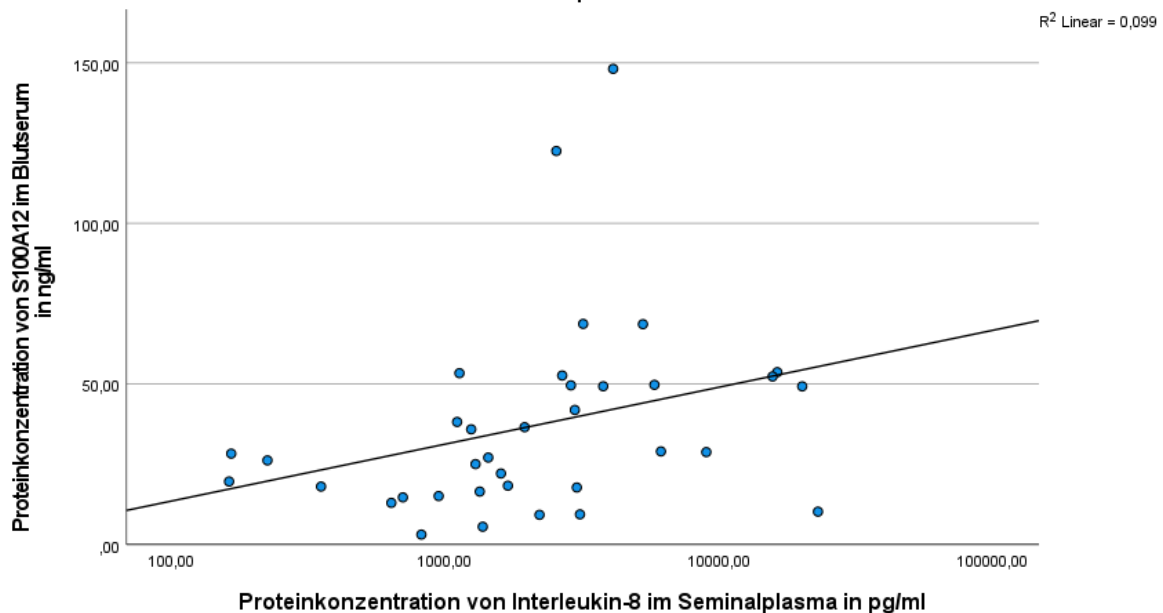


Figure 38 Korrelationsanalyse der Proteinkonzentrationen von S100A12 im Blutserum und Interleukin-8 im Seminalplasma in pg/ml in der Subgruppenanalyse nach Matching des Alters. Abgebildet sind sowohl CP/CPPS-Patienten als auch gesunde Kontrollpersonen (n=36). In der Korrelationsanalyse mittels Spearman-Rho besteht eine signifikante positive Korrelation zwischen den beiden Variablen ($p < 0.01$; $\rho = ,439$).

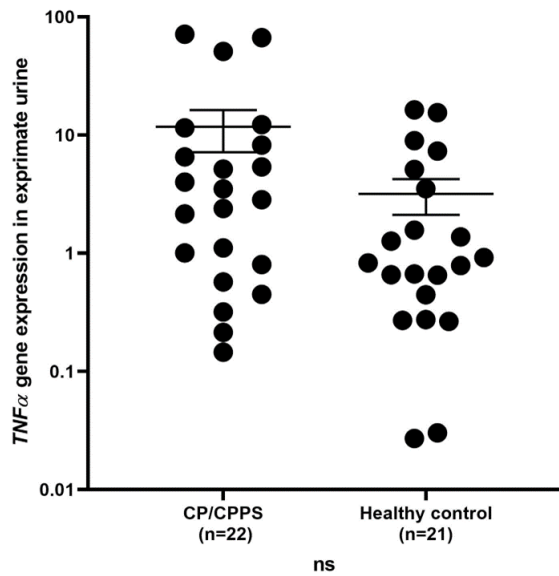


Figure 39 **Genexpressionsanalyse von *TNFα* im ExUr-Pellet.** In der Abbildung sind die Genexpressionen von *TNFα* im ExUr-Pellet für die Gruppe der CP/CPPS-Patienten gegenüber der gesunden Kontrollgruppe dargestellt. Untersucht wurden 22 Patienten und 21 Gesunde. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den CP/CPPS-Patienten und der gesunden Kontrollgruppe ($p > 0,05$).

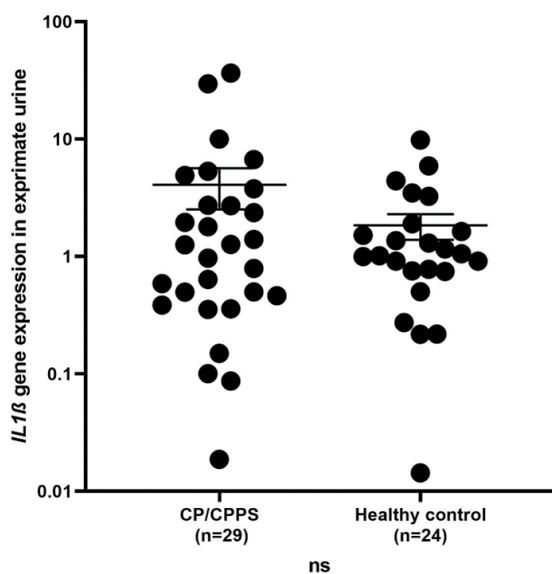


Figure 40 **Genexpressionsanalyse von *IL1β* im ExUr-Pellet.** In der Abbildung sind die Genexpressionen von *Interleukin-1β* im ExUr-Pellet für die Gruppe der CP/CPPS-Patienten gegenüber der gesunden Kontrollgruppe dargestellt. Untersucht wurden 29 Patienten und 24 gesunde Kontrollen. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Genexpression von *Interleukin-1β* zwischen CP/CPPS-Patienten und der gesunden Kontrollgruppe ($p > 0,05$).

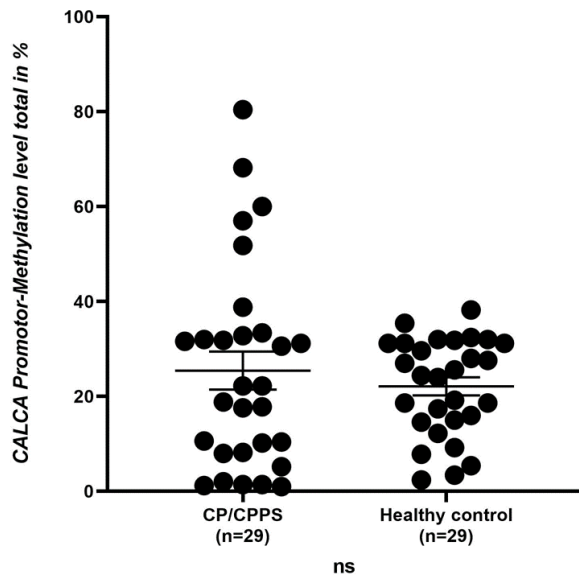


Figure 41 **Promotormethylierungsanalyse von CALCA im ExUr-Pellet.** Es sind die Ergebnisse der Promotormethylierungsanalyse von CALCA im ExUr-Pellet dargestellt. Mittels Pyrosequenzierung untersuchten wir 29 Patienten und 29 gesunde Kontrollen auf Methylierungen in einer regulierenden Promotorregion von CALCA an 5 Positionen. Der dargestellte Boxplot zeigt die durchschnittliche Methylierung über alle 5 Positionen hinweg. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied ($p > 0,05$).

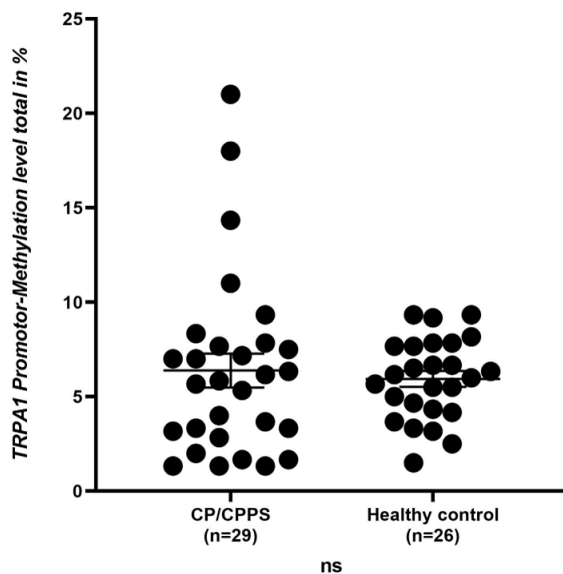


Figure 42 **Promotormethylierungsanalyse von TRPA1 im ExUr-Pellet.** Es sind die Ergebnisse der Promotormethylierungsanalyse von TRPA1 im ExUr-Pellet dargestellt. Mittels Pyrosequencing untersuchten wir 29 Patienten und 26 Kontrollen auf Methylierungen in einer regulierenden Promotor-region von TRPA1 an 6 Positionen. Der dargestellte Boxplot zeigt die durchschnittliche Methylierung über alle 6 Positionen hinweg. Es zeigte sich durchschnittlich keine signifikant höhere Promotormethylierung in einer der Kohorten ($p > 0,05$).

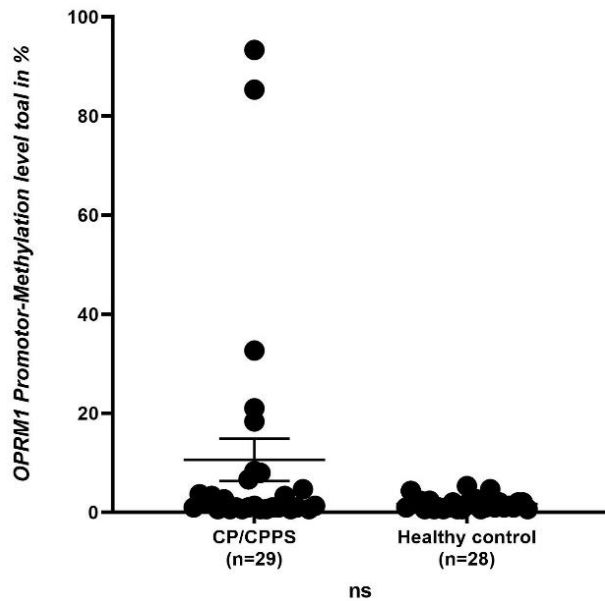


Figure 43 **Promotormethylierungsanalyse von *OPRM1* im ExUr-Pellet.** Es sind die Ergebnisse der Promotormethylierungsanalyse von *OPRM1* im ExUr-Pellet dargestellt. Mittels Pyrosequenzierung untersuchten wir 29 Patienten und 28 gesunde Kontrollen auf Methylierungen in einer regulierenden Promotorregion von *OPRM1* an 3 Positionen. Der dargestellte Boxplot zeigt die durchschnittliche Methylierung über alle 3 Positionen hinweg. Es zeigte sich durchschnittlich keine signifikant höhere Promotormethylierung in einer der Kohorten ($p > 0,05$).

Publikationsverzeichnis

Präsentation auf dem EAU22-Kongress in Amsterdam

Posterpräsentation beim Scienceday 2022 der JLU Gießen

Präsentation beim AuF-Symposium 2022 in Erlangen

Selbstständigkeitserklärung

Ehrenwörtliche Erklärung

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. 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 und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Ort/Datum

Unterschrift

Danksagung

Ich möchte mich zunächst von Herzen bei allen Mitarbeitern des andrologisch-urologischen Forschungslabors und der Arbeitsgruppe Epigenetik des Urogenitalsystems bedanken. Als ich mit meiner Arbeit im Labor begann, wurde ich hier herzlich empfangen und erhielt alle Unterstützung, die man sich nur wünschen kann. Mein Dank gilt dort ganz besonders Frau Prof. Dr. Schagdarsurengin, die mich gemeinsam mit Herrn Prof. Dr. Wagenlehner bereits vor Beginn der eigentlichen Laborarbeit tatkräftig bei der Planung des Projektes unterstützte. Mit Fragen und Bitten konnte ich mich jederzeit an diese beiden wenden und erhielt innerhalb kürzester Zeit Unterstützung bei jeglichen Problemstellungen. Von einer solchen Betreuung hätte ich vor Beginn meiner Arbeit kaum zu träumen gewagt. Vielen Dank!

Des Weiteren möchte ich mich insbesondere bei den 3 wunderbaren MTAs des Labors bedanken: Kerstin Wilhelm, Tania Bloch und Barbara Fröhlich standen mir jederzeit mit Ratschlägen sowie praktischer und organisatorischer Unterstützung zur Seite. Sie halfen mir dabei, mich mit der Arbeit im Labor vertraut zu machen und unterstützten mich tatkräftig beim Aufbau der gesunden Kontrollgruppe. Ohne sie würde ich wahrscheinlich noch heute die eine oder andere Probe in den Tiefen der Kühlschränke suchen. Des Weiteren möchte ich mich bei Andreas Fröbuis, Alexander Kruse und Temuujin Dansranjav bedanken, die mich ebenfalls bei jeglichen Fragen unterstützten.

Darüber hinaus gebührt ein ganz besonderer Dank Hang Yan. Er leistete großartige Vorarbeit mit seinem Projekt, half mir insbesondere in den ersten Wochen bei zahlreichen Versuchen und hatte für jede Frage ein offenes Ohr. Zudem stellte er mir in Form der selektieren DNA von RNA von Leukozyten und Epithelzellen einen wesentlichen Baustein meiner Arbeit zur Verfügung. Mit seiner Hilfe blieben mir wahrscheinlich zahllose schlaflose Nächte erspart. Vielen Dank dafür.

Zum Schluss möchte ich mich bei den Mitarbeitern der Klinik für Urologie unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Wagenlehner bedanken, ohne die diese Arbeit ebenfalls nicht möglich gewesen wäre. Mein Dank gilt hier zum einen Herrn Prof. Dr. Pilatz, der durch die zahlreichen Patienten seiner Sprechstunde frische Proben für die Biobank lieferte. Zum anderen gilt mein Dank den Assistenzärzten der Klinik für Urologie, die mich tatkräftig beim Aufbau der gesunden Kontrollgruppe unterstützen.

Vielen Dank auch an alle anderen, die hier nicht namentlich erwähnt sind. Ohne eure Hilfe wäre diese Arbeit nicht in dieser Form möglich gewesen.